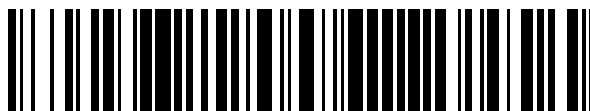


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 787 887**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/17** (2006.01)

**A61B 5/145** (2006.01)

**A61B 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2017** **E 17198860 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020** **EP 3477278**

54 Título: **Procedimiento fotoacústico con una luz de medición que presenta una gama de longitud de onda predeterminada para determinar propiedades de una muestra no homogénea**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.10.2020**

73 Titular/es:  
**HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN (100.0%)**  
**Unter den Linden 6**  
**10099 Berlin, DE**

72 Inventor/es:  
**SCHLESINGER, RAPHAEL;**  
**KISCHKAT, JAN-FERENC y**  
**VON LILIENFELD-TOAL, HERMANN**

74 Agente/Representante:  
**INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E**  
**INVENCIONES, SLP**

ES 2 787 887 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

Procedimiento fotoacústico con una luz de medición que presenta una gama de longitud de onda predeterminada para determinar propiedades de una muestra no homogénea

5 La invención se refiere a un procedimiento fotoacústico para determinar propiedades de una muestra no homogénea con resolución de profundidad de micrómetros. En particular la invención se refiere a un procedimiento fotoacústico, en el que se irradia radiación electromagnética en una superficie de una muestra y se absorbe mediante la muestra generando una onda de presión, en donde la onda de presión se propaga hacia el área de medición y se detecta como una presión transitoria.

La invención se refiere también a un procedimiento fotoacústico para la determinación no invasiva de propiedades de un tejido vivo, por ejemplo piel viva.

15 Los sensores y aparatos de medición fotoacústica son medios conocidos para detectar y cuantificar sustancias mediante su absorción de luz característica. Para examinar una muestra de una sustancia pedida la iluminación de la muestra se realiza con una luz de medición, que presenta una o varias longitudes de onda, que se conocen previamente como longitudes de onda de absorción características de la sustancia. La luz de medición se irradia a pulsos en la muestra y allí se absorbe localmente con distinta intensidad dependiendo de la distribución de la sustancia. La energía aportada con la absorción de luz provoca un calentamiento y una expansión termomecánica de la muestra. Ambos provocan procesos de relajación, que distribuyen la energía aportada de manera no homogénea a través de la muestra, para restablecer el equilibrio. Esto sucede a través de difusión de calor y la propagación de ondas de presión - ondas sonoras - mediante la muestra, y otras hacia la superficie de muestra.

25 En procedimientos fotoacústicos comunes las ondas de presión se detectan como presión transitoria en la superficie de muestra mediante transductores acústicos piezoeléctricos. Dichos transductores acústicos, en lo sucesivo también detectores, pueden alcanzar altas resoluciones de tiempo con una electrónica de medición correspondiente de habitualmente algunas decenas de nanosegundos y por lo tanto son adecuados para diferenciar tiempos de propagación de ondas de presión a partir de distintas profundidades de la muestra. Si la longitud de onda de la luz de medición se selecciona de modo que principalmente se absorbe mediante sustancias o estructuras localizadas (por ejemplo hemoglobina en vasos sanguíneos) y se detecta las presiones transitorias en una multitud de lugares sobre las muestras, entonces pueden determinarse los lugares de la absorción y representarse como imagen 3D. De este modo pueden generarse representaciones por ejemplo de plexos vasculares *in vivo*. Debido a la mayor velocidad del sonido en muestras sólidas o líquidas, por ejemplo 1,5 µm/ns en agua, la fotoacústica convencional sin embargo es adecuada solo con límites para el examen de una muestra, cuando esta es irradiada con una luz de medición, que ha absorbido completamente la muestra ya en una profundidad de algunas decenas de micrómetros por debajo de la superficie de muestra. Bajo estas condiciones la señal de presión debería detectarse en la misma área de medición en la superficie, en la que se ha irradiado la luz de medición previamente, dado que prácticamente solo puede tener lugar la absorción directamente por debajo del área de medición. Todos los tiempos de propagación de las señales de presión que inciden aproximadamente al mismo tiempo en el detector son debidamente cortas. La resolución de tiempo limitada del detector no permite por regla general ninguna resolución en micrómetros para las profundidades de muestra, de las que proceden las señales de presión.

45 En la publicación de Fei Gao et al., "Single laser pulse generated dual photoacoustic signals for differential contrast photoacoustic imaging", Scientific Reports | 7: 626 | DOI:10.1038/s41598-017-00725-4 1, (2017) se propone el uso de pulsos de luz de medición largos para activar con cada pulso dos señales de presión separadas en el tiempo, concretamente una al inicio y al final respectivamente de un pulso de luz de medición. A este respecto, ambas señales de presión que pertenecen a un pulso de luz de medición no están correlacionadas linealmente. Presentan una distancia de tiempo fija y polaridad opuesta, pero pueden poseer diferentes amplitudes dependiendo de la duración de pulsos de luz de medición y del calentamiento de la muestra durante la duración de pulso larga. Desde la diferencia de las señales de presión correlacionadas pueden obtenerse en este sentido conocimientos sobre la densidad de energía depositada en la muestra. El procedimiento de Fei Gao et al. va a denominarse en lo sucesivo foto acústica diferencial (DPA).

