

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 200**

51 Int. Cl.:

G01N 21/35 (2014.01)

G01N 21/3504 (2014.01)

G01N 21/03 (2006.01)

G01N 21/3563 (2014.01)

G01N 21/3577 (2014.01)

H01S 3/00 (2006.01)

G01N 21/3586 (2014.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2014** **E 14004401 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018** **EP 3037805**

54 Título: **Método para medir una respuesta de muestra espectral**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.05.2019

73 Titular/es:

**MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.
(50.0%)**

**Hofgartenstraße 8
80539 München, DE y
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**APOLONSKIY, ALEXANDER;
PUPEZA, IOCHAIM;
KRAUSZ, FERENC y
FILL, ERNST**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 712 200 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para medir una respuesta de muestra espectral.

5 La presente invención se refiere a un método de medición de una respuesta espectral de una muestra biológica. En particular, la invención se refiere a un método de medición de la respuesta espectral irradiando la muestra con luz de sonda de banda ancha y captando cambios espectrales de la luz de sonda, que son el resultado de una interacción de la luz de sonda con la muestra, tal como un método de medición de la absorción y/o la reflexión de la luz de sonda en la muestra. Además, la invención se refiere a un aparato de medición espectroscópica para medir una respuesta espectral de una muestra biológica, que incluye, en particular, una fuente de luz de banda ancha para irradiar la muestra con luz de sonda y un dispositivo detector para detectar, por resolución espectral, cambios de la luz de sonda como resultado de una interacción de la luz de sonda con la muestra. Las aplicaciones de la invención están disponibles en la espectroscopia de muestras, en particular para analizar una composición y/o condición de una muestra. Las muestras que se pueden analizar comprenden muestras biológicas, en particular, muestras de un organismo humano o animal.

Para ilustrar los antecedentes de la técnica en relación con planteamientos para analizar muestras de sustancias, en particular muestras biológicas con vistas a obtener un diagnóstico, se hace referencia a los siguientes documentos de la técnica anterior:

- 20 [1] B. de Lacy Costello *et al.*, "A review of the volatiles from the healthy human body", J. Breath Res. 8, 014001 (2014);
- [2] T.H. Risby *et al.*, "Current status of clinical breath analysis", Appl. Phys. B 85, 421-426 (2006);
- 25 [3] W. Cao *et al.*, "Breath analysis: Potential for clinical diagnosis and exposure assessment", Clinical Chemistry 52, 800-811 (2006);
- [4] US 2012/0266653 A1;
- 30 [5] US 7,101,340 B1;
- [6] WO 2011/117572 A1;
- [7] US 5,222,495;
- [8] US 8,022,366 B2;
- [9] US 6,236,047 B1;
- 35 [10] US 7,403,805 B2;
- [11] US 7,203,345 B2;
- [12] EP 0,680,273 B1;
- [13] P. Dumas *et al.*, "Adding synchrotron radiation to infrared microspectroscopy: what's new in biomedical applications?" TRENDS in Biotechnology 25, 40 (2006);
- 40 [14] I. Znakovskaya *et al.*, "Dual frequency comb spectroscopy with a single laser", Opt. Lett. 39, 5471 (2014);
- [15] A. Sponring *et al.*, "Release of volatile organic compounds from the lung cancer cell line NCI-H2087 In Vitro", Anticancer Research 29, 419 (2009);
- 45 [16] M. Diem *et al.*, "Molecular pathology via IR and Raman spectral imaging", J. Biophoton. 6, 855 (2013);
- [17] W. Parz *et al.*, "Time-domain spectroscopy of mid-infrared quantum cascade lasers", Semiconductor Science and Technology, IOP Publishing LTD, GB, 26, 014020 (2010), que da a conocer un método según el preámbulo de la reivindicación 1;
- 50 [18] B. Bernhardt *et al.*, "Mid-infrared dual-comb spectroscopy with 2.4 micrometer Cr²⁺: ZnSe femtosecond lasers", Applied Physics B; Lasers and Optics, 100, 3 (2010);
- [19] WO 2007/121598 A1;
- [20] US 2013/221222 A1
- 60 [21] PUPEZA I *ET AL*: "Compact 0,1-W source of octave-spanning mid-infrared femtosecond pulses centered at 10 [mu]m", 2014 CONFERENCE ON LASERS AND ELECTRO-OPTICS (CLEO) – LASER SCIENCE TO PHOTONIC APPLICATIONS, THE OPTICAL SOCIETY, junio de 2014 (2014-06), páginas 1 a 2, San Jose, CA, USA;
- 65 [22] SELL A *ET AL*: "Phase-locked generation and field-resolved detection of widely tunable terahertz pulses with amplitudes exceeding 100 MV/cm", OPTICS LETTERS, OPTICAL SOCIETY OF AMERICA, vol. 33,

nº 23, 1 de diciembre de 2008 (2008-12-01), páginas 2767-2769, ISSN: 0146-9592, DOI: 10.1364/OL.33.002767;

[23] Albert Schliesser *ET AL*: "Mid-infrared frequency combs", *Nature Photonics*, 28 de junio de 2012 (2012-06-28), páginas 440-449, Londres, DOI: 10.1038/nphoton.2012.142; y

[24] HANIEH FATTAHI *ET AL*: "Efficient, octave-spanning difference-frequency generation using few-cycle pulses in simple collinear geometry", *OPTICS LETTERS, OPTICAL SOCIETY OF AMERICA*, vol. 38, n.º 20, 15 de octubre de 2013 (2013-10-15), páginas 4216-4219, ISSN: 0146-9592, DOI: 10.1364/OL.38.004216.

En medicina existe una necesidad urgente de un diagnóstico mínimamente invasivo, rápido, fiable y rentable, de enfermedades en estadios iniciales (cribado) y para monitorizar su respuesta a la terapia. Es conocido en general que el análisis de muestras biológicas, incluyendo fluidos corporales y gases emitidos por el cuerpo, resulta claramente adecuado para este fin ya que estos últimos contienen una multitud de compuestos característicos del estado de salud de una persona. Se conocen aproximadamente 1760 componentes diferentes del tipo mencionado, específicamente 874 en el aliento exhalado, 504 en emanaciones cutáneas, 279 en espacio de cabeza de orina, 130 en la sangre, 381 en las heces y 353 en la saliva [1]. Y lo que es más importante, algunos compuestos existen solamente en la fase líquida, otros en las fases tanto gaseosa como líquida. En particular, el aerosol del aliento es potencialmente rico en compuestos pesados.

Cualquier cambio en la estructura de los constituyentes moleculares de una célula humana provoca de manera invariable un cambio en el espectro de absorción del infrarrojo medio (MIR) de la propia célula o de sus emanaciones metabólicas. Como consecuencia, las pequeñas modificaciones en el espectro ofrecen unos medios de detección y diagnóstico precoces de muchas enfermedades. Las trazas espectrales demostradas estadísticamente de una enfermedad proporcionarán una información de "huella dactilar" fiable para su diagnóstico precoz.

En los diagnósticos típicos, los compuestos de muestras biológicas se detectan por análisis químico o por cromatografía de gases en combinación con espectrometría de masas [2, 3]. No obstante, estos métodos i) no permiten un análisis rápido, ii) pueden modificar o incluso destruir algunos compuestos y iii) son ciegos a los cambios conformacionales en la estructura del ADN, los cuales, sin ningún cambio en la masa, pueden iniciar enfermedades severas.

Además, se han sugerido varios métodos espectroscópicos para el examen de fluidos y gases corporales [4-12, 16]. En la referencia [4] se propone solamente el análisis de gases cuando, en realidad, todas las fases (gas, líquido, sólido, aerosol) pueden contribuir al conocimiento del diagnóstico. En la referencia [5], se sugiere el análisis espectral del aliento mediante láseres de onda continua y, por lo tanto, el número de puntos de datos espectrales disponibles y su valor informativo es muy limitado. En la referencia [6], se usa un intervalo estrecho de longitudes de onda y solamente se detectan tres gases, restringiendo la variedad de diagnósticos a la diabetes.

