(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 534 960**

(21) Número de solicitud: 201331584

(51) Int. Cl.:

G03H 1/00 (2006.01)
G02B 21/36 (2006.01)
G02B 26/06 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación:

30.10.2013

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

30.04.2015

Fecha de la concesión:

02.02.2016

(45) Fecha de publicación de la concesión:

09.02.2016

(73) Titular/es:

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (50.0%)
Av. Blasco Ibañez, 13
46010 València (Valencia) ES y
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA (50.0%)

(72) Inventor/es:

SÁNCHEZ ORTIGA, Emilio;
MARTÍNEZ CORRAL, Manuel;
DOBLAS EXPÓSITO, Ana;
SAAVEDRA TORTOSA, Genaro y
GARCÍA SUCERQUIA, Jorge Iván

(74) Agente/Representante:

TORNER LASALLE, Elisabet

(54) Título: **Microscopio, método y programa de ordenador para la obtención de imágenescuantitativas de fase por medio de microscopía holográfica digital, y kit para adaptar un microscopio óptico**

(57) Resumen:

Microscopio, método y programa de ordenador para la obtención de imágenes cuantitativas de fase por medio de microscopía holográfica digital, y kit para adaptar un microscopio óptico.

El microscopio comprende:

- una fuente de luz coherente (1) y un divisor de haz (3) para generar un haz objeto (Lo), para iluminar una muestra, y un haz de referencia (Lr);
- un sistema óptico con un camino óptico principal que constituye un sistema afocal y telecéntrico, y un camino óptico de referencia; y
- unos medios de registro (12) que registran un holograma de dicha muestra en el plano imagen del sistema óptico.

El método comprende registrar un holograma en el plano imagen de un sistema óptico afocal y telecéntrico.

El programa de ordenador está adaptado para implementar parte de las etapas del método.

El kit comprende unos medios para variar el ángulo de inclinación de un haz de referencia.

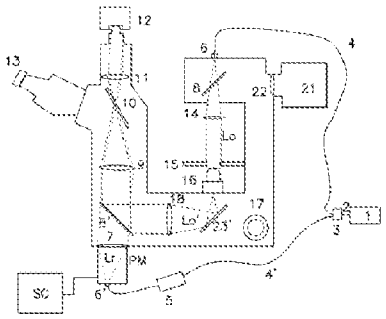


Fig.2

ES 2 534 960 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Microscopio, método y programa de ordenador para la obtención de imágenes cuantitativas de fase por medio de microscopía holográfica digital, y kit para adaptar un microscopio óptico

Sector de la técnica

La presente invención concierne en general, en un primer aspecto, a un microscopio para la obtención de imágenes cuantitativas de fase por medio de microscopía holográfica digital, que incluye un sistema óptico afocal y telecéntrico, y más particularmente a un microscopio con unos medios de registro que registran un holograma en el plano imagen del sistema óptico.

Un segundo aspecto de la invención concierne a un método para la obtención de imágenes cuantitativas de fase por medio de microscopía holográfica digital, que comprende registrar un holograma en el plano imagen de un sistema óptico afocal y telecéntrico.

Un tercer aspecto de la invención concierne a un programa de ordenador adaptado para implementar parte de las etapas del método del segundo aspecto.

Un cuarto aspecto de la invención concierne a un kit para adaptar un microscopio óptico para la obtención de imágenes cuantitativas de fase por medio de microscopía holográfica digital, que comprende, entre otros elementos, unos medios para controlar y variar el ángulo de inclinación de un haz de referencia.

Estado de la técnica anterior

La característica que hace única la MHD (Microscopía Holográfica Digital) es su capacidad de obtener imágenes cuantitativas de fase [3, 4, 6] de muestras transparentes con dimensiones microscópicas sin la necesidad de marcarlas o tintarlas. Si bien existen otros métodos de microscopia que permiten analizar objetos de fase, éstos sólo proporcionan información cualitativa de la fase del espécimen [16]; métodos como los del Zernike y Nomarsky pueden ser nombrados en esta categoría. La MHD permite la recuperación de la amplitud compleja difractada por un objeto por medio del uso de los principios de la

holografía digital [17]. A partir del conocimiento de la amplitud compleja difractada por el objeto, es posible calcular imágenes de amplitud o fase.

Los métodos convencionales de MHD [1-4, 6, 7, 9, 10, 18, 19] hacen uso de registro fuera de plano imagen y/o no utilizan sistemas afocales-telécentricos para el registro de los hologramas. El registro fuera de plano imagen es una característica heredada desde el inicio del desarrollo moderno y más extendido de la MHD [4] y que se ha conservado hasta nuestros días [5, 20]. Dicha condición introduce en la MHD varias características indeseadas:

- No es posible obtener información del espécimen en tiempo real. Se requiere la aplicación de algoritmos de propagación numérica para recuperar la información del experimento, el usuario del MHD observa en la pantalla del microscopio un holograma en lugar de la imagen del espécimen.

- No se aprovecha el diseño optimizado de los objetivos de microscopio para operar en sus planos objeto-imagen conjugados, introduciendo aberraciones ópticas en los hologramas registrados.

- Las dos características anteriores sumadas hace que los sistemas de MHD disponibles en la actualidad no puedan proporcionar imágenes cuya resolución está limitada sólo por la difracción (como sucede con las imágenes proporcionadas por un microscopio óptico convencional) sino que proporciona imágenes cuya resolución es sensiblemente peor.