55 Por ejemplo del documento de Kottmann et al., "Glucose sensing in human epidermis using midinfrared photoacoustic detection", Vol. 3, núm. 4 / BIOMEDICAL OPTICS EXPRESS, páginas 667 y siguientes, se desprende la siguiente tarea de medición: la determinación del contenido de azúcar en sangre *in vivo* mediante la medición de la absorción de luz de medición MIR con una longitud de onda en 10 µm en el "fluido intersticial" (ISF) por debajo del estrato córneo (SC) de la piel viva de por ejemplo 20 µm de grosor. La luz de medición se absorbe a este respecto según la fuente dentro de un intervalo de profundidad de hasta 100 µm por debajo de la superficie de la piel, y la absorción genera una señal de presión. Sin embargo, el SC por sí mismo no suministra ninguna información relevante sobre la concentración de azúcar en sangre. Primero la absorción en capas situadas a más profundidad, en particular en el estrato espinoso, es adecuada para derivar el nivel de glucosa. El determinar tales propiedades variables de una muestra no homogénea condicionan la consecución de una resolución de profundidad de micrómetros en una profundidad de medición de únicamente pocas decenas de micrómetros directamente por debajo de la superficie.

Ante este fondo existe un interés por un nuevo procedimiento de medición fotoacústico, que puede examinar muestras no homogéneas con resolución de profundidad de micrómetros, precisamente entonces cuando la luz de medición procede de una zona espectral que se absorbe intensamente mediante la muestra no homogénea. Según el conocimiento de los inventores la fotoacústica diferencial para esta cuestión todavía no se planteó como una posibilidad de solución.

La invención se plantea el objetivo de proponer un procedimiento fotoacústico con una luz de medición que presenta una gama de longitud de onda predeterminada para determinar propiedades de una muestra no homogénea, en donde la muestra para la gama de longitud de onda predeterminada presenta una longitud de absorción media desde el intervalo de 1 - 100 micrómetros.

El objetivo se resuelve mediante un procedimiento fotoacústico con una luz de medición que presenta una gama de longitud de onda predeterminada para determinar propiedades de una muestra no homogénea, presentando la muestra para la gama de longitud de onda predeterminada una longitud de absorción media  $\mu$  desde el intervalo de 1 - 100 micrómetros, que comprende las etapas:

a) irradiación de al menos un pulso de luz de medición con duración de pulso predeterminada e intensidad predeterminada en un área de medición del área  $F$  con  $\sqrt{F} \gg \mu$  en la superficie de la muestra no homogénea;

b) detección de al menos una presión transitoria en el área de medición, en donde la presión transitoria se forma mediante absorción del al menos un pulso de luz de medición en la muestra no homogénea generando una onda de presión que se propaga hacia el área de medición;

c) cálculo de un valor para la densidad de energía absorbida durante la duración de pulso de la muestra a partir de la evolución de la al menos una presión transitoria al inicio y al final del al menos un pulso de luz de medición; caracterizado por

d) repetición de las etapas a) a c) para ángulos de incidencia de la luz de medición distintos unos de otros con respecto a la normal del área de medición, en donde los valores de densidad de energía determinados en c) se indexan en cada caso con el ángulo de incidencia;

e) modelado de la muestra no homogénea como pila de capas, en donde a cada capa se asocian al menos un grosor de capa y un coeficiente de absorción, siendo al menos un coeficiente de absorción de una capa un parámetro de ajuste;

f) ejecución de un proceso de ajuste para los parámetros de ajuste de la pila de capa, en donde mediante variación de los parámetros de ajuste la distribución de los valores de densidad de energía indexados con el ángulo de incidencia varía en contribuciones de las capas individuales, hasta que se cumple un criterio de consistencia predeterminado;

g) lectura de los parámetros de ajuste ajustados como valores al menos para el coeficiente de absorción con resolución de profundidad de la muestra no homogénea.

Las reivindicaciones dependientes indican configuraciones ventajosas del procedimiento.

El procedimiento fotoacústico de acuerdo con la invención analiza la evolución temporal de presiones transitorias detectadas, pero renuncia a este respecto sin embargo a cualquier asociación de tiempos de propagación acústica en profundidades de muestra. Más bien se registran estructuras prominentes de la presión transitoria, que se muestran al inicio y al final de un pulso de luz de medición y se denominan en este caso pulsos de presión, separadas unas de otras en el tiempo y por ejemplo y preferentemente se integran en el tiempo. La diferencia de las integrales de pulso de presión,  $\Delta p$ , de una presión transitoria individual es el resultado de una respuesta de expansión diferente a la luz de medición al inicio y al final del pulso largo de luz de medición. Por ejemplo por regla general se realiza una expansión de la muestra, cuando el pulso de luz de medición llega a la muestra, y se realiza una contracción, tan pronto como termina el pulso de luz de medición, es decir, se desconecta la iluminación. Durante la duración del pulso de luz de medición se deposita energía electromagnética en la muestra, lo que lleva a un calentamiento local. El coeficiente de Grüneisen dependiente de la temperatura,  $\Gamma(T)$ , del volumen iluminado de la muestra es un parámetro determinante para la respuesta fotoacústica y depende en un primer acercamiento linealmente de la variación de temperatura:

$$\Gamma(T) = \Gamma_0 + \Gamma' \Delta T \quad (1)$$

Al mismo tiempo el aumento de temperatura se determina en el volumen iluminado a consecuencia de la radiación absorbida mediante la capacidad térmica  $C_p$  de la muestra. Si estos coeficientes de material para la muestra examinada se conocen o a través de estos se realizan suposiciones razonables a partir del conocimiento de la muestra, entonces la magnitud de medición directa  $\Delta p$  puede transformarse en la energía depositada,  $\Delta E$ , con respecto al

volumen iluminado,  $V$ , es decir, en la densidad de energía absorbida:

$$\Delta p = \eta I_0 \delta t \times \frac{\Gamma'}{C_p} \times \frac{\Delta E}{V} \quad (2)$$