En las referencias [7] y [8] se describen otros planteamientos convencionales que tratan sobre el análisis espectral de líquidos corporales, tales como la sangre o la saliva. La patente [7] propone un análisis de sangre no invasivo comparando la absorción de dos longitudes de onda con una pequeña separación entre sí en la sangre. En la referencia [8] se propone un espectrómetro de MIR compacto para medir el azúcar en sangre (glucosa) y otros analitos en sangre y en fluidos corporales. El mismo consiste en un emisor térmico modulado y un espectrómetro de baja resolución que contiene placas de cuarto de onda que actúan como filtros interferenciales.

En la referencia [9] se usa la radiación, reflejada de manera difusiva, de bandas en el intervalo de 1100 a 5000 nm para determinar concentraciones de analitos sanguíneos por técnicas quimiométricas. Otra de las técnicas usa un dispositivo de contacto situado en el ojo para investigar cambios espectrales en la conjuntiva y en la película lagrimal [10]. Con este fin se utilizan la radiación térmica proveniente del propio ojo o radiación externa suministrada por una fibra. En la referencia [11] se usa la espectroscopia para identificar individuos analizando la reflexión de radiación del infrarrojo cercano desde tejido humano. En la referencia [12] un catéter que contiene un haz de fibra óptica se introduce en compartimentos gastrointestinales para la detección de fluorescencia y absorción de luz por parte de su contenido.

Como desventaja general, ninguno de los métodos convencionales tiene la capacidad de proporcionar la información completa sobre el estado de salud de una persona que, en principio, debería estar disponible. Las técnicas convencionales se especializan solamente para el uso de una única fase con vistas al diagnóstico. Además, utilizan únicamente un intervalo espectral estrecho dentro del ancho de banda completo de MIR, y no son suficientemente sensibles para detectar cambios sutiles en el espectro indicativos de una enfermedad. En otras palabras, los planteamientos conocidos ofrecen acceso solamente a una pequeña fracción de la huella dactilar molecular completa, y ello además con una sensibilidad y una relación de señal/ruido que es insuficiente para una identificación y un diagnóstico fiables de enfermedades.

Recientemente, se ha explorado el uso de radiación de sincrotrón para el diagnóstico espectroscópico por imágenes de células con diversos tipos de trastornos [13]. Esta radiación es de banda ancha y aproximadamente dos órdenes de magnitud más intensa que la de una fuente térmica. No obstante, la aplicación de sincrotrones para diagnósticos rutinarios y para cribar un número elevado de pacientes no parece práctica.

Las limitaciones anteriores no aparecen solamente con el análisis de muestras biológicas con fines diagnósticos. Otras investigaciones espectroscópicas, por ejemplo, de muestras medioambientales ([18] a [20]) o técnicas ([17]), presentan desventajas similares, en particular en términos de sensibilidad, selectividad y uso limitado de información disponible.

Un primer objetivo de la invención es proporcionar un método mejorado de medición de una respuesta espectral de una muestra, que tenga la capacidad de evitar limitaciones o desventajas de técnicas convencionales. En particular, el primer objetivo de la invención es dotar al método de medición, de una sensibilidad aumentada, una relación de señal/ruido (SNR) mejorada, una selectividad potenciada y/o una capacidad mejorada de cubrir un intervalo espectral ampliado, por ejemplo, en el intervalo espectral del infrarrojo medio (MIR). Un segundo objetivo de la invención es proporcionar un aparato de medición espectroscópica mejorado, que está adaptado para medir una respuesta espectral de una muestra a una irradiación de luz de sonda, en el que el aparato de medición espectroscópica tiene la capacidad de evitar limitaciones y desventajas de técnicas convencionales. En particular, el aparato de medición espectroscópica debe presentar la capacidad de proporcionar mejoras en términos de sensibilidad, SNR, selectividad y/o cobertura de banda ancha.

Estos objetivos se resuelven con un método de medición de respuesta espectral de acuerdo con la reivindicación independiente 1, que define la presente invención. A partir de las reivindicaciones dependientes se ponen de manifiesto las formas de realización y aplicaciones preferidas de la invención.

Según un primer aspecto general de la invención, el objetivo anterior se resuelve con un método de medición de una respuesta espectral de una muestra biológica, en donde se generan impulsos de luz de sonda con un dispositivo de fuente de láser de fs (femtosegundos), los mismos se dirigen sobre la muestra que se debe investigar y se detectan después de una interacción con la muestra. Los impulsos de luz de sonda proporcionan luz de sonda que tiene un espectro primario, el cual está formado por los componentes frecuenciales de los impulsos de luz de sonda. El término "espectro primario" se refiere a la composición espectral de los impulsos de luz de sonda antes de una interacción con la muestra. Debido a la creación de los impulsos de luz de sonda con un dispositivo de fuente de láser de fs, el espectro primario es un espectro continuo o casi continuo, cuya forma se determina por la salida del dispositivo de fuente de láser de fs, por ejemplo, por el proceso específico del oscilador y/o el amplificador, en combinación, opcionalmente, con DFG y/o con presión de impulsos, implementado por el dispositivo de fuente de láser de fs.

Debido a la generación de los impulsos de luz de sonda con el dispositivo de fuente de láser de fs, el espectro primario es un espectro de banda ancha, que abarca un intervalo espectral que incluye una pluralidad de bandas espectrales (características de respuesta espectral) de interés. Debido a la interacción con la muestra, los impulsos de luz de sonda adoptan un espectro modificado, el cual se desvía con respecto al espectro primario. El término "espectro modificado" se refiere a la composición espectral de los impulsos de luz de sonda después de la interacción con la muestra. El espectro modificado comprende una forma espectral del espectro primario que es cambiado por al menos una banda espectral (línea espectral) de un componente incluido en la muestra. Preferentemente, el espectro modificado incluye una pluralidad de bandas espectrales de uno o múltiples componente(s) incluido(s) en la muestra. Mediante detección, por resolución espectral, de la luz de sonda después de la interacción con la muestra, pueden captarse todas las bandas espectrales del por lo menos un componente. El espectro modificado, en particular la diferencia entre el espectro modificado y el espectro primario, preferentemente las posiciones, amplitudes relativas y/o fases espectrales de bandas espectrales creadas por la muestra, es característico de la respuesta espectral de la muestra.

A continuación se da a conocer también un aparato de medición espectroscópica (espectrómetro), el cual está adaptado para medir una respuesta espectral de una muestra biológica, en el que el aparato de medición espectroscópica comprende una fuente de luz de sonda para irradiar la muestra bajo investigación con luz de sonda que presenta un espectro primario, y un dispositivo detector para una detección, por resolución espectral, de los impulsos de luz de sonda después de una interacción con la muestra. La fuente de luz de sonda comprende un dispositivo de fuente de láser de fs, el cual está configurado para generar impulsos de luz de sonda de fs.

Ventajosamente, el dispositivo de fuente de láser de fs combina las siguientes características clave. En primer lugar, el uso de los impulsos de sonda de fs proporciona una radiación de banda ancha que abarca el intervalo espectral completo de interés, en caso de investigar muestras biológicas, por ejemplo, con fines diagnósticos. Los impulsos de sonda de fs tienen un espectro primario que comprende un intervalo espectral el cual permite la excitación de transiciones de vibración y/o rotación en componentes de la muestra, en particular moléculas orgánicas incluidas en la muestra. Debido al espectro de banda ancha de los impulsos de sonda de fs, la

5 respuesta espectral de la muestra se puede detectar como un patrón de banda espectral específico (“huella dactilar” espectral). La repuesta espectral es específica de componentes de la muestra en términos de las posiciones espectrales de bandas espectrales en el patrón de bandas espectrales y de las intensidades relativas de las bandas espectrales. En segundo lugar, en comparación con técnicas convencionales, el dispositivo de
 10 fuente de láser de fs dota de una alta potencia y de una estructura temporal por impulsos ultracortos de la radiación a los impulsos de luz de sonda, permitiendo una detección de bandas espectrales estrechas (constituyentes de la huella dactilar molecular) con una sensibilidad sin igual. La potencia de los impulsos de luz de sonda de fs está aumentada en comparación con la potencia de fuentes térmicas de banda ancha y fuentes de sincrotrón en al menos 4 y 2 órdenes de magnitud, respectivamente. En particular, el incremento de la
 15 potencia de los impulsos de luz de sonda y de la duración de los impulsos ultracortos permite una detección de la respuesta espectral con una SNR esencialmente reducida en comparación con técnicas convencionales. En tercer lugar, el uso del dispositivo de fuente de láser de fs permite la aplicación de técnicas espectroscópicas rápidas para detectar el espectro modificado de la luz de sonda. La velocidad de análisis se puede incrementar esencialmente, lo cual es una ventaja en particular en el campo de la investigación de muestras biológicas. Además, la facilidad de funcionamiento hace que el uso de la técnica de la invención sea viable en condiciones prácticas, por ejemplo, con la aplicación diagnóstica de la invención incluso en hospitales o consultorios médicos.