Al igual que el registro fuera de plano imagen, el uso de esquemas no afocales-telécentricos para el registro de los hologramas en los sistemas de MHD, fue propuesto desde su inicio [3, 4] y se mantiene hasta nuestros días [5, 21]. En la literatura se han propuesto algunas alternativas para realizar el registro de los hologramas de MHD [7, 8, 22]. La arquitectura no afocal-telecéntrica que se emplea comúnmente en MHD hace que el sistema presente las siguientes dificultades:

- Las imágenes reconstruidas de fase de MHD presentan aberración de curvatura de fase [3], lo que impone el empleo de complejos métodos numéricos para su eliminación a posteriori [1, 9-11, 18, 21].

- Adicionalmente a la complejidad de los métodos numéricos para la compensación de la curvatura de fase, se ha demostrado que dichas aproximaciones numéricas mantienen una curvatura remanente que perturba las medidas cuantitativas de fase [23].

- Sin importar el espesor de la muestra en estudio, las imágenes de fase sufren envolvimiento de fase heredado de la curvatura del sistema de registro [1, 3-5, 21].

- Los órdenes difractados que portan la información de la muestra en estudio se esparcen en el dominio espectral lo que dificulta el correcto filtrado de imágenes gemelas y orden cero [18].

- La compensación automática del haz de referencia en configuraciones fuera de eje se dificulta debido al esparcimiento de los órdenes difractados del holograma.

- El esparcimiento de los órdenes difractados limita el espacio ancho de banda disponible, lo que reduce la resolución espacial límite alcanzable por el MHD, la cual será en cualquiera caso inferior a la alcanzable por el microscopio óptico operando con el mismo sistema de lentes objetivos.

La solución de las características negativas arriba indicadas ha derivado en la propuesta de sistemas de MHD que hacen exclusivamente la tarea de cuantificación de fase a-posteriori a un costo computacional y económico elevado. El alto costo computacional de la metodología limita su aplicación en tareas que demanden información cuantificada de fase en tiempo real y su elevado costo económico ha hecho de la técnica una herramienta exclusiva de muy pocos centros de desarrollo e investigación.

En general, los sistemas previos de cuantificación de fase por medio de MHD se han realizado por medio del desarrollo de microscopios independientes, con registro fuera del plano imagen y, en general, sin el uso de sistemas afocales-telecéntricos. Por esta razón las metodologías previas de cuantificación de fase por MHD requieren i) propagación del campo complejo recuperado a partir del holograma, y ii) compensación numérica de la curvatura de fase introducida por el uso de sistemas de registro no afocales-telecéntricos. Estas condiciones imponen las arriba indicadas características poco atractivas para los actuales sistemas de MHD.

No obstante, existen artículos en los que se propuso el uso, en MHD, de sistemas afocal-telecéntricos [8] y se estudió el efecto que la curvatura de fase residual de los procesos de compensación numérica tiene en las imágenes cuantitativas de fase [23].

En el MHD con sistema afocal-telecéntrico descrito en [8], como en todos los MHDs conocidos, registran el holograma en un plano más lejano al plano imagen, que es donde recomienda el estado de la técnica, como por ejemplo se hace en [3,20], donde se establece que el estado de la técnica aconseja registrar el holograma en un plano mucho más lejano al plano imagen o foco del microscopio para holografía off-axis, para evitar problemas tales como: la mala utilización del rango dinámico de las cámaras digitales al registrar detalles brillantes de los objetos o el ensanchamiento de las altas frecuencias espaciales [20].

Todo ello hace que, en los microscopios holográficos conocidos en el estado de la técnica, se obtenga un holograma que no tiene parecido alguno con el espécimen en estudio, por lo que no se puede enfocar la muestra cuando se toma la imagen, es decir no se puede enfocar en tiempo real, no siendo posible obtener información del espécimen en tiempo real, resultando necesario un post-procesado [39] y propagación numérica para recuperar la información del experimento.

En resumen, existen microscopios ópticos convencionales que pueden enfocar la muestra y obtener imágenes 2D y por otro lado los microscopios holográficos que no pueden enfocar la muestra en tiempo real y registran hologramas, a partir de los cuales se puede recuperar la información 3D de la muestra mediante métodos a-posteriori. El usuario de los MHD actuales no tiene la posibilidad de enfocar la muestra en tiempo real, puesto que el usuario observa en la pantalla del microscopio un holograma en lugar de la imagen real del espécimen. El enfoque se realiza de forma digital con el procesado diferido del holograma registrado.

En las referencias [24-28] se describen diferentes propuestas de MHDs convencionales, producidos y comercializados, y en [29-37] se presentan documentos de patente que describen diferentes MHDs del estado de la técnica.

Por otra parte, en [19] y en [38] se describe la implementación de un módulo o kit de MHD a un microscopio comercial *Zeiss® axioplan 2*. Dicho módulo opera bajo los principios expuestos por los mismos autores en [6], los cuales hacen del microscopio de MHD

obtenido mediante la implementación de dicho módulo un sistema que no logra grandes resultados en términos de la resolución espacial ya que no puede alcanzar el límite de difracción dictado por el microscopio huésped. Asimismo, debido al número de operaciones requeridas para recuperar la información del espécimen, la reconstrucción no puede ser implementada en tiempo real. Obviamente, siguiendo los consejos del estado de la técnica, el registro del holograma se realiza en un plano diferente al plano imagen.

La resolución lateral (la que se podría medir, por ejemplo, con un test USAF 1951) del dispositivo de [38] es claramente mejorable, ya que no usa una configuración telecéntrica (lo que genera pérdidas en resolución debido a que el holograma está contaminado por el factor de fase residual), registra el holograma en un plano lejano respecto al plano imagen, y no utiliza unos ajustes óptimos.