- 5 En la ecuación (2)  $I_0$  designa la intensidad de luz de medición irradiada en la muestra (en unidades potencia/área),  $\delta t$  la duración de subida o desactivación del pulso de luz de medición (compárese también figura 1) y  $\eta$  el coeficiente de transformación de calor en presión en analogía a Fei Gao et al. (2017), dividido por la velocidad del sonido y el tiempo de integración dependiente del detector de la presión transitoria.
- 10 La idea fundamental de la invención se basa ahora en el conocimiento de que  $A_p$  muestra una clara dependencia del ángulo de incidencia,  $\theta$ , de la luz de medición frente a la normal del área de medición, precisamente porque la luz de medición de acuerdo con la condición se absorbe intensamente ya a cortos tramos en la muestra. En caso de ángulos grandes de capas de la muestra situadas a más profundidad ya no se consigue lo que puede conseguirse todavía en caso de una incidencia perpendicular ( $\theta=0^\circ$ ). Por consiguiente, una secuencia de mediciones de  $A_p(\theta)$  formando
- 15 ángulos  $\theta$  distintos unos de otros - de manera equivalente: distintos en cada caso por parejas representa un conjunto de mediciones linealmente independientes de la muestra, a partir del cual puede extraerse también una información sobre la resolución de profundidad de la muestra - y en concreto entonces obligatoriamente en la escala de micrómetros.
- 20 El procedimiento de acuerdo con la invención se asemeja algo a una tomografía, por ejemplo la tomografía computarizada de rayos X, en la que un objeto es irradiado por rayos X bajo distintos ángulos y se reproduce, y de la visión de conjunto de las imágenes obtenidas se reconstruye según esto un modelo de ordenador.
- La invención debe llevar a cabo igualmente una reconstrucción de la muestra no homogénea, pudiendo hacer estar
- 25 reconstrucción la suposición claramente simplista de que aparecen modificaciones de estructura solo a lo largo del eje de profundidad. La muestra no homogénea puede modelarse entonces como una pila de capas unidimensional que comprende un número  $M$  de capas, siendo  $M$  un número natural. De acuerdo con la invención a cada capa (con índice  $i = 1, \dots, M$ ) del modelo se asocia al menos un grosor de capa,  $d_i$ , y un coeficiente de absorción,  $\alpha_i$  como propiedad, en donde al menos un coeficiente de absorción de una capa está previsto como parámetro de ajuste.
- 30 Las únicas magnitudes que dependen de ángulos directamente en el lado derecho de la ecuación (2) son la energía depositada  $AE(\theta)$  y el volumen iluminado  $V(\theta) = F \times \mu(\theta)$ , señalándose con  $F$  el área del área de medición predeterminada, sobre la que se irradia la luz de medición, y con  $\mu(\theta)$  la profundidad de penetración de la radiación promediada a través de la muestra. En realidad en perpendicular al eje de profundidad, es decir, paralelo a la superficie
- 35 de muestra, se realiza ya un promediado implícito de la respuesta fotoacústica de la muestra, porque las dimensiones del área de medición, por ejemplo longitudes de borde o diámetros en cada caso proporcionalmente a  $\sqrt{F}$ , están configuradas muy grandes con respecto a  $\mu$ .
- El que la zona de muestra iluminada realmente debido a la refracción de la luz de medición en caso de una incidencia oblicua también puede presentar una zona marginal, que no está situada por debajo del área de medición, no se tiene
- 40 en cuenta en este caso para simplificar.
- La distribución de la densidad de energía depositada en la muestra depende esencialmente de las longitudes de trayecto que recorre la luz de medición y en qué capas - bajo la acción del coeficiente de absorción respectivo. Por
- 45 ejemplo en caso de un ángulo de incidencia cercano a  $90^\circ$  - de incidencia rasante - es posible que la luz de medición se propague completamente en la capa superior de la muestra y se absorba. Si el ángulo se reduce, entonces la profundidad de penetración varía y la luz de medición puede absorberse también en una segunda o incluso en una tercera capa etc.
- 50 La modificación del ángulo de incidencia equivale efectivamente a la extensión simultánea de todos los grosores de capa del modelo de la muestra. Dicho de otro modo, para el modelo de capa calcular la intensidad de luz  $I(x)$  con  $x$  como eje de profundidad a partir de los parámetros de modelo y para los distintos ángulos  $\theta$  es suficiente sustituir a este respecto simplemente todos los  $d_i$  por  $d_i/\cos(\theta)$ . Como aclaración: Para cada variación de los grosores de capa  $d_i$  o del ángulo  $\theta$  es necesario un nuevo cálculo de la intensidad  $I(x)$ , dado que la intensidad - y con ello al mismo tiempo
- 55 la respuesta de presión mensurable - también se modifica en caso de una mera variación del ángulo de incidencia.
- Con ayuda de las intensidades de luz modeladas puede distribuirse la densidad de energía absorbida de acuerdo con la invención en las capas individuales de la pila de capa, dicho de otro modo, determinar las contribuciones de las capas individuales a la densidad de energía medida. Para ello sirve la siguiente reflexión:
- 60 el incremento de la energía depositada a lo largo de un intervalo de profundidad,  $\Delta x$ , corresponde a la disminución de la potencia irradiada a través del mismo intervalo multiplicada por la duración del pulso de luz de medición,  $\Delta t$  (compárese figura 1). La intensidad de luz de medición  $I(x)$  es la densidad de área de potencia dependiente de la profundidad, y se cumple aproximadamente

$$\frac{\Delta E(x)}{\Delta x} \cong -F \times \Delta t \times \frac{dI(x)}{dx} \quad (3)$$