20 Con formas de realización preferidas de la invención, los impulsos de luz de sonda tienen por lo menos una de las siguientes características de impulsión. De acuerdo con una primera variante preferida, la duración de impulso de los impulsos de luz de sonda está por debajo de una anchura de frecuencia recíproca de un espectro cubierto por características de respuesta espectral, en particular una o múltiples bandas espectrales, que aparecen en el espectro de la muestra, es decir, en el espectro modificado de la luz de sonda. Debido a esta relación, se facilita la detección de la luz de sonda con una técnica de metrología en el dominio temporal. Si la detección, por resolución espectral, de la luz de sonda con el espectro modificado se basa en un muestreo temporal de la estructura en el tiempo de los impulsos de luz de sonda después de la interacción con la muestra, pueden detectarse estelas de las características de respuesta espectral con una SNR mejorada, preferentemente incluso con un fondo exento de ruido, si las mismas se producen en un intervalo de tiempo después de la duración de impulso de los impulsos de luz de sonda. De acuerdo con la invención, los impulsos de luz de sonda de fs tienen una duración de impulso igual o inferior a 100 fs, preferentemente 50 fs, de forma particularmente preferida igual o inferior a 20 fs, por ejemplo, 10 fs. Ventajosamente, con estas duraciones de impulsión, se crea una luz de sonda de banda ancha. Además, las características de respuesta espectral de muestras típicas bajo investigación influyen solamente en la estructura en el tiempo de los impulsos de luz de sonda en un intervalo de tiempo fuera de la duración de los impulsos de luz de sonda.

35 Además, la potencia media de los impulsos de luz de sonda se puede incrementar acortando la duración de los impulsos de excitación del infrarrojo cercano (NIR). De este modo, de acuerdo con la invención, los impulsos de luz de sonda se crean con una potencia media por encima de 50 mW, de manera particularmente preferida por encima de 500 mW, por ejemplo, hasta 5 W.

40 La corta duración de impulso de los impulsos de luz de sonda influye además en un ancho de banda espectral del espectro primario. Así, con otra variante preferida de la invención, el espectro primario presenta el ancho de banda espectral que cubre por lo menos una octava de frecuencias, de manera particularmente preferida por lo menos dos octavas de frecuencias. Por lo tanto, se facilita la detección de una huella dactilar molecular específica de la muestra.

45 Preferentemente, el ancho de banda espectral cubre un intervalo del infrarrojo medio (MIR). De acuerdo con la invención, el espectro primario cubre un intervalo de longitudes de onda que incluye longitudes de onda de por lo menos 5 μm , preferentemente por lo menos 3 μm y/o, como mucho, 15 μm , preferentemente, como mucho, 30 μm . Estos intervalos de longitudes de onda se corresponden con intervalos de frecuencia que cubren las características de respuesta espectral de muestras bajo investigación. En particular, la espectroscopia láser de intervalo de longitudes de onda del MIR de 3 μm a 30 μm ofrece una detección cuantitativa de concentraciones más pequeñas de componentes debido a la alta potencia de radiación y a las bandas de alta absorción vibracional/rotacional de moléculas orgánicas.

50 El dispositivo de fuente de láser de fs puede comprender cualquier configuración de fuente de láser disponible, que tenga la capacidad de dotar, a los impulsos de luz de sonda de fs, de una potencia y unas características espectrales y temporales seleccionadas en función de la aplicación particular de la invención, preferentemente con al menos una de las anteriores características de impulsión. El dispositivo de fuente de láser de fs puede comprender una combinación de una fuente de excitación que crea impulsos de excitación (onda fundamental) y una unidad de generación de diferencia de frecuencias (DFG *difference frequency generation*) que está adaptada para crear los impulsos de luz de sonda por diferencias de frecuencia intraimpulso de los impulsos de excitación.

65 La fuente de excitación es una fuente de láser que emite los impulsos de excitación con duraciones, por ejemplo, por debajo de 1 ps, preferentemente por debajo de 500 fs. Los impulsos de excitación incluyen componentes frecuenciales que se someten a la DFG intraimpulso dando como resultado un número ampliado de componentes frecuenciales en un intervalo espectral con frecuencias reducidas (longitudes de onda

5 aumentadas) en comparación con los impulsos de excitación. La potencia de la salida de DFG es proporcional a la intensidad de entrada al cuadrado de los impulsos de excitación. Como ventaja esencial de la generación de los impulsos de luz de sonda mediante DFG, la estructura temporal de los impulsos de luz de sonda se mejora con respecto a la estructura temporal de los impulsos de excitación. El proceso de DFG no lineal suprime picos
 10 satelitales que acaban apareciendo en la estructura temporal de los impulsos de excitación. La estructura temporal, exenta de satélites, de los impulsos de luz de sonda presentan ventajas particulares en relación con la reducción de la SNR en la detección de la respuesta espectral de la muestra. Opcionalmente, los impulsos de luz de sonda de fs creados con el dispositivo de fuente de láser de fs, por ejemplo, con la combinación de la fuente de excitación y la unidad de DFG, se pueden someter a una técnica adicional de limpieza de impulsos para
 15 suprimir satélites residuales en la estructura en el tiempo. Además, se puede usar un proceso de DFG, el cual incluye el reciclado de los impulsos fundamentales en una cavidad de aumento (“enhancement”), dando como resultado, así, impulsos de luz de sonda de radiación MIR de banda ancha, coherentes, de varios vatios, que superan el rendimiento de fuentes de MIR del estado de la técnica en un orden de magnitud.

20 Ventajosamente, se encuentran disponibles múltiples fuentes de excitación, que se pueden incluir en el dispositivo de fuente de láser de fs. Preferentemente, la fuente de excitación incluye uno de un láser de fibra y un láser de disco, por ejemplo, un láser de disco de Yb-YAG o un láser de disco de Ho-YAG. Estos tipos de láser presentan ventajas en términos de proporcionar impulsos de excitación con una potencia y una velocidad de repetición elevadas. Como ejemplo, el láser de disco de Yb-YAG es un oscilador láser que incluye un disco de
 25 Yb-YAG que crea los impulsos de excitación por acoplamiento de modos con lente de Kerr con una longitud de onda central de 1030 nm, una velocidad de repetición de 100 MHz y una duración de impulso de 300 fs, permitiendo la creación de los impulsos de luz de sonda con una duración de impulso por debajo de 20 fs y una anchura espectral de 5 μm a 15 μm . Como alternativa adicional, el dispositivo de fuente de láser de fs puede comprender otra combinación de oscilador-amplificador, como, por ejemplo, un sistema láser de MOPA (amplificador de potencia con oscilador maestro) que cree los impulsos de luz de sonda mediante generación
 30 paramétrica óptica en un cristal no lineal.

Una fuente de excitación que emite impulsos de excitación con una longitud de onda central igual o superior a 2 μm , en particular el láser de disco de Ho-YAG con acoplamiento de modos con lente de Kerr, presenta ventajas
 35 particulares en términos de aumento del ancho de banda y la potencia media de los impulsos de luz de sonda. En comparación con, por ejemplo, el láser de disco de Yb-YAG, la energía fotónica se reduce, debilitando así el riesgo de absorciones de 2 fotones no pretendidas en la unidad de DFG. Por consiguiente, se puede reducir el grosor del cristal ópticamente no lineal de la unidad de DFG, de manera que hay disponible un ancho de banda incrementado para la adaptación de fase del proceso de DFG. En particular, el uso de impulsos de excitación con
 40 la longitud de onda media igual o superior a 2 μm permite la provisión de un cristal de DFG en la unidad de DFG, que presenta un grosor tal que los impulsos de luz de sonda creados por el proceso de DFG tienen un ancho de banda en un intervalo de 3 μm a 30 μm .