Referencias:

1. J. Kuhn, F. Charriere, T. Colomb, E. Cuche, F. Montfort, Y. Emery, P. Marquet, and C. Depeursinge, "Axial sub-nanometer accuracy in digital holographic microscopy," Measurement Science & Technology **19**, 074007 (2008).
2. P. Marquet, B. Rappaz, P. J. Magistretti, E. Cuche, Y. Emery, T. Colomb, and C. Depeursinge, "Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy," Opt. Lett. **30**, 468-470 (2005).
3. E. Cuche, P. Marquet, and C. Depeursinge, "Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms," Appl. Opt. **38**, 6994-7001 (1999).
4. E. Cuche, F. Bevilacqua, and C. Depeursinge, "Digital holography for quantitative phase-contrast imaging," Opt. Lett. **24**, 291-293 (1999).
5. B. Kemper, P. Langehanenberg, S. Kosmeier, F. Schlichthaber, C. Remmersmann, G. von Bally, C. Rommel, C. Dierker, and J. Schnekenburger, "Digital Holographic Microscopy: Quantitative Phase Imaging and Applications in Live Cell Analysis," Handbook of Coherent-Domain Optical Methods, ISBN 978-1-4614-5175-4. Springer Science+ Business Media New York, 2013, p. 215 **1**, 215 (2013).
6. D. Carl, B. Kemper, G. Wernicke, and G. von Bally, "Parameter-Optimized Digital Holographic Microscope for High-Resolution Living-Cell Analysis," Appl. Opt. **43**, 6536-6544 (2004).

7. C. Mann, L. Yu, C.-M. Lo, and M. Kim, "High-resolution quantitative phase-contrast microscopy by digital holography," Opt. Express **13**, 8693-8698 (2005).

8. E. Sánchez-Ortiga, P. Ferraro, M. Martínez-Corral, G. Saavedra, and A. Doblas, "Digital holographic microscopy with pure-optical spherical phase compensation," J. Opt. Soc. Am. A **28**, 1410-1417 (2011).

9. T. Colomb, F. Montfort, J. Kühn, N. Aspert, E. Cuche, A. Marian, F. Charrière, S. Bourquin, P. Marquet, and C. Depeursinge, "Numerical parametric lens for shifting, magnification, and complete aberration compensation in digital holographic microscopy," J. Opt. Soc. Am. A **23**, 3177-3190 (2006).

10. T. Colomb, E. Cuche, F. Charrière, J. Kühn, N. Aspert, F. Montfort, P. Marquet, and C. Depeursinge, "Automatic procedure for aberration compensation in digital holographic microscopy and applications to specimen shape compensation," Appl. Opt. **45**, 851-863 (2006).

11. P. Ferraro, S. De Nicola, A. Finizio, G. Coppola, S. Grilli, C. Magro, and G. Pierattini, "Compensation of the Inherent Wave Front Curvature in Digital Holographic Coherent Microscopy for Quantitative Phase-Contrast Imaging," Appl. Opt. **42**, 1938-1946 (2003).

12. L. Yu and M. K. Kim, "Wavelength-scanning digital interference holography for tomographic three-dimensional imaging by use of the angular spectrum method," Opt. Lett. **30**, 2092-2094 (2005).

13. T. Kreis, *Handbook of Holographic Interferometry: Optical and Digital Methods* (Wiley-vch Verlag Ed, Weinheim, 2005).

14. T. Zhang and I. Yamaguchi, "Three-dimensional microscopy with phase-shifting digital holography," Opt. Lett. **23**, 1221-1223 (1998).

15. I. Yamaguchi and T. Zhang, "Phase-shifting digital holography," Opt. Lett. **22**, 1268-1270 (1997).

16. M. Pluta, *Advanced light microscopy* (PWN, 1988).

17. U. Schnars, "Direct phase determination in hologram interferometry with use of digitally recorded holograms," J. Opt. Soc. Am. A **11**, 2011-2015 (1994).

18. E. Cuche, P. Marquet, and C. Depeursinge, "Spatial Filtering for Zero-Order and Twin-Image Elimination in Digital Off-Axis Holography," Appl. Opt. **39**, 4070-4075 (2000).

19. B. Kemper, D. Carl, A. Höink, G. von Bally, I. Bredebusch, and J. Schnekenburger, "Modular digital holographic microscopy system for marker free quantitative phase contrast imaging of living cells," in *Biophotonics and New Therapy Frontiers*, Proc. SPIE 6191 (SPIE, 2006), 61910T-61910T.

20. D. Claus and D. Iliescu, "Optical parameters and space-bandwidth product optimization in digital holographic microscopy," Appl. Opt. **52**, A410-A422 (2013).

21. K. W. Seo, Y. S. Choi, E. S. Seo, and S. J. Lee, "Aberration compensation for objective phase curvature in phase holographic microscopy," Opt. Lett. **37**, 4976-4978 (2012).

22. P. Ferraro, G. Coppola, S. De Nicola, A. Finizio, S. Grilli, M. Iodice, C. Magro, and G. Pierattini, "Digital holography for characterization and testing of MEMS structures," in *Optical MEMs, 2002. Conference Digest. 2002 IEEE/LEOS International Conference on*, 2002), 125-126.

23. A. Doblas, E. Sánchez-Ortiga, M. Martínez-Corral, G. Saavedra, P. Andrés, and J. Garcia-Sucerquia, "Shift-variant digital holographic microscopy: inaccuracies in quantitative phase imaging," Opt. Lett. **38**, 1352-1354 (2013).

24. "Lynceé Tech DHM" (2013), retrieved http://www.lynceetec.com/.

25. "Ovizio Imaging System" (2013), retrieved http://www.ovizio.com/.

26. "Holographic phase imaging" (2013), retrieved http://www.phiab.se/.

27. "Resolution Optics" (2013), retrieved http://resolutionoptics.com/.

28. "Trimos" (2013), retrieved http://kb.trimos.ch/.