5 en donde en el lado derecho para la simplificación se pasó de cociente de diferencia a cociente diferencial. La energía absorbida promediada a través de toda la profundidad de penetración  $\mu$  se obtiene mediante una integración ponderada

$$\frac{\Delta E}{\mu} = \int_0^\mu \frac{\Delta E(x)}{\Delta x} \times \rho(x) dx \quad (4)$$

con pesos

10

$$\rho(x) = \frac{I(x)}{\int_0^\infty I(x') dx'} \quad (5)$$

La función ponderal de (5) es casi cero para  $x > \mu$ , es decir el límite de integración superior en (4) puede colocarse aproximadamente en  $\infty$ . Si se aplica (3) y (5) en (4) y se divide por el área F, se arroja

15

$$\frac{\Delta E}{V} = \frac{-\Delta t}{\int_0^\infty I(x') dx'} \times \int_0^\infty \frac{dI(x)}{dx} \times I(x) dx \quad (6)$$

$$\frac{\Delta E}{V} = \frac{\Delta t}{\int_0^\infty I(x') dx'} \times \sum_{i=1}^M \int_{d_{i-1}}^{d_i} \alpha_i \times I^2(x) dx \quad (7)$$

En la transición de (6) a (7) la muestra se introduce como pila de capas con  $M$  capas de los grosores de capa  $d_i$ ,  $i = 1, \dots, M$  con la fijación  $d_0 = 0$  así como los coeficientes de absorción  $\alpha_i$ ,  $i = 1, \dots, M$ . En las capas individuales la intensidad sigue a la evolución exponencial conocida, y se cumple en cada caso  $\frac{dI(x)}{dx} = \alpha_i \times I(x)$ .

20

La dependencia del ángulo de incidencia  $\theta$  se suprime en las ecuaciones anteriores. Si estas se aceptan ahora explícitamente, como resultado se obtiene:

$$\frac{\Delta E(\theta)}{F\mu(\theta)} = \frac{\Delta t}{\int_0^\infty I(\theta, x') dx'} \times \sum_{i=1}^M \int_{d_{i-1}/\cos\theta}^{d_i/\cos\theta} \alpha_i \times I^2(\theta, x) dx \quad (8)$$

25

ecuación (8) es un sistema de ecuación de determinación para parámetros, que fijan la evolución de la intensidad  $I(x)$  en la pila de capas, cuando adicionalmente  $I_0$  se conoce previamente. El lado izquierdo de (8) representa valores medidos a partir de las presiones transitorias evaluadas según la ecuación (2). Pueden emplearse valores de medición para un número fundamentalmente discrecional  $N$  de ángulos de incidencia  $\theta$  para llenar el sistema de ecuación (8) con ecuaciones linealmente independientes.

30

Superficialmente el usuario de la invención decide cómo quiere diseñar el modelo de la muestra no homogénea y qué parámetros selecciona como parámetros de ajuste desconocidos a priori. Por ejemplo los grosores de capa de una muestra biológica podrían haberse medido previamente con una tomografía de coherencia óptica. Entonces la  $d_i$ ,  $i = 1, \dots, M$  se conocerían y ningún parámetro de ajuste más. Normalmente puede partirse del hecho de que a cada capa de la pila de capa se le asigne al menos un parámetro de ajuste desconocido. De acuerdo con la invención al menos a una capa se le atribuye un coeficiente de absorción como parámetros de ajuste.

35

Preferentemente el número  $N$  del ángulo de incidencia considerado en la ecuación (8) debería corresponder al número de los parámetros de ajuste desconocidos en la ecuación (8), que pueden variarse independientemente unos de otros. De acuerdo con la invención deben emplearse al menos dos ángulo de incidencia distintos el uno del otro.

40

La invención comprende también por lo demás comprobar la suposición realizada en la formulación de la ecuación (2) a través del cociente  $\frac{\Gamma_i}{C_p}$  y dado el caso mejorar todavía más. De hecho, la respuesta de presión medida de la pila de capas es la suma de las respuestas de presión,  $\Delta p_i$ , de las capas individuales, y a cada capa puede asociarse un cociente propio  $\frac{\Gamma_i}{C_p}$ , que es proporcional al  $A_{p_i}$ . Esto permite la aplicación de un bucle de autoconsistencia, por ejemplo

45

como sigue:

- a) se mide N respuestas de presión para N ángulos de incidencia
- 5 b) se calculan N valores para densidades de energía absorbidas según la ecuación (2)
- c) se inserta densidades de energía calculadas en la ecuación (8) y el sistema de ecuación (normalmente numérico) se resuelve para un modelo con M capas
- 10 d) se asocia a las M capas cocientes  $\frac{\Gamma'_{i,i}}{c_p}$ , y se calcula un valor promedio nuevo  $\frac{\Gamma'}{c_p}$
- e) se repiten las etapas b) a d), hasta que los parámetros del modelo ya no varían

15 Habitualmente se rompen filtros de autoconsistencia, cuando las variaciones de los parámetros entre dos recorridos consecutivos caen bajo límites predeterminados. Fundamentalmente debe facilitarse siempre al usuario del procedimiento formular concretamente un criterio de consistencia, dado que solo él conoce la naturaleza exacta de la muestra y sus requisitos de exactitud en los parámetros que van a determinarse.