El término “respuesta espectral” se refiere a cualquier respuesta de la muestra a la irradiación con los impulsos
 45 de luz de sonda, lo cual da como resultado un cambio espectral de los impulsos de luz de sonda. Ventajosamente, se pueden captar diferentes tipos de respuestas espectrales, las cuales se pueden seleccionar en función de la geometría de medición disponible y/o la condición de la muestra. Con aplicaciones preferidas de la invención, la respuesta espectral comprende por lo menos uno de un espectro de absorción y un espectro de reflexión de la muestra. Preferentemente, el espectro de absorción se capta con muestras transparentes, como,
 50 por ejemplo, un líquido transparente, mientras que el espectro de reflexión se capta preferentemente con muestras sólidas, no transparentes. Opcionalmente, los espectros tanto de absorción como de reflexión se pueden medir adaptando la geometría de detección. La interacción con la muestra no influye en las características temporales de los impulsos de luz de sonda.

La invención no se limita a una cierta condición física de la muestra. Según unas aplicaciones preferidas de la
 55 invención, la muestra puede comprender por lo menos uno de entre un sólido, como, por ejemplo, una célula biológica, un grupo de células o cultivo celular, o tejido de un organismo, un líquido, como, por ejemplo, sangre u otros líquidos corporales, opcionalmente diluidos, un aerosol, como, por ejemplo, aliento que incluye trazas de gotitas líquidas, un gas y un vapor, por ejemplo, que emane de un organismo biológico. Debido a la alta sensibilidad del método de la invención, pueden medirse respuestas espectrales incluso con muestras extremadamente diluidas, como el aerosol, gas o vapor, y/o muestras extremadamente pequeñas, como una única célula biológica.

Preferentemente, el aparato de medición espectroscópica incluye un dispositivo portamuestras, el cual está
 60 configurado para albergar la muestra. El dispositivo portamuestras tiene una forma y una estructura que se seleccionan en función de la condición de la muestra a investigar. Con ejemplos preferidos, un dispositivo portamuestras para albergar una muestra sólida o líquida puede comprender una cubeta como la que se usa con mediciones espectroscópicas convencionales. Si la interacción de los impulsos de luz de sonda con la muestra es débil, como, por ejemplo, con muestras de fase gaseosa o líquidos diluidos, puede que se requieran múltiples
 65 pasos de los impulsos de luz de sonda a través de la muestra para mejorar la SNR. Esto se puede lograr disponiendo la muestra en una celda de paso múltiple. La celda de paso múltiple se puede incluir en el trayecto

del haz para mejorar significativamente la SNR. Como mejora posible alternativa, la muestra se puede disponer en una cavidad de aumento. La cavidad de aumento puede proporcionar una longitud de trayecto elevada con un volumen significativamente menor, mejorando de manera sustancial la captación efectiva de muestras gaseosas relevantes. Por otro lado, en la fase condensada, la densidad de especies absorbentes es muchos órdenes de magnitud superior. Como consecuencia, la longitud de absorción es corta, típicamente una fracción de milímetro. En este caso, el dispositivo portamuestras está configurado para albergar una muestra en forma de capa, que tiene preferentemente un grosor igual o inferior a 1 mm, por ejemplo, en una cubeta con forma de capa con un grosor de la capa inferior a 50 μm , en particular inferior a 20 μm . La muestra sólida o líquida se puede preparar en forma de una lámina delgada submilimétrica de apertura grande, depositada en un sustrato transmisor de IR delgado (en el caso de una muestra sólida) o interpuesta entre dos sustratos transmisores de IR (en el caso de muestras líquidas, tales como sangre o saliva). Con una alternativa adicional, el dispositivo portamuestras se puede adaptar para una reflexión total de la luz de sonda de manera que se logre la interacción de una onda evanescente con la muestra.

La dimensión transversal del volumen de la muestra iluminada se puede seleccionar para aumentar al máximo la SNR, en particular en muestras en fase condensada: las sustancias indicativas de una enfermedad están presentes, típicamente, con concentraciones medias muy bajas. No obstante, su concentración puede ser apreciable en células afectadas. Como consecuencia, la SNR se puede aumentar drásticamente concentrando de manera ajustada el haz de impulsos de luz de sonda de manera que se aproxime al tamaño de las células indicativas de la enfermedad (indicadores) y realizando un barrido del haz de láser cruzando la apertura de la muestra. De esta manera, se aumenta al máximo la relación del número de indicador(es) con respecto al de células sanas en el volumen de muestra iluminado y se aumenta al máximo por tanto la SNR.

Cabe indicar que el dispositivo portamuestras no es estrictamente necesario para implementar la invención. La muestra puede estar incluida en un organismo o proceso técnico condición medioambiental durante la medición inventiva de la respuesta espectral de la muestra. En particular, la respuesta espectral de células o tejido se puede detectar irradiando una parte del organismo directamente, por ejemplo, la piel o el aliento, y detectando la respuesta espectral en la absorción o reflexión. Se pueden usar varias técnicas espectroscópicas para detectar, por resolución espectral, los impulsos de luz de sonda después de la interacción con la muestra. Un dispositivo detector puede comprender una combinación de un elemento dispersivo, como, por ejemplo, un monocromador, y un sensor que esté dispuesto para una captación en serie de los datos de la respuesta espectral, aunque se prefiere la detección con una captación paralela de los datos de la respuesta espectral. Uno de los planteamientos convencionales es, por ejemplo, la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) como la que se usa ampliamente para adquirir espectros de absorción molecular. Combinada con una detección equilibrada e implementada con un peine de frecuencias dual (disponible con una única fuente de láser, véase la Ref. [14]), permite una medición rápida de cambios pequeños en la amplitud de los componentes espectrales de los impulsos de luz de sonda de banda ancha transmitidos a través de la muestra o reflejados por esta última.

Según la invención, la etapa de detección comprende muestrear, en el dominio temporal, los impulsos de luz de sonda para obtener la forma temporal de los mismos, en combinación con una transformación de Fourier de la forma temporal. Ventajosamente, la transformada de Fourier de la forma temporal de los impulsos de luz de sonda proporciona directamente la respuesta espectral de la muestra. El muestreo en el dominio temporal no proporciona solamente las amplitudes de los componentes espectrales en la respuesta espectral de la muestra, sino también información de fase sobre los componentes espectrales. Esta información de fase es portadora de información complementaria importante sobre la respuesta espectral, por ejemplo, la característica de absorción de la muestra.

El muestreo en el dominio temporal comprende, por ejemplo, muestreo electro-óptico (EOS) de los impulsos de luz de sonda. La espectroscopia de EOS proporciona un acceso directo, con resolución en el tiempo, a la forma de onda del campo eléctrico del impulso de sonda de MIR transmitido a través de o reflejado por la muestra, generando – tras la transformación de Fourier – tanto la amplitud como la fase del cambio espectral provocado por absorción resonante en la señal transmitida o reflejada.

Como ventaja adicional, el muestreo en el dominio temporal proporciona una medición de la respuesta espectral sin ruido de fondo. En el dominio temporal, una línea de absorción estrecha de una transición molecular induce una onda larga que sigue al impulso principal en la señal transmitida. Esta estela contiene toda (tanto amplitud como fase) la información sobre la línea de absorción y se puede medir con respecto a un ruido de fondo cero, gracias (i) a su separación temporal completa con respecto a la radiación de entrada (impulso de luz de sonda) confinada a una fracción diminuta de la longitud/duración de la correspondiente de la señal de estela inducida por la absorción y (ii) la detección, por resolución en el tiempo, en el muestreo en el dominio temporal, en particular el EOS.

De acuerdo con la invención, la muestra a investigar comprende una muestra biológica de un organismo humano o animal. La respuesta espectral de la muestra se mide para obtener información relevante, en términos diagnósticos, sobre el organismo. El término “información relevante en términos diagnósticos” se refiere a cualquier información sobre la muestra, en particular su composición, diferencias comparadas con muestras de

referencia o cambios temporales de la muestra, que se puede usar para proporcionar o validar un diagnóstico médico. Por consiguiente, con una forma de realización preferida de la invención, el método de medición incluye la etapa de evaluar la respuesta espectral de la muestra con el fin de obtener la información relevante en términos diagnósticos. En términos de características del dispositivo, una forma de realización preferida del aparato de medición espectroscópica incluye, preferentemente, un dispositivo de cálculo, el cual está adaptado para procesar la respuesta espectral y proporcionar la información relevante en términos diagnósticos. Ventajosamente, a la información relevante en términos diagnósticos se le puede dar salida hacia un usuario de la técnica de la invención, por ejemplo, un médico. Posteriormente, el usuario puede proporcionar un diagnóstico teniendo en cuenta la información relevante en términos diagnósticos.