29. A. K. Asundi, W. Qu, and O. Choo, "Digital Holographic Microscopy," US 2011/0043878 A1 (Feb. 24, 2011).

30. D. Carl, B. Kemper, and G. v. Bally, "Method of numerically reconstructing at least an object plane using a digital off-axis hologram and digital holographic microscope," EP 1748327 A1 (Jan. 31, 2007).

31. J.-S. Chen, S.-H. Kuo, C. W. Su, and J.-T. Liang, "Multi-color off-axis digital holographic system and the imaging method thereof," US 8,325,400 B2 (Dec. 4, 2012).

32. E. Cuche, C. Depeursinge, P. Magistretti, and P. Marquet, "Apparatus and method for digital holographic imaging," US 6943924 B2 (2005).

33. B. Das, C. S. Yelleswarapu, and D. V. G. L. N. Rao, "Systems and methods of dual-plane digital holographic microscopy," US 2013/0070251 A1 (Mar. 21, 2013).

34. F. Dubois and C. Yourassowsky, "Digital holographic microscope for 3D imaging and process using it," US 7362449 B2 (Apr. 22, 2008).

35. L. Gisselsson, A. Mölder, and M. C. Sebeste, "Analysis of transparent biological objects," US 20110157601 A1 (Jun. 30, 2011).

36. M. Sebesta, K. Alm, A. Langberg, A. Mölder, J. Persson, and L. Gisselsson, "Method for and use of digital holographic microscopy and imaging on labelled cell samples," EP 2534540 A1 (Dec. 19, 2012).

37. M. Sebesta, J. Persson, L. Gisselsson, A. Moelder, and A. Laangberg, "Analysis of ova or embryos with digital holographic imaging," EP 2446251 A1 (May 2, 2012).

38. D. Carl, A. Höink, B. Kemper, J. Schnekenburger, and G. v. Bally, "Digital holographic multi-focus quantitative phase contrast microscopy," in *DGaO Proceedings*, 2005).

39. Method for simultaneous amplitude and quantitative phase contrast imaging by numerical reconstruction of digital holograms, US 6262818 B1.

Explicación de la invención

Aparece necesario ofrecer una alternativa al estado de la técnica que cubra las deficiencias halladas en el mismo, mediante la proporción de un MHD y método de operación que ofrezca unos resultados y prestaciones superiores a los conocidos en el estado de la técnica, permitiendo realizar un enfoque en tiempo real, alcanzar la resolución espacial dictada por la óptica del sistema de registros del holograma y hacer uso optimizado del espacio ancho de banda.

Con tal fin, la presente invención concierne, en un primer aspecto, a un microscopio para la obtención de imágenes cuantitativas de fase por medio de microscopía holográfica digital, que comprende, de manera en sí conocida:

- una fuente de luz coherente y un divisor de haz de luz coherente dispuesto a la salida de la misma para generar un haz objeto, con el que iluminar una muestra, y un haz de referencia;

- unos medios de registro (tal como una cámara CCD) que registran un holograma de dicha muestra a partir de un patrón de interferencia de dicho haz de referencia y de un haz generado en dicha muestra por la transmisión o reflexión de dicho haz objeto sobre la misma; y

- un sistema óptico que incluye elementos ópticos dispuestos distanciados entre sí formando:

  - un camino óptico principal entre un punto de entrada de dicho haz objeto y dichos medios de registro, que incluye unos elementos ópticos que constituyen un sistema afocal y telecéntrico; y

- un camino óptico de referencia dispuesto entre un punto de entrada de dicho haz de referencia y dichos medios de registro, y que comparte parte de los elementos ópticos con dicho camino óptico principal.

A diferencia de los microscopios holográficos digitales conocidos, en el propuesto por el primer aspecto de la invención, de manera característica, los medios de registro del mismo registran dicho holograma en el plano imagen del sistema óptico, permitiendo así realizar el comentado enfoque en tiempo real que los MHDs del estado de la técnica no permiten realizar.

El microscopio propuesto por el primer aspecto de la presente invención hace un uso optimizado del espacio ancho de banda para obtener imágenes limitadas solamente por la difracción.

Según un ejemplo de realización, dicho sistema óptico comprende, en dicho camino óptico principal, un objetivo que recoge dicho haz generado en dicha muestra y una lente de tubo, formando dicho holograma en el plano focal imagen de dicha lente de tubo.

Ventajosamente, el sistema óptico comprende también, en dicho camino óptico principal, los siguientes elementos ópticos, dispuestos en orden desde dicho punto de entrada del haz objeto hasta los medios de registro: un primer divisor de haz que permite el paso del haz objeto a su través, una lente condensadora, un elemento porta-muestras, dicho objetivo, un espejo, dicha lente de tubo, un segundo divisor de haz que refleja el haz objeto, una lente, un espejo abatible o lámina separadora y una lente formadora de imagen.

El sistema óptico del microscopio holográfico digital propuesto por el primer aspecto de la invención comprende también, en dicho camino óptico de referencia, según un ejemplo de realización, los siguientes elementos ópticos, dispuestos en orden desde dicho punto de entrada del haz de referenciay los medios de registro: una lente colimadora de inclinación variable que permite variar el ángulo que forma el haz de referencia con el eje óptico del microscopio, dicho segundo divisor de haz que permite el paso del haz de referencia a su través, dicha lente, dicho espejo abatible o lámina separadora y dicha lente formadora de imagen.

En general, el microscopio también comprende, dispuesto entre una de las salidas del divisor de haz de luz coherente y dicho punto de entrada del haz de referencia, un variador de intensidad y camino óptico.