20 Para una aclaración adicional y para la explicación de configuraciones sirven las siguientes figuras. A este respecto muestra:

figura 1 un gráfico de la evolución de tiempo típica de un pulso de luz de medición;

25 figura 2 un esbozo de un modelo de capa de la muestra con los parámetros, que se asocian a las capas individuales, y tres evoluciones de la intensidad para diferentes ángulos de incidencia;

30 En la figura 1 se representa la evolución de tiempo de un pulso de luz de medición a modo de ejemplo. La intensidad sube durante un breve periodo  $\delta t$  de 0 a su valor máximo  $I_0$ , permanece allí durante un periodo de tiempo  $\Delta t \gg \delta t$ , y recae a continuación durante  $\delta t$  de nuevo en 0. Los pulsos de presión durante la expansión y contracción de la muestra se activan en cada caso durante la duración de ascensión- o desactivación de los pulsos de luz de medición y durante los intervalos de tiempo de la longitud  $\delta t$  generan las desviaciones hacia la presión transitoria mensurable. Durante la duración de pulso  $\Delta t$  tiene lugar la deposición de energía y calentamiento de la muestra. En esta fase las presiones transitorias no muestran ninguna estructura reseñable. Preferentemente la duración de pulso asciende entre 100 y 1000 nanosegundos, de manera especialmente preferente entre 200 y 600 nanosegundos. Por ello se garantiza que el intervalo de los dos pulsos de presión sea tan grande que el primero ya puede haberse registrado - en cualquier caso la zona de calentamiento de la muestra se ha abandonado hace mucho tiempo- antes de que se active el segundo. Al mismo tiempo la duración de pulso todavía es demasiado pequeña, para permitir entre los momentos de activación de los pulsos de presión una evacuación significativa de la energía depositada mediante difusión de calor.

40 La luz de medición se irradia sobre un área de medición en la superficie de la muestra. El usuario es responsable de la definición exacta del área de medición en cuanto a la posición, forma y contenido de área. Debido a la profundidad de penetración reducida supuesta de la luz de medición en la muestra debe contarse con la respuesta de presión más intensa a la excitación fotoacústica directamente en el área de medición.

45 Por ejemplo y preferentemente la radiación de la luz de medición puede realizarse mediante un prisma de contacto, que es transparente para la luz de medición. El prisma de contacto presenta una superficie de contacto de muestra, a la que se dirige la luz de medición, y que se encuentra en contacto mecánico con la muestra. Los pulsos de presión, que se generan mediante la luz de medición que penetra en la muestra, se propagan hasta la superficie de contacto de muestra y allí pueden medirse, por ejemplo mediante un transductor acústico (transductor piezoeléctrico), que está dispuesto sobre una superficie de detección del prisma de contacto enfrentada a la superficie de contacto de muestra. Los pulsos de presión deben recorrer para ello un recorrido adicional en el interior del prisma de contacto y llegan con retardo de tiempo, lo que sin embargo es insignificante para la valoración según el procedimiento de acuerdo con la invención. El fin del trayecto adicional consiste solamente en impedir la incidencia de la luz de medición en la muestra no mediante el transductor acústico. En este sentido se observa también la medición de un prisma de contacto como registro de la presión transitoria en el área de medición - en este caso idéntica a la superficie de contacto de muestra.

55 Un modelo de la muestra no homogénea como pila de capas se representa en la figura 2. A las capas individuales pueden asociarse grosores de capa, coeficientes de absorción, coeficientes de Grüneisen y capacidades térmicas. Para la valoración de acuerdo con la invención se requiere entre tanto solo la subida de temperatura del coeficiente de Grüneisen en relación con la capacidad térmica, es decir los cocientes de ambos. En este sentido con el procedimiento pueden emplearse también solo los cocientes como parámetros de ajuste, como ya se ha expuesto, por ejemplo en la realización de cálculos de bucle de autoconsistencia. La introducción de cocientes a partir de la subida de temperatura del coeficiente de Grüneisen y de la capacidad térmica como parámetros de ajuste para las capas individuales de la pila de capa es una configuración ventajosa del procedimiento.

65

Qué parámetros se conocen y cuáles deben ajustarse, depende fundamentalmente de la naturaleza de la muestra y del conocimiento previo del usuario. Concretamente para muestras biológicas vivas, en particular para la determinación de glucosa en la piel viva, sin embargo el coeficiente de absorción para la luz de medición es especialmente interesante y habitualmente variable en función de procesos psicológicos y por lo tanto no se conoce.

5 La invención se dirige por tanto a determinar al menos el coeficiente de absorción con resolución de profundidad,  $\alpha(x)$ , de la muestra no homogénea de presiones transitorias registradas dependiendo del ángulo. Esto se realiza aproximadamente mediante identificación de  $\alpha(x)$  con parámetros constantes por grupos  $\alpha_i$ ,  $i = 1, \dots, M$  de un modelo de pila de capas de la muestra, en donde al menos un  $\alpha_i$  a priori se desconoce y se determina mediante un proceso de ajuste. Por regla general todos los  $\alpha_i$  son desconocidos y sirven como parámetros de ajuste del proceso de ajuste.

10 Los grosores de capa en la figura 2 deben estar seleccionados preferentemente del intervalo de 500 nanómetros a 100 micrómetros. Las capas esencialmente más delgadas que 500 nanómetros apenas mostrarán absorción lineal suficiente y por consiguiente ninguna deposición de energía reseñable. Es más conveniente modelar tales capas delgadas asociadas con una capa vecina más gruesa. Sin embargo el procedimiento de acuerdo con la invención comprende expresamente también el caso del modelo casi trivial con solo exactamente una capa. Pues también en este caso se propone al menos dos mediciones de la presión transitoria, llevar a cabo por consiguiente dos mediciones de la densidad de energía depositada, bajo al menos dos ángulos de incidencia distintos, para determinar los parámetros de capa. El proceso de ajuste de acuerdo con la invención para los parámetros de ajuste puede omitirse a este respecto entonces naturalmente de manera sencilla.