La aplicación de la invención en diagnósticos presenta las siguientes ventajas particulares. La invención permite determinar trazas espectrales de enfermedades en todas las fases posibles de la muestra: gas, líquido, sólido y aerosol. Los inventores han descubierto que, por contraposición a las técnicas convencionales, la invención tiene la capacidad de acceder a la huella dactilar molecular completa de compuestos indicativos de una enfermedad, proporcionando, así, una técnica aplicable de manera universal y capaz de examinar todos los gases, fluidos y sólidos relacionados con el estado de salud del cuerpo. Implementada con un láser de femtosegundos, puede proporcionar un calentamiento o ablación (uñas, pelo, piel, sangre, orina, etcétera) de la muestra, para permitir mediciones en la fase gaseosa, donde pueden detectarse las modificaciones más pequeñas de la intensidad o posición de la línea debido a cambios en la estructura molecular. Como ejemplo destacado de aplicación, se pueden analizar y utilizar compuestos orgánicos volátiles liberados por células cancerosas contenidas en la sangre (por ejemplo, mediante un aparato similar al descrito en la referencia [15]) con vistas a una detección precoz del cáncer por medio de la invención. Gracias a su alta velocidad, la invención permite mediciones dependientes del tiempo en escalas de tiempo cortas, lo cual es importante cuando se liberan compuestos en diferentes instantes de tiempo. El rápido funcionamiento del espectrómetro también puede resultar beneficioso para una espectrometría evaporativa rápida durante una cirugía ([16]).

Al estar exento completamente de cualquier riesgo, este planteamiento diagnóstico – una vez validado – resulta adecuado idealmente para un cribado precoz (es decir, frecuente) de diversas enfermedades crónicas. Gracias a su carácter no invasivo, facilitará la monitorización continua de una terapia, proporcionando información vital sobre su eficacia. El método puede reducir significativamente el tiempo y el esfuerzo dedicados al diagnóstico médico, así como reducir las incomodidades para los pacientes. Es aplicable a una amplia variedad de dolencias, por ejemplo, enfermedades pulmonares, diversos tipos de cáncer, disfunción renal y trastornos metabólicos. La rapidez, la comodidad y el coste comparativamente bajo de la técnica diagnóstica propuesta en esta invención hace que la misma resulte adecuada para un examen rutinario de un gran número de personas y, por lo tanto, puede mejorar el estado de salud de una población completa. No es necesario analizar químicamente sustancias individuales en la muestra, si la respuesta espectral es suficiente para identificar su presencia basándose en la huella dactilar específica.

Ventajosamente, la evaluación de la respuesta espectral puede incluir diversas medidas, las cuales se pueden implementar por separado o combinadas. De acuerdo con una primera variante, pueden identificarse sustancias relevantes en términos diagnósticos sobre la base de bandas espectrales específicas (ubicación, amplitudes y/o fases) que aparezcan en el espectro modificado. Con este fin, el dispositivo de cálculo puede incluir una unidad de filtro que está adaptada para analizar la aparición y características de las bandas específicas en el espectro modificado.

Según otra variante, la etapa de evaluación puede incluir una etapa de comparación de al menos una porción del espectro que se ha modificado con una respuesta de muestra almacenada previamente captada, con otra muestra del mismo sujeto bajo investigación. En otras palabras, se puede captar una serie en el tiempo de espectros modificados, y la información relevante en términos diagnósticos se puede obtener identificando cambios específicos en la serie en el tiempo de los espectros modificados. Con este fin, la unidad de cálculo puede incluir una primera unidad de comparación, la cual está adaptada para comparar por lo menos una porción del espectro modificado detectado en ese momento con por lo menos una respuesta almacenada, de la muestra, detectada previamente.

Según todavía otra variante, la etapa de evaluación puede incluir una etapa de comparación de por lo menos una porción del espectro modificado con datos de referencia de otros sujetos. Los otros sujetos pueden comprender, por ejemplo, organismos sanos o no sanos, y los datos de referencia pueden representar características de respuestas espectrales de una condición sana o afectada, respectivamente. Por consiguiente, la unidad de cálculo puede incluir una segunda unidad de comparación, la cual está adaptada para comparar por lo menos una porción del espectro modificado, detectado en ese momento, con los datos de referencia. En particular, pueden llevarse a cabo mediciones sobre un gran número de muestras extraídas de pacientes y dichas mediciones se pueden comparar con datos correspondientes adquiridos a partir de un conjunto de personas sanas. Las desviaciones estadísticamente significativas entre los dos grupos permitirán establecer indicadores fiables de la enfermedad bajo escrutinio. A continuación, un análisis estadístico cuidadoso de la muestra de los pacientes, por ejemplo, usando un análisis de componentes principales (PCA), permitirá la determinación de una información relevante en términos diagnósticos sobre su condición en un periodo breve de tiempo.

Las características particularmente preferidas de la invención pueden resumirse de la manera siguiente. La (a) generación de un espectro continuo de MIR multi-octava, de femtosegundos, que abarca la región completa de huella dactilar molecular de 3 μm a 30 μm con un nivel de potencia que superará el correspondiente de fuentes de sincrotrón de MIR en varios órdenes de magnitud y (b) su uso para la medición, sin ruido de fondo, de la señal completa inducida por absorción (que incluye información de amplitud y fase) con una sensibilidad y una señal/ruido que – debido también al uso de detectores de bajo ruido que miden la señal de muestreo de NIR/VIS – superan la correspondiente de espectrómetros de FTIR del estado de la técnica en órdenes de magnitud, constituyen las innovaciones clave ofrecidas por la invención. Ventajosamente, la invención se puede combinar con las técnicas establecidas para supresión de ruido y adquisición rápida de datos (tales como, respectivamente, detección equilibrada y la iluminación de peine dual) hará que mejore el registro de huellas dactilares moleculares de vibración completas por primera vez en una única medición.

Otras ventajas y detalles de la invención se describen a continuación haciendo referencia a los dibujos adjuntos, que representan en:

la figura 1: una primera forma de realización de un aparato de medición espectroscópica:

la figura 2: características de otras formas de realización del aparato de medición espectroscópica;

la figura 3: una ilustración esquemática de muestreo electro-óptico usado para captar la respuesta espectral de la muestra;

la figura 4: una ilustración esquemática de un espectro modificado de impulsos de luz de sonda que incluye bandas espectrales de una muestra; y

la figura 5: ilustraciones de las estelas temporales de captación sin ruido de fondo para detectar la respuesta espectral de la muestra.

A continuación se describen unas formas de realización preferidas de la invención haciendo referencia ilustrativamente a ejemplos particulares de dispositivos de fuente de láser de fs y a la aplicación del muestreo electro-óptico. Cabe resaltar que la invención no se limita a las formas de realización descritas. En particular, el dispositivo de fuente de láser de fs se puede modificar para proporcionar los impulsos de luz de sonda según se especifica en la presente descripción. Además, el método de EOS se puede sustituir por otra técnica espectroscópica, como, por ejemplo, la espectroscopia de FTIR. Se hace referencia ilustrativamente a la aplicación preferida de la invención para proporcionar información relevante en términos diagnósticos.

La figura 1 ilustra esquemáticamente una primera forma de realización de un aparato de medición espectroscópica 100, el cual comprende el dispositivo de fuente de láser de fs 10, el dispositivo portamuestras 30, el dispositivo detector 20 y un dispositivo de cálculo 40. El dispositivo de fuente de láser de fs 10 incluye una fuente de excitación 11, como, por ejemplo, un resonador láser de disco de Yb-YAG combinado con una etapa de ensanchamiento en fibra y un compresor de espejos con *chirping*, y una unidad de DFG 12. La fuente de excitación 11 crea impulsos de excitación 3, por ejemplo, con una longitud de onda central 1030 nm, una duración de pulso 300 fs y una velocidad de repetición 100 MHz. La unidad de DFG 12 incluye un cristal ópticamente no lineal, como, por ejemplo, un cristal basado en LiGaS, el cual está dispuesto para la generación de diferencia de frecuencias intrapulso. La unidad de DFG 12 da salida a impulsos de luz de sonda 2, que tienen un espectro primario formado por componentes de frecuencia de acuerdo con diferencia de frecuencias entre componentes de frecuencia intra-pulso de los impulsos de excitación 3. Con el ejemplo descrito, los impulsos de luz de sonda 2 tienen un espectro primario que va de 3 μm a 30 μm .