Si bien, para algunos ejemplos de realización, el microscopio propuesto por el primer aspecto de la invención es únicamente un MHD, para otro ejemplo de realización, más preferido, el microscopio también es un microscopio óptico, es decir que está previsto también para la obtención de imágenes por medio de microscopía óptica, para lo cual comprende:

- una fuente de luz blanca dispuesta para iluminar dicha muestra;

- una disposición de elementos ópticos que incluyen a los elementos ópticos de dicho camino óptico principal de dicho sistema óptico dispuestos entre dicha fuente de luz blanca y los medios de registro; y

- dichos medios de registro que registran también una imagen óptica de dicha muestra en el plano imagen del sistema óptico.

Se constituye así un microscopio híbrido: MHD y óptico, pudiendo trabajar, de manera alternativa, en cualquiera de los dos modos de operación: MHD u óptico convencional, gracias a unos medios de selección incluidos en el microscopio para seleccionar trabajar en uno u otro modo.

Según un ejemplo de realización, el microscopio comprende además una lente dispuesta a la salida de dicha fuente de luz blanca, un ocular dispuesto para recibir el haz de luz blanca reflejado por dicho espejo abatible o lámina separadora y permitir la visión directa de la imagen óptica de la muestra y un mecanismo de enfoque.

De acuerdo con un ejemplo de realización, el microscopio del primer aspecto de la invención comprende unos medios de control que controlan la operación de los elementos del microscopio y que incluyen unos medios de procesamiento en conexión con los medios de registro que reciben el holograma registrado, en formato digital, y lo procesan para calcular la fase cuantitativa de la muestra.

Un segundo aspecto de la presente invención concierne a un método para la obtención de imágenes cuantitativas de fase por medio de microscopía holográfica digital, que comprende, de manera en sí conocida:

- generar un haz de luz coherente y dividirlo en un haz objeto y un haz de referencia;

- emitir dicho haz objeto sobre una muestra para generar en la misma un correspondiente haz por la transmisión o reflexión de dicho haz objeto sobre dicha muestra, pasando dicho haz objeto por parte de un camino óptico principal de un sistema óptico y dicho haz generado por el resto de dicho camino principal, donde dicho camino principal comprende unos elementos ópticos que constituyen un sistema afocal y telecéntrico formado por al menos un objetivo, para recoger dicho haz generado en dicha muestra, y una lente de tubo; y

- registrar un holograma de dicha muestra a partir de un patrón de interferencia de dicho haz de referencia y de dicho haz generado en la muestra.

A diferencia de los métodos conocidos, el propuesto por el segundo aspecto de la invención comprende, de manera característica, registrar dicho holograma en el plano imagen de dicho sistema óptico, al final de dicho camino principal.

El método propuesto por el segundo aspecto de la invención hace un uso optimizado del espacio ancho de banda para obtener imágenes limitadas únicamente por la difracción y con mínima perturbación de las imágenes cuantitativas de fase, según se describirá seguidamente en unos ejemplos de realización del método.

Según un ejemplo de realización del método propuesto por el segundo aspecto de la invención, el sistema óptico es el sistema óptico de un microscopio óptico, realizándose dicho registro de dicho holograma en unos medios de registro del microscopio óptico.

Para un ejemplo de realización preferido, el método comprende ajustar/optimizar los siguientes parámetros del microscopio óptico para proporcionar un holograma digital cuya imagen cuantitativa de fase tenga una resolución lateral máxima y perturbación mínima, y hacer un uso optimizado del espacio ancho de banda para obtener imágenes limitadas únicamente por la difracción:

NA: apertura numérica del objetivo del microscopio óptico;

M: aumento lateral de dicho sistema telecéntrico;

Δp: tamaño de los píxeles de dichos medios de registro; y

ϕ: ángulo que forma el haz de referencia con el eje óptico del microscopio;

de manera que se cumplan las siguientes relaciones:

$$\frac{NA}{M} \leq \frac{\lambda}{\sqrt{2}\left(\sqrt{2}+3\right)\Delta p} \quad \text{y} \quad \sin^{-1}\left(\frac{3}{\sqrt{8}\pi}\frac{NA}{M}\right) \leq \phi$$

donde λ es la longitud de onda del haz de luz coherente.

La optimización de los parámetros de captura permite al método obtener reconstrucciones de muestras transparentes con la mejor calidad posible tanto en términos de la fase cuantitativa como de la distribución de intensidades. La inserción de un haz de referencia coherente en el sistema óptico de un microscopio convencional en conjunción con la detección en el plano imagen del microscopio facilita la caracterización del sistema pudiendo definir las condiciones que garanticen los siguientes puntos:

- Captura de un holograma limitado en difracción: La resolución viene dada por el sistema óptico y el medio de registro, no por el mal uso de los mismos.

- Reconstrucción carente del posible ruido que introduce el orden cero de la difracción en los órdenes objeto.

- Maximización del espacio-ancho de banda aprovechable en el dominio de las frecuencias espaciales.

- La resolución no se ve alterada debido a factores de propagación numérico.

Por perturbación mínima se hace referencia a los siguientes aspectos:

1. El uso del sistema telecéntrico en plano imagen elimina los efectos asociados con los términos cuadráticos de fase, tal cual como se ha presentado en [8] y en [23].

2. El hecho de satisfacer las condiciones presentadas en las relaciones arriba indicadas, elimina cualquier posible ruido fruto de la mezcla de los órdenes objeto y el orden cero de

difracción. Estos ruidos se manifiestan en un detrimento de la resolución espacial alcanzable con el microscopio holográfico digital. Prueba de ello lo constituye el hecho de que en la referencia [19] se alcanza una resolución espacial que es del orden tres veces inferior a la cual la presente invención podría alcanzar con el uso de una configuración similar a la presentada por los autores de la referencia [19].

3. La misma condición que reduce la resolución espacial del microscopio afecta a los valores registrados en las imágenes cuantitativas de fase.