20 Mediante las tres curvas de intensidad en la figura 2 la idea de la invención puede aclararse de nuevo con otras palabras. La curva superior señala por ejemplo la evolución de la intensidad de la luz de medición en la muestra, cuando la luz de medición incide perpendicular al área de medición ( $\theta = 0^\circ$ ). La luz de medición penetra al máximo y pierde en las capas individuales la mínima potencia, porque atraviesa cada una de las capas en el menor trayecto. La segunda curva desde arriba representa la intensidad en caso de un ángulo de incidencia  $\theta = \varphi > 0^\circ$  y la curva de más abajo describe la evolución de la intensidad para el ángulo de incidencia  $\theta = \varphi' > \varphi$ . Cada una de las capas individuales es atravesada con ángulo de incidencia creciente en un trayecto más largo, de modo que las capas durante la duración de pulso del pulso de luz de medición acumulan más densidad de energía, cuanto más cerca se encuentran en el área de medición. Las capas más profundas contribuyen cada vez menos a ángulos de incidencia grandes hasta llegar a nada. En la visión de conjunto de las señales de presión dependientes del ángulo puede deducirse la sucesión y las propiedades de las capas.

25 El dato de intensidades intermedias  $I_1, I_2, I_3, \dots$  en la curva central debe indicar que las integrales en la ecuación (8) pueden resolverse de manera analítica y a este respecto llevan a precisamente estos valores intermedios. Puede ser útil introducir estos valores intermedios como parámetros de ajuste adicionales y resolver el sistema de ecuación con un número mayor de ángulos de incidencia. No obstante, los valores intermedios dependen de los coeficientes de absorción y grosores de las capas directamente de modo que entonces ha de realizarse también un control de consistencia adicional.

40 Una posibilidad ventajosa, de llevar a cabo el proceso de ajuste de manera rápida y eficiente también para modelos de capa con una multitud de capas individuales e incluso varios parámetros de ajuste por cada capa, se ofrece mediante un uso adecuado de los presiones transitorias medidos dependientes del ángulo o densidades de energía absorbida. Cuando los valores de medición se ordenan concretamente según ángulos de incidencia e inicialmente solo pueden entrar cantidades parciales de los valores de medición para ángulos de incidencia  $\theta > \theta_0 \gg 0^\circ$  en el sistema de ecuación (8) - es decir no evalúa el sistema completo -, entonces puede llegarse ya a resultados fiables para los parámetros de ajuste de la(s) capa(s) más externas. Los valores de medición no contienen precisamente de hecho ninguna contribución de capas más profundas, es decir, este modo de proceder no garantiza ninguna aproximación, sino que comprende únicamente una suposición sobre la profundidad de penetración de la luz de medición bajo los ángulos de incidencia seleccionados.

50 Si la suposición aproximada fuera errónea, es decir, si debiera preverse para la cantidad parcial de valores de medición seleccionada demasiadas pocas capas en el modelo, entonces se obtiene inicialmente parámetros de ajuste erróneos, que en una adición posterior de más capas y empleando una cantidad parcial mayor de los valores de medición se mueven de nuevo en la dirección de valores concretos. En el peor de los casos se pierde tiempo de cálculo, pero no se obtiene ningún resultado erróneo.

60 Sin embargo si se hacen suposiciones correctas, puede acelerarse considerablemente la realización del proceso de ajuste, porque preferentemente los parámetros de ajuste de la pila de capa para capas se filtran sucesivamente partiendo de la capa más externa, en donde el cumplimiento del criterio de consistencia predeterminado se comprueba repetidamente comenzando con el ángulo de incidencia mayor de la luz de medición para ángulos de incidencia menores sucesivamente. Al fijarse paulatinamente los parámetros de las capas externas inicialmente y las situadas a más profundidad, puede ahorrarse esfuerzo de cálculo en las etapas siguientes del procedimiento de ajuste, sobre todo cuando por cada capa quiere determinarse varios tamaños de material como parámetros de ajuste.

65 En este caso cabe mencionar que pueden hacerse suposiciones correctas en el sentido de lo dicho anteriormente en particular cuando debe resolverse una tarea de medición que se repite en la misma muestra siempre, donde a partir

de mediciones previas ya se dispone de una historia fundada de las posibles variaciones de los parámetros de ajuste. Esto es de manera muy especial el caso en mediciones de glucosa repetidas en un probando.

5 Como ya se ha expuesto, el procedimiento de acuerdo con la invención es muy adecuado para la medición de muestras biológicas vivas, en particular de muestras de piel vivas. Una meta es la determinación de la glucosa en sangre no invasiva *in vivo* en una parte del cuerpo humano. Para el objetivo es especialmente adecuada la selección de longitudes de onda de infrarrojo medio (MIR) longitudes de onda para la luz de medición. Preferentemente la luz de medición presenta longitudes de onda del intervalo de 1 a 20 micrómetros, de manera especialmente preferente de 6 a 12 micrómetros.

10 Es evidente que la longitud de onda de la luz de medición puede modificarse durante el examen de una única muestra. Por ejemplo para una primera longitud de onda puede recorrerse una secuencia de ángulos de incidencia y registrar primeros presiones transitorias procedentes de la muestra, para emplear después para una segunda longitud de onda la misma secuencia de ángulos de incidencia para la medición de una segunda secuencia de presión transitoria. Este proceso es útil en particular para la determinación de acuerdo con la invención de coeficientes de absorción, dado que estos mismos dependen habitualmente de la longitud de onda. Precisamente mediante la dependencia de longitud de onda de la absorción se realiza la identificación espectral de las sustancias buscadas.