El dispositivo portamuestras 30 aloja la muestra 1 que va a ser investigada. Con ejemplos preferidos, el dispositivo portamuestras comprende una cubeta de paso único o de paso múltiple que aloja la muestra 1. El dispositivo portamuestras 30 puede comprender un portamuestras tal como se conoce a partir de técnicas espectroscópicas convencionales, que incluye un alimentador de muestras y/o dispositivos de atemperación.

El dispositivo detector 20 comprende, en general, un detector de infrarrojo cercano, el cual está configurado para captar, por resolución espectral, los impulsos de luz de sonda 2' que tienen un espectro modificado debido a la interacción de los impulsos de luz de sonda 2 con la muestra 1. Preferentemente, el dispositivo detector 20 está adaptado para una captación en paralelo de los datos de respuesta espectral usando, por ejemplo, la técnica de FTIR o EOS (ver la figura 2).

El dispositivo de cálculo 40 comprende, en general, un control basado en microordenador, con una unidad de cálculo y unidades opcionales de filtrado y/o comparación. Además, el dispositivo de cálculo 40 puede incluir una base de datos con datos de referencia de referencia sanos o no sanos. La respuesta espectral 4 según es detectada con el dispositivo detector 20 se evalúa con el dispositivo de cálculo 40 para proporcionar información relevante en términos diagnósticos 6, por ejemplo, una información sobre la presencia o no

presencia de sustancias predeterminadas en la muestra 1.

La figura 2 ilustra esquemáticamente otras características de formas de realización preferidas del aparato de medición espectroscópica 100, que comprende el dispositivo de fuente de láser de fs 10, el dispositivo portamuestras 30, el dispositivo detector 20 y el dispositivo de cálculo 40. La forma de realización de la figura 2 está adaptada para el muestreo electro-óptico de la forma temporal de los impulsos de luz de sonda 2' después de la interacción con la muestra 1. Con este fin, el dispositivo de fuente de láser de fs 10 incluye un elemento divisor de haz, semitransparente 13, como, por ejemplo, un espejo para división de haz, semitransparente, el cual dirige una parte de los impulsos de excitación 3 en forma de impulsos de muestreo 5, a través de una línea de retardo 14, hacia el dispositivo detector 20. El dispositivo detector 20 está configurado para el muestreo electro-óptico de la forma temporal de los impulsos de luz de sonda 2' usando los impulsos de muestreo 5 (ver la figura 3).

Opcionalmente, se puede proporcionar otro elemento divisor de haz 15, como, por ejemplo, un espejo de división de haz, semitransparente, que dirige una parte de los impulsos de excitación 3 a la muestra 1, tal como se muestra con líneas de puntos en la figura 2. Esta parte de los impulsos de excitación 3 se puede usar para calentar por impulsos una muestra líquida o sólida, de manera que sustancia de la muestra se volatiliza y se convierte a la fase de vapor, la cual se irradia con los impulsos de luz de sonda 3. Esta técnica de volatilización se puede alimentar con muestras tomadas de un organismo, es decir, fuera del organismo.

La figura 3 ilustra detalles adicionales del muestreo electro-óptico de la forma temporal de los impulsos de luz de sonda 2'. Los impulsos de excitación de NIR 3 generados con la fuente de excitación 11 se dividen en dos partes. La parte principal (> 90% de la potencia) se desvía por medio de una línea de retardo fija 16 hacia la unidad de DFG 12. La línea de retardo fija 16 está dispuesta para compensar el aumento de la longitud del trayecto del haz de los impulsos de muestreo 5. Con la unidad de DFG 12, los impulsos de excitación 3 se convierten en los impulsos de luz de sonda 2 con característica de infrarrojo medio de banda ancha (MIR). Los impulsos de luz de sonda 2 pasan por la muestra absorbente 1, y, a continuación, son dirigidos hacia un cristal electro-óptico 21 del dispositivo detector 20. El cristal electro-óptico 21 es un cristal ópticamente no lineal, por ejemplo, GaSe que presenta una no linealidad χ^2 .

La otra parte de los impulsos de excitación 3 es dirigida en forma de impulsos de muestreo 5, a través de una línea de retardo móvil 14, hacia el cristal electro-óptico 21. Los impulsos de luz de sonda 2' con el espectro modificado y los impulsos de muestreo 5 se superponen en el cristal electro-óptico 21 con retardo de tiempo variable. El estado de polarización de los impulsos de muestreo 5 que pasan por el cristal electro-óptico 21 es cambiado por el campo eléctrico de los impulsos de luz de sonda 2'. Cambiando el retardo en los dos impulsos con una unidad de mando de retardo (no representada), los impulsos de luz de sonda 2' se muestrean en el cristal electro-óptico 21. Los impulsos de muestreo 5 con el estado de polarización modificado pasan por un prisma de Wollaston 22 que los separa en subimpulsos 5.1 y 5.2 con dos componentes de polarización polarizados ortogonalmente de los impulsos de muestreo 5. Los subimpulsos 5.1 y 5.2 que son portadores de los componentes de polarización diferentes son captados con elementos detectores 23 y 24, que comprenden, por ejemplo, fotodiodos. Los elementos detectores 23 y 24 están equilibrados, es decir, calibrados de tal manera que una diferencia entre las señales de detector correspondientes a los elementos detectores 23 y 24 es proporcional al campo eléctrico del impulso de luz de sonda 2'. Por consiguiente, cambiando el retardo mutuo mediante el uso de la línea de retardo móvil 14, la diferencia de las señales de los detectores proporciona directamente la forma temporal de los impulsos de luz de sonda 2'.

La transformación de Fourier de la forma temporal, es decir, la transformación de Fourier de la diferencia de las señales de los detectores, genera la respuesta espectral de la muestra 1, tal como se ilustra en las figuras 4 y 5. El control de la unidad de mando de retardo que varía el retardo mutuo en la línea de retardo 14, la calibración de las señales de detector correspondientes a los elementos detectores 23, 24, la captación de las señales de los detectores y el cálculo de la transformada de Fourier se pueden realizar por medio de una unidad de control, tal como es sabido a partir de aplicaciones convencionales del método de EOS. La unidad de control se puede proporcionar en forma de una circuitería independiente (no representada) o en forma de una sección de la unidad de cálculo 40 (ver las figuras 1, 2).

Las Figuras 4 y 5 muestran ejemplos de un espectro en el dominio de la frecuencia y una señal en el dominio temporal obtenidos con el método de EOS, respectivamente. En la figura 4 se visualiza un espectro modificado de los impulsos de luz de sonda 2' (espectro de láser de MIR) en el intervalo de frecuencias de 500 a 2000 cm^{-1} (intervalo de longitudes de onda de 20 μm a 5 μm) después de pasar por una muestra absorbente. Para demostrar el principio de funcionamiento se muestran solamente dos líneas de absorción 7. A continuación, el muestreo electro-óptico genera el campo del impulso en el dominio temporal, que es esencialmente la transformada inversa de Fourier del espectro del campo, según se muestra en la figura 5A. El mismo consiste en una denominada ráfaga central 8, correspondiente al amplio espectro primario de los impulsos de luz de sonda, seguida por una estela larga 9 que es el resultado de las líneas de absorción 7 estrechas. La figura 5B muestra la señal con la ráfaga central 8 fuera de escala para mostrar características de la estela 9. Ventajosamente, la transformada de Fourier de esta señal es compleja, incluyendo no solamente el espectro de potencia de las

líneas de absorción 7 como en la espectroscopia común por transformada de Fourier, sino también la fase espectral. El impulso, tal como se muestra, se muestrea sobre un retardo de tiempo de 20 ps, que es equivalente a una resolución espectral de 1.7 cm^{-1} . Las escalas verticales de los dos diagramas están en unidades arbitrarias.