4. Al registrar en el plano imagen se minimizan las aberraciones ópticas que pueden ser introducidas por los objetivos de microscopio. El hecho de garantizar que el objeto está ubicado en el plano objeto del objetivo de microscopio y su imagen se genera en el plano imagen del sistema formador de imágenes, hace uso del diseño óptico optimizado para minimizar las aberraciones que podría introducir el sistema de registro de los hologramas.

5. El registro en plano imagen elimina la necesidad de aplicar algoritmos de propagación numérica para recuperar la información enfocada del objeto. Este hecho reduce la introducción de ruido numérico propio de estos métodos.

El método comprende, según un ejemplo de realización, capturar y procesar dicho holograma mediante la realización de las siguientes etapas de manera secuencial, en bucle cerrado:

- registro del holograma digital;

- cálculo de la transformada de Fourier rápida del holograma digital;

- filtrado en el dominio de Fourier del orden objeto e identificación automática del ángulo formado por el haz de referencia y su correspondiente compensación, si se trabaja fuera de eje, o corrimiento de fase, si se trabaja en eje;

- cálculo de la transformada inversa de Fourier rápida del orden objeto; y

- cálculo de la fase cuantitativa del espécimen o muestra.

Las anteriores etapas a realizar en bucle cerrado están implementadas, para un ejemplo de realización, mediante un software adecuado a instalar en el sistema de control del propio microscopio óptico y/o en un sistema de control adicional, constituyendo tal software un tercer aspecto de la invención relativo a un programa de ordenador que incluye instrucciones de código que cuando se ejecutan en un ordenador implementan dichas etapas.

Un cuarto aspecto de la invención concierne a un kit para adaptar un microscopio óptico convencional para la obtención de imágenes cuantitativas de fase por medio de microscopía holográfica digital, que comprende, de manera en sí conocida por [19]:

- una fuente de luz coherente y un divisor de haz de luz coherente conectado o a conectar a la salida de la misma para generar, por una primera salida, un haz objeto, con el que iluminar una muestra, y, por una segunda salida, un haz de referencia;

- unos primeros medios de guiado de luz coherente a conectar entre dicha primera salida de dicho divisor de haz de luz coherente y un punto de entrada de un camino óptico principaldel microscopio óptico que incluye unos elementos ópticos que constituyen un sistema afocal y telecéntrico y que discurre entre dicho punto de entrada y unos medios de registro del microscopio óptico;

- unos segundos medios de guiado de luz coherente a conectar entre dicha segunda salida de dicho divisor de haz de luz coherente y un punto de entrada de un camino óptico de referencia que comparte parte de los elementos ópticos con dicho camino óptico principal y que finaliza en dichos medios de registro; y

- un elemento óptico a disponer en dicho camino óptico de referencia para conferirle una inclinación determinada al haz de referencia con respecto al eje óptico del microscopio óptico;

A diferencia de las propuestas conocidas, de manera característica, el kit propuesto por el cuarto aspecto de la invención comprende además:

- unos medios de soporte para soportar a dicho elemento óptico con una inclinación variable,

- unos medios de actuación para variar la inclinación del elemento óptico, actuando sobre el mismo o sobre dichos medios de soporte, y

- un sistema de control en lazo cerrado para evaluar automáticamente en el espacio de Fourier una serie de parámetros del microscopio óptico que determinan el desempeño del microscopio cuando se utiliza para la obtención de imágenes cuantitativas de fase por medio de microscopía holográfica digital, es decir como MHD, determinar un valor óptimo de ángulo de inclinación ϕ para el haz de referencia, a partir del resultado de dicha evaluación, y controlar a dichos medios de actuación para que realicen dicha variación de inclinación de acuerdo con dicho valor óptimo de ángulo de inclinación ϕ.

Para la correcta operación del sistema de control en lazo cerrado, al montarse el kit en el microscopio óptico, tal montaje incluirá la debida conexión (vía cable o de manera inalámbrica) a unas entradas del sistema de control del kit de las salidas de unos correspondientes dispositivos sensores de tales parámetros, así como la conexión de una correspondiente salida del sistema de control con los medios de actuación para el control de los mismos mediante el envío de unas correspondientes señales eléctricas por dicha salida (vía cable o de manera inalámbrica).

El kit propuesto por el cuarto aspecto de la invención, una vez montado en el microscopio óptico, constituye el microscopio propuesto por el primer aspecto de la invención en su modalidad híbrida, y opera implementando el método del segundo aspecto.

Alternativa o complementariamente al uso de los medios de registro del microscopio óptico convencional, el kit está pensado para usar, y por tanto incluye, para un ejemplo de realización, unos medios de registro propios a instalar en el microscopio y adaptados para el registro de hologramas en el plano imagen.

Según un ejemplo de realización, dichos medios de soporte y dichos medios de actuación comprenden una plataforma de rotación motorizada configurada para variar la inclinación del elemento óptico por el giro de la misma.

De acuerdo con un ejemplo de realización:

- dichos primeros medios de guiado de luz coherente comprenden un tramo de fibra óptica con un primer extremo a conectar a dicha primera salida del divisor de haz de luz

coherente, y un conector de fibra óptica a conectar a un segundo extremo de dicho tramo de fibra óptica y previsto para acoplarse a una primera abertura de entrada del microscopio óptico definida en dicho punto de entrada del camino óptico principal; y

- dichos segundos medios de guiado de luz coherente comprenden un conductor de fibra óptica, con un elemento variador de intensidad y camino óptico incorporado, teniendo dicho conductor de fibra óptica un primer extremo a conectar a dicha segunda salida del divisor de haz de luz coherente, y un conector de fibra óptica a conectar a un segundo extremo de dicho conductor de fibra óptica y previsto para acoplarse a una segunda abertura de entrada del microscopio óptico definida en dicho punto de entrada del camino óptico de referencia o a un elemento intermedio acoplado a dicha segunda abertura, tal como dicha plataforma de rotación motorizada.