20 Sin embargo una configuración ventajosa de la invención se ve en que la longitud de onda de la luz de medición para predeterminados ángulos de incidencia varía a lo largo de un intervalo que depende del ángulo de incidencia. También en este caso la ventaja principal reside en una aceleración del examen. Cuando concretamente en el ejemplo de la determinación de la glucosa en la piel viva se miden las presiones transitorias para ángulos de incidencia grandes- de incidencia rasante - y de estos preferentemente valores de los coeficientes de absorción dependientes de la longitud de onda para capas epidérmicas, en particular para el estrato córneo y el estrato espinoso, entonces estos valores de medición inicialmente son relevantes solo para el estrato córneo externo. En este sentido sin embargo, a partir de exámenes previos se sabe que la glucosa no es componente esencial del estrato córneo. Por lo tanto no es necesario irradiar una multitud de longitudes de onda, que se absorben por la glucosa con una intensidad especial, para verificar en todo caso coeficientes de absorción que pueden verificarse solo débilmente en la capa más externa. Solo cuando la luz de medición puede alcanzar también el estrato espinoso, son útiles longitudes de onda sensibles a la glucosa e importantes para determinar cuantitativamente la absorción, para que pueda determinarse una concentración de glucosa realista. Por lo tanto es suficiente conectar tales longitudes de onda solo en caso de ángulos de incidencia de la luz de medición más pequeños.

35 Como observación final cabe indicar que la modificación del ángulo de incidencia, en la iluminación del área de medición con luz de medición puede tener el efecto secundario indeseado de que la intensidad irradiada en realidad en la muestra varíe porque se refleja un porcentaje de luz igualmente variable de la muestra. La intensidad reflejada puede medirse no obstante, por ejemplo directamente con un fotodetector. Por ello puede determinarse sin más un factor de corrección numérico para las intensidades en las ecuaciones (2) y (8). Sin embargo es ventajoso en su lugar mejor mantener constante la intensidad de luz de medición que entra realmente, porque por lo demás ha de contarse con un aumento del ruido en las presiones transitorias medidas. Para este fin se propone irradiar la luz de medición mediante un equipo de debilitamiento que puede conectarse electrónicamente, por ejemplo irradiarse de manera polarizada linealmente mediante un solenoide y un polarizado, hacia el área de medición. Mediante la selección de la alimentación de corriente de la bobina el plano de polarización de la luz de medición puede girarse de modo que opcionalmente llega más o menos luz de medición al área de medición. Con ello puede realizarse una regulación posterior automatizable de la intensidad de luz de medición, cuando por ejemplo dicho fotodetector mide continuamente mide la intensidad reflejada y transmite a una unidad de control para la corriente de bobina.



## REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento fotoacústico con una luz de medición que presenta una gama de longitud de onda predeterminada para determinar propiedades de una muestra no homogénea, presentando la muestra para la gama de longitud de onda predeterminada una longitud de absorción media  $\mu$  desde el intervalo de 1 - 100 micrómetros, que comprende las etapas:
- 10 a) irradiación de al menos un pulso de luz de medición con duración de pulso predeterminada e intensidad predeterminada a un área de medición del área  $F$  con  $\sqrt{F} \gg \mu$  en la superficie de la muestra no homogénea;
- 10 b) detección de al menos una presión transitoria en el área de medición, en donde la presión transitoria se forma mediante absorción del al menos un pulso de luz de medición en la muestra no homogénea generando una onda de presión que se propaga hacia el área de medición;
- 15 c) cálculo de un valor para la densidad de energía absorbida durante la duración de pulso de la muestra a partir de la evolución de la al menos una presión transitoria al inicio y al final del al menos un pulso de luz de medición;
- 15 **caracterizado por**
- d) repetición de las etapas a) a c) para ángulos de incidencia de la luz de medición distintos unos de otros con respecto a la normal del área de medición, en donde los valores de densidad de energía determinados en c) se indexan en cada caso con el ángulo de incidencia;
- 20 e) modelado de la muestra no homogénea como pila de capas, en donde a cada capa se asocian al menos un grosor de capa y un coeficiente de absorción, siendo al menos un coeficiente de absorción de una capa un parámetro de ajuste;
- 20 f) ejecución de un proceso de ajuste para los parámetros de ajuste de la pila de capa, en donde mediante variación de los parámetros de ajuste la distribución de los valores de densidad de energía indexados con el ángulo de incidencia varía en contribuciones de las capas individuales, hasta que se cumple un criterio de consistencia predeterminado;
- 25 g) lectura de los parámetros de ajuste ajustados como valores al menos para el coeficiente de absorción con resolución de profundidad de la muestra no homogénea.
- 30 2. Procedimiento fotoacústico según la reivindicación 1, **caracterizado por que** en la etapa f) a cada capa se asocian además un cociente a partir de la derivación de la temperatura del coeficiente de Grüneisen y de la capacidad térmica del material de capa como parámetro de ajuste.
- 35 3. Procedimiento fotoacústico según una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** los parámetros de ajuste de la pila de capa para capas se ajustan sucesivamente partiendo de la capa más externa, en donde el cumplimiento del criterio de consistencia predeterminado se comprueba repetidamente comenzando con el ángulo de incidencia mayor de la luz de medición para ángulos de incidencia menores sucesivamente.
- 40 4. Procedimiento fotoacústico según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la duración de pulso de los pulsos de luz de medición se predetermina a un valor del intervalo de 100 a 1000 nanosegundos, preferentemente del intervalo de 200 a 600 nanosegundos.
5. Procedimiento fotoacústico según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la pila de capas presenta capas individuales con grosores de capa del intervalo de 500 nanómetros a 100 micrómetros.
- 45 6. Procedimiento fotoacústico según la reivindicación 4, **caracterizado porque** la muestra no homogénea es una muestra biológica, preferentemente una muestra viva, de manera especialmente preferente una prueba cutánea viva.
- 50 7. Procedimiento fotoacústico según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la luz de medición presenta longitudes de onda desde el intervalo 1 a 20 micrómetros, preferentemente 6 a 12 micrómetros.
8. Procedimiento fotoacústico según la reivindicación 6, **caracterizado porque** la longitud de onda de la luz de medición para ángulos de incidencia predeterminados varía a lo largo de un intervalo dependiente del ángulo de incidencia.
- 55 9. Procedimiento fotoacústico según las reivindicaciones 6 a 8, **caracterizado porque** los coeficientes de absorción dependientes de la longitud de onda se determinan para capas epidérmicas, en particular para el estrato córneo y el estrato espinoso.