5

La figura 5 muestra la medición sin ruido de fondo de acuerdo con la invención. Puesto que el intervalo temporal se muestra después del final de la ráfaga central, la detección se realiza con un ruido de fondo cero, es decir, sin ruido provocado por los impulsos de luz de sonda. Esta ventaja no puede lograrse con la radiación de sincrotrón de banda ancha, que presenta duraciones de impulso del orden de ps. Así, las estelas de bandas espectrales en la forma temporal se solaparían con la luz de sonda del sincrotrón.

10

Después de la transformación de Fourier de la forma temporal muestreada, la respuesta espectral de la muestra 1 puede procesarse adicionalmente con el fin de obtener información relevante en términos diagnósticos 6 (ver las figuras 1, 2). Este procesado adicional puede ser llevado a cabo por el dispositivo de cálculo 40. Las características espectrales de las líneas de absorción 7 se pueden obtener sometiendo la respuesta espectral a un proceso de filtrado. Se pueden identificar bandas específicas de compuestos característicos del estado de salud de una persona. Además, la respuesta espectral se puede comparar con datos previamente captados con el mismo organismo y/o con datos de referencia captados con otros sujetos sanos o no sanos.

15

REIVINDICACIONES

1. Método de medición de una respuesta espectral de una muestra (1), que comprende las etapas siguientes:

- 5 - generar una luz de sonda que presenta un espectro primario y que comprende unos impulsos de luz de sonda (2) que se generan con un dispositivo de fuente de láser de fs (10) y que presentan una duración de impulso igual o inferior a 100 fs, en el que el espectro primario abarca un intervalo de longitudes de onda que incluye unas longitudes de onda de por lo menos 3 μm ,
- 10 - irradiar la muestra (1) con la luz de sonda, que incluye una interacción de la luz de sonda y la muestra (1), y
- 15 - detectar por resolución espectral la luz de sonda que presenta un espectro modificado, que se desvía del espectro primario como consecuencia de la interacción de la luz de sonda y la muestra (1), siendo dicho espectro modificado característico de la respuesta espectral de la muestra (1), en el que
- 20 - la etapa de detectar comprende muestrear en el dominio temporal una forma temporal de los impulsos de luz de sonda (2) después de la interacción con la muestra (1) y la respuesta espectral de la muestra (1) se obtiene sobre la base de una transformación de Fourier de la forma temporal de los impulsos de luz de sonda (2) después de la interacción con la muestra (1),

caracterizado por que

- 25 - la muestra comprende una muestra biológica (1),
- 30 - los impulsos de luz de sonda (2) se crean con una potencia media por encima de 50 mW, y
- 30 - después de la interacción con la muestra biológica (1), cada uno de los impulsos de luz de sonda (2) comprende un impulso principal correspondiente al espectro primario de los impulsos de luz de sonda y una estela temporal que es inducida por absorción de la muestra biológica (1) y que sigue al impulso principal, en el que el muestreo en el dominio temporal de la forma temporal de los impulsos de luz de sonda (2) incluye muestrear la estela temporal.

2. Método según la reivindicación 1, en el que los impulsos de luz de sonda (2) presentan por lo menos una de las características siguientes

- 40 - los impulsos de luz de sonda (2) presentan una duración de impulso por debajo de una anchura de frecuencia recíproca de un espectro que incluye unas características de respuesta espectral que aparecen en el espectro modificado,
- 45 - los impulsos de luz de sonda (2) presentan una duración de impulso por debajo de 50 fs, en particular por debajo de 20 fs, antes de la irradiación de la muestra (1),
- 50 - los impulsos de luz de sonda (2) presentan una potencia media por encima de 500 mW, antes de la irradiación de la muestra (1),
- 55 - el espectro primario abarca por lo menos una octava de frecuencias, en particular por lo menos dos octavas de frecuencias,
- 60 - el espectro primario abarca un intervalo de longitudes de onda de 5 μm a 15 μm , en particular de 3 μm a 30 μm , y
- 65 - el espectro primario es un espectro continuo o casi continuo.

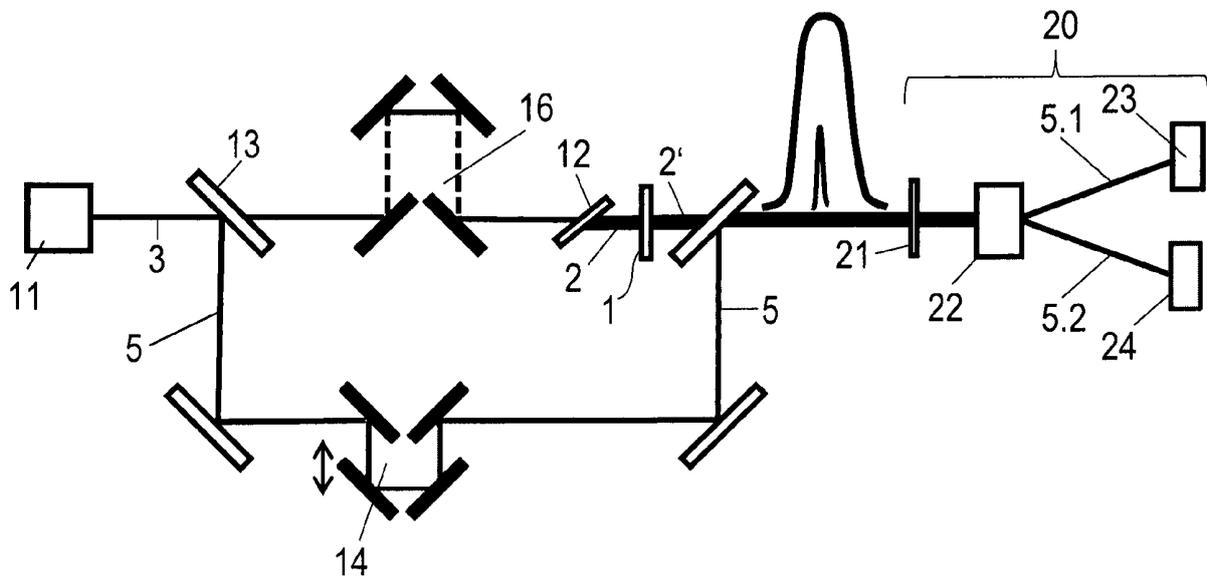
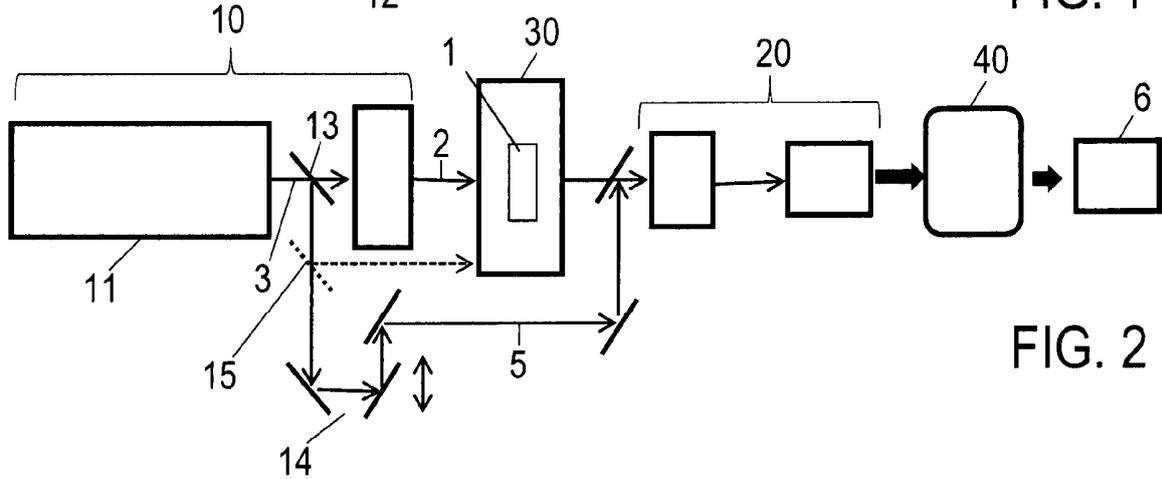
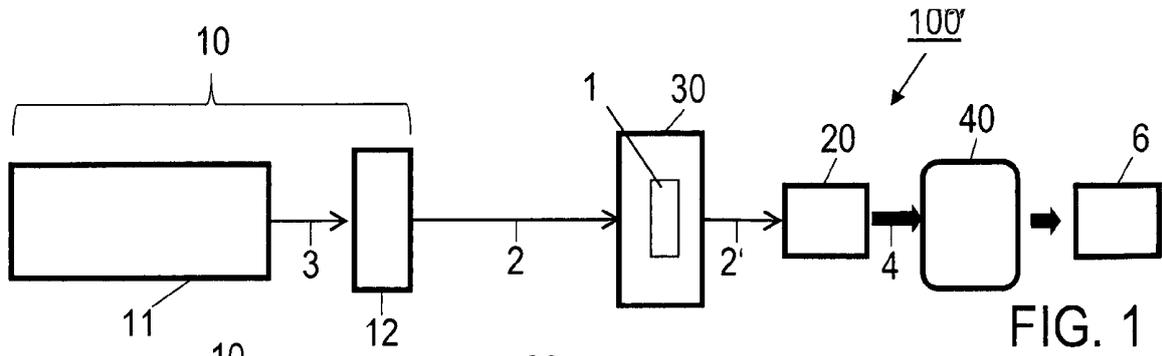
3. Método según una de las reivindicaciones anteriores, en el que