De acuerdo con un ejemplo de realización, el kit comprende además:

- un primer divisor de haz a disponer en el microscopio óptico, reemplazando un primer espejo del mismo dispuesto entre una fuente de luz blanca y una lente condensadora del microscopio óptico, de manera que dicho primer divisor de haz permita el paso del haz objeto a su través y refleje el haz de luz blanca generado por dicha fuente de luz blanca, o viceversa, para dirigir a ambos hacia la lente condensadora; y

- un segundo divisor de haz a disponer en el microscopio óptico, reemplazando un segundo espejo del mismo dispuesto entre una lente de tubo y una lente del microscopio óptico, de manera que dicho segundo divisor de haz permita el paso del haz de referencia a su través y refleje el haz proveniente de la lente de tubo, o viceversa, para dirigir a ambos hacia dichos medios de registro del microscopio óptico.

Para un ejemplo de realización, dicho elemento óptico de inclinación variable es una lente colimadora de inclinación variable a disponer entre el punto de entrada del haz de referencia y dicho segundo divisor de haz.

De acuerdo con un ejemplo de realización preferido, el sistema de control en lazo cerrado del kit incluye un algoritmo encargado de realizar dicha determinación del valor óptimo de ángulo de inclinación ϕ, por sí solo o en colaboración con un sistema electrónico del microscopio óptico, de manera que se cumpla la relación del método arriba expuesta para un ejemplo de realización preferido del mismo, en particular la relación:

$$\sin^{-1}\left(\frac{3}{\sqrt{8}\pi}\frac{NA}{M}\right)\leq\phi$$

siendo los citados parámetros del microscopio óptico a evaluar en el espacio de Fourier: NA, M y Δp, cuyo significado ya se ha explicado anteriormente.

La presente invención, en sus tres aspectos (microscopio, método y kit de adaptación), al operar con imágenes registradas en plano imagen por medio de un sistema afocal-telecéntrico no adolece de las desventajas descritas anteriormente en el apartado de estado de la técnica anterior, y por ende permite obtener imágenes cuantitativas de fase en tiempo real. Adicionalmente, para el caso del microscopio híbrido, la mínima modificación requerida del microscopio óptico para obtener imágenes cuantitativas de fase, permite al usuario de manera simple y rápida pasar del modo de cuantificación de fase al de operación convencional del microscopio óptico. Esta característica es única de la presente invención.

El kit o módulo adaptable a un microscopio óptico para obtener imágenes cuantitativas de fase por medio de MHD propuesto por el cuarto aspecto de la presente invención, se diferencia técnicamente de sus predecesores, además de por la inclusión del sistema de control en lazo cerrado y elementos asociados al mismo, en los siguientes aspectos:

- La mínima modificación requerida del microscopio óptico para obtener imágenes cuantitativas de fase permite al usuario de manera simple y rápida pasar del modo de cuantificación de fase al de operación convencional del microscopio óptico.

- Puesto que registra los hologramas en el plano imagen de un sistema afocal-telecéntrico no demanda el uso de robustos sistemas de autoenfoque, propagación numérica y compensación de fase para obtener imágenes cuantitativas de fase.

- Permite obtener información del espécimen en tiempo real. Puesto que no se requiere propagación numérica para recuperar la información del experimento, el usuario puede observar en la pantalla del microscopio imagen cuantificada en fase del espécimen.

- Aprovecha el diseño optimizado de los objetivos de microscopio por operar en sus planos objeto-imagen conjugados, lo que reduce las aberraciones ópticas en los hologramas registrados.

- Puede operar al límite de la difracción establecido para un microscopio óptico convencional operando con los mismos objetivos.

- Las imágenes reconstruidas de fase de MHD no presentan aberración de curvatura de fase [3], lo que elimina el empleo de complejos métodos numéricos para su eliminación a posteriori [1, 9-11, 18, 21].

- Por no requerir de métodos numéricos para la compensación de la curvatura de fase, no sufre de la perturbación de las imágenes de fase debida a la curvatura remanente [23].

- Para muestras delgadas, las imágenes de fase no presentan envolvimiento de fase.

- Los órdenes difractados que portan la información de la muestra en estudio son puntos en el dominio espectral lo que facilita el correcto filtrados de imágenes gemelas y orden cero [18].

- La compensación automática del haz de referencia en configuraciones fuera de eje se facilita debido a la forma puntual de los órdenes difractados del holograma.

- Se hace uso optimizado del espacio ancho de banda disponible, lo que hace posible lograr resolución espacial comparable a la alcanzable por el microscopio óptico operando con el mismo sistema de objetivos

El uso del microscopio, método y kit de la presente invención aportaría las siguientes ventajas comparativas con respecto a los demás métodos para realizar imágenes cuantitativas de fase:

1- Reducción de los costes necesarios para la obtención de imágenes cuantitativas de fase.

2- Medida cuantitativa de fase en tiempo real para muestras sin tinción.

3- Minimización de posibles aberraciones ópticas en el sistema formador de imágenes.

4- Utilización del manejo de muestras, estabilidad, robustez, entre otras características, que ofrecen los microscopios comerciales.

5- Posibilidad de operar en modo de cuantificación de imágenes de fase o los modos de funcionamiento ofrecidos por el microscopio convencional huésped.

6- Utilización de software de procesamiento de fácil uso, para obtener las imágenes cuantitativas de fase.

7- Operación optimizada al límite de difracción establecido por la óptica del microscopio huésped.

8- Introducción de menor ruido numérico en el procesamiento de los hologramas registrados para calcular las imágenes cuantitativas de fase.