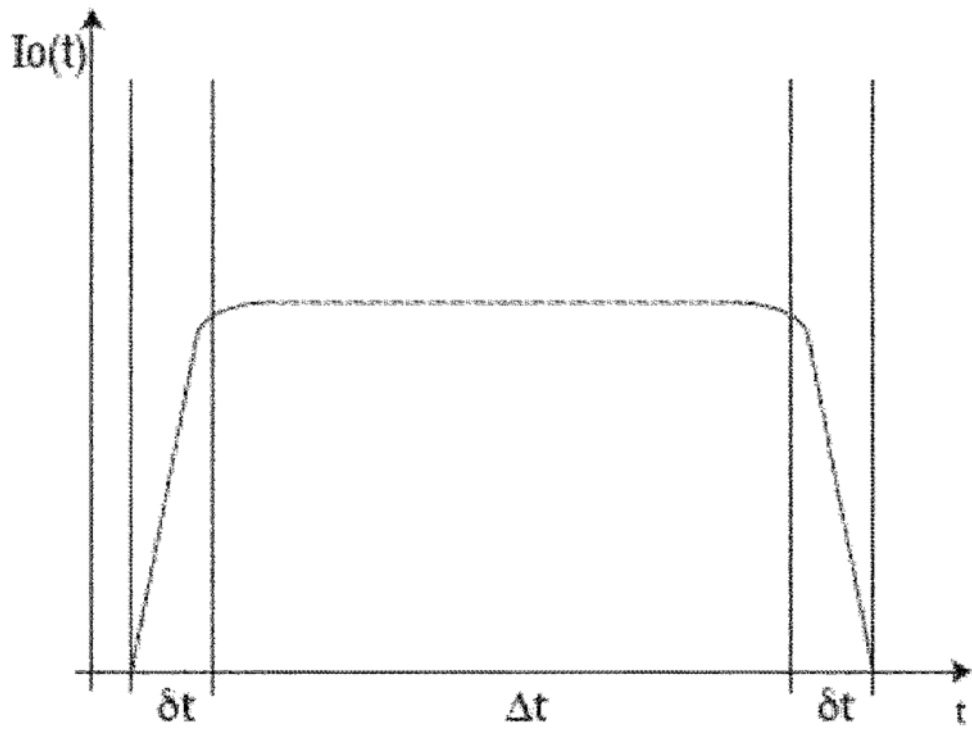


Fig. 1

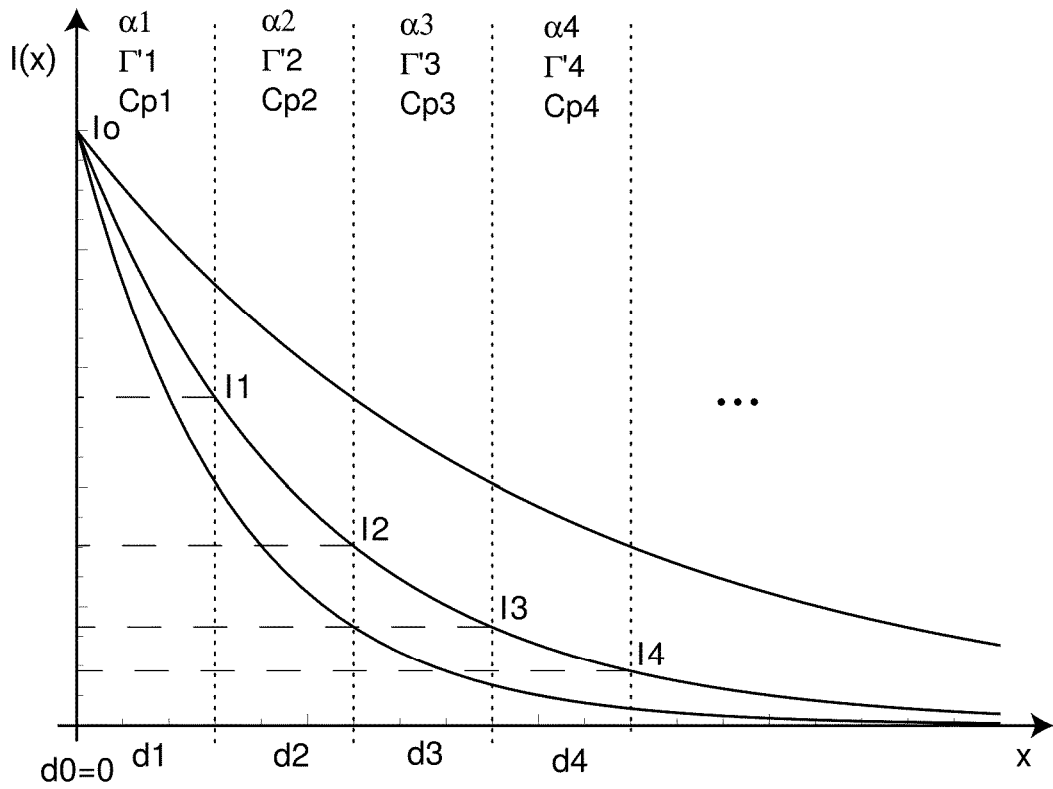


Fig. 2