- 70 - la respuesta espectral es por lo menos uno de entre un espectro de absorción y un espectro de reflexión de la muestra (1).

4. Método según una de las reivindicaciones anteriores, que presenta por lo menos una de las características siguientes

- 80 - la muestra (1) comprende por lo menos uno de entre un sólido, un líquido, un aerosol, un gas y un vapor, y
- 85 - la muestra (1) está dispuesta en una celda de paso múltiple o una cavidad de aumento.

5. Método según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el dispositivo de fuente de láser de fs (10) incluye
- 5 - una fuente de excitación (11) que crea impulsos de excitación, y
- una unidad de generación de diferencia de frecuencias (DFG) (12) que genera los impulsos de luz de sonda (2) por diferencias de frecuencia intraimpulso de los impulsos de excitación.
- 10 6. Método según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el dispositivo de fuente de láser de fs incluye
- un láser de fibra,
- un láser de disco de Yb-YAG, o
- 15 - un láser de disco de Ho-YAG.
7. Método según una de las reivindicaciones anteriores, en el que
- la etapa de muestreo en el dominio temporal comprende un muestreo electro-óptico de los impulsos de luz de sonda (2), en el que
- 20 - los impulsos de luz de sonda (2) y los impulsos de muestreo (5) se superponen con una relación temporal variable en un elemento de sonda electro-óptico (21) para muestrear la forma temporal de la luz de sonda.
8. Método según la reivindicación 7, en el que
- 25 - los impulsos de muestreo (5) comprenden unas partes de impulsos de excitación (3) que se utilizan para la generación de los impulsos de luz de sonda (2), dirigiéndose dichos impulsos de muestreo (5) hacia el elemento de sonda electro-óptico con un retardo variable con respecto a los impulsos de luz de sonda (2).
- 30 9. Método según una de las reivindicaciones anteriores, que comprende la etapa adicional de
- evaluar la respuesta espectral de la muestra (1) de un sujeto bajo investigación para obtener una información relevante diagnósticamente (6) que se puede utilizar para proporcionar o validar un diagnóstico médico.
- 35 10. Método según la reivindicación 9, en el que la etapa de evaluación incluye por lo menos una de
- identificar unas sustancias relevantes diagnósticamente sobre la base de bandas específicas (7) en el espectro modificado,
- 40 - comparar por lo menos una porción del espectro modificado con una respuesta espectral almacenada captada previamente con otra muestra (1) del sujeto bajo investigación, y
- 45 - comparar por lo menos una porción del espectro modificado con los datos de referencia de otros sujetos.



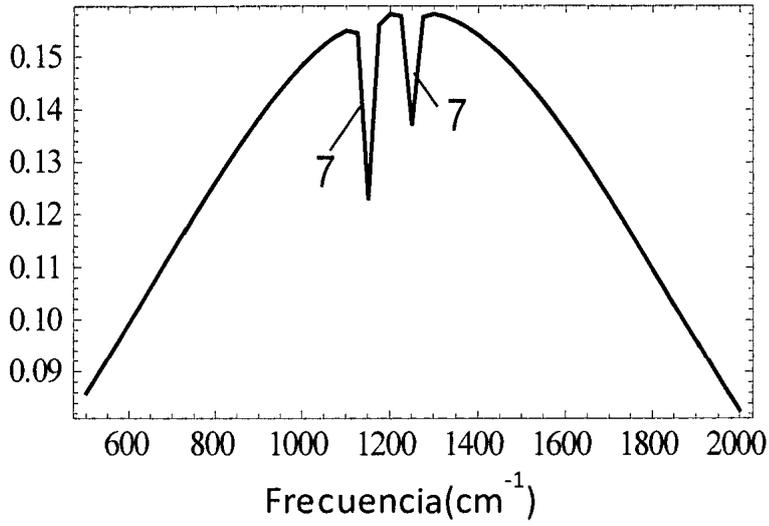


FIG. 4

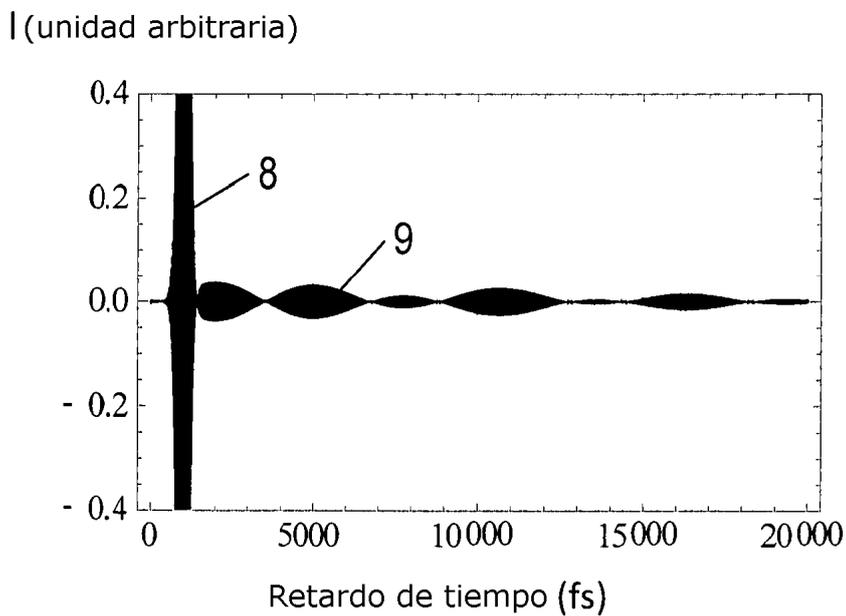
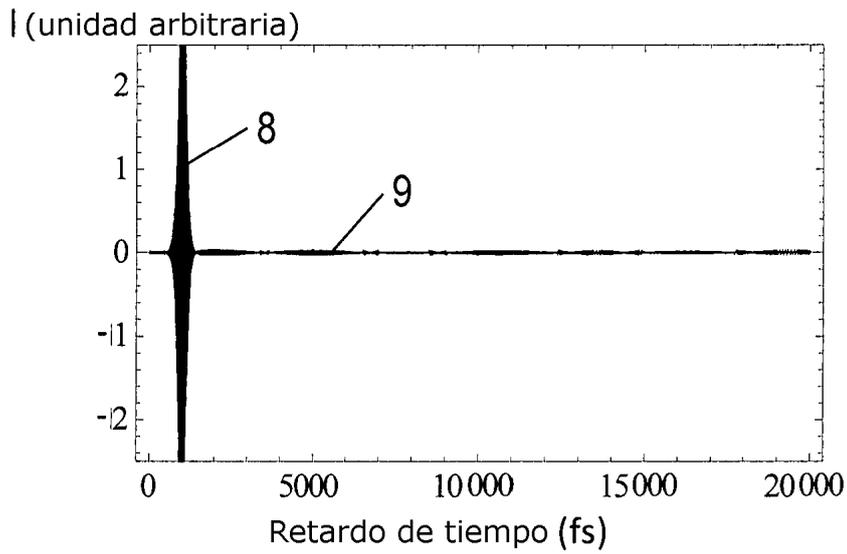


FIG. 5