La presente invención tiene aplicación en cualquier campo de la investigación y/o desarrollo en el cual la información de interés esté o sea posible de codificar en información de fase de un campo óptico que se propaga y no sea posible o no se desee tintar el espécimen en estudio. Diversos sectores de las ciencias de la vida y de las ciencias de los materiales se pueden contar entre los posibles campos de aplicación. Por ejemplo, en el campo de la biología la medida cuantitativa de fase en muestras sin tintar es de gran interés ya que permite no sólo la visualización cuantitativa de dichas muestras microscópicas sino que este proceso puede llevarse a cabo sin necesidad de introducir agentes externos en las mismas. Mediante la presente invención sería posible compatibilizar la aparatología empleada típicamente en microscopía con la técnica MHD, aumentando la flexibilidad de dichas procedimientos de estudio y permitiendo la comparación directa de los resultados obtenidos mediante el uso de otras técnicas. Dado que el número de operaciones necesarias para obtener las imágenes cuantitativas de fase es mucho menor que en un sistema MHD convencional, el manejo del software de la presente invención se simplifica considerablemente haciéndolo amigable al usuario y eliminando el incómodo proceso de registro previo de los hologramas.

Breve descripción de los dibujos

Las anteriores y otras ventajas y características se comprenderán más plenamente a partir de la siguiente descripción detallada de unos ejemplos de realización con referencia a los dibujos adjuntos, que deben tomarse a título ilustrativo y no limitativo, en los que:

la Fig. 1 muestra, de manera esquemática, un microscopio óptico convencional con sus principales elementos, externos e internos, así como la trayectoria que sigue por su interior el haz de luz blanca utilizado en el mismo;

la Fig. 2 muestra al microscopio holográfico del primer aspecto de la invención, según un ejemplo de realización, obtenido mediante la adaptación del microscopio de la Fig. 1 mediante el kit del cuarto aspecto de la invención, ilustrándose la trayectoria del haz objeto y el haz de referencia utilizados en el mismo;

la Fig. 3 muestra al mismo microscopio de la Fig. 2, pero en este caso funcionando, de manera alternativa, como un microscopio óptico convencional, de igual modo que el de la Fig. 1, demostrando así el funcionamiento híbrido (modo holográfico y modo convencional) del microscopio del primer aspecto de la invención, para un ejemplo de realización;

la Fig. 4 ilustra, de manera esquemática, las diferentes etapas, algunas esenciales y otras opcionales, a realizar, mediante un algoritmo adecuado, implementado por ejemplo por el programa de ordenador del tercer aspecto de la invención, para adquirir y procesar el holograma de la muestra, habiéndose incluido en esta Figura, para una mejor compresión de la misma, la imagen de un holograma capturado y las sucesivas imágenes que se van obteniendo al ejecutar el algoritmo;

La Fig.5 son unas imágenes que ilustran unos ejemplos de espectro del holograma (columna de la izquierda) y reconstrucción de la escena (columna de la derecha) para tres microscopios holográficos con diferentes configuraciones. (a) Configuración telecéntrica con captura fuera del plano imagen (estado de la técnica); (b) Configuración telecéntrica con captura en plano imagen, pero sin optimizar los parámetros de captura (presente invención); (c) Configuración telecéntrica con captura en plano imagen y con los parámetros de captura optimizados (ejemplo preferido de la presente invención); y

la Fig. 6 muestra, ampliadas, las dos imágenes de la columna derecha de los casos b) y c) de la Fig. 5.

Descripción detallada de unos ejemplos de realización

En la Fig. 1 se ilustra un esquema de un microscopio óptico comercial en el cual se muestran sus partes fundamentales y en línea discontinua se presenta la trayectoria de la luz L1 en su interior, y que incluye los siguientes elementos: 21.-Fuente de luz blanca. 22.-Lente. 23, 23', 23".-Espejos. 14.-Lente condensadora. 15.- Mesa porta-muestras. 16.-Objetivo de microscopio. 17.- Mecanismo de enfoque. 18.- Lente de tubo. 9.- Lente.10. -Espejo abatible o lámina separadora. 11.- Lente formadora de imagen. 12.- Medios de registro, en general una cámara CCD. 13.- Ocular.

El camino óptico que sigue el haz de luz blanca L1 hasta la cámara CCD 12 es el que se ha dado en denominar en la presente descripción como camino óptico principal.

En las Figuras 2 y 3 se ilustra al microscopio híbrido, es decir al que puede funcionar en modo MHD (ver Fig. 2) y en modo convencional (ver Fig. 3), una vez modificado, según un ejemplo de realización, mediante el montaje de los elementos del kit del cuarto aspecto de la invención, en particular de:

- una fuente de luz coherente 1, en general láser, y un divisor de haz de luz coherente 3 conectado a la salida de la misma (mediante un acoplador de fibra óptica 2) para generar, por una primera salida, un haz objeto Lo, con el que iluminar una muestra (no ilustrada), y, por una segunda salida, un haz de referencia Lr;

- un tramo de fibra óptica 4 con un primer extremo conectado a la primera salida del divisor de haz de luz coherente 3, y un conector de fibra óptica 6 conectado a un segundo extremo del tramo de fibra óptica 4 y acoplado a una primera abertura de entrada del microscopio óptico definida en el punto de entrada del camino óptico principal (por encima del elemento 8 en las Figs. 2 y 3);

- un conductor de fibra óptica 4', con un elemento variador de intensidad y camino óptico 5 incorporado, teniendo dicho conductor de fibra óptica 4' un primer extremo conectado a la segunda salida del divisor de haz de luz coherente 3, y un conector de fibra óptica 6' conectado a un segundo extremo del conductor de fibra óptica 4' y acoplado a un elemento intermedio PM acoplado a un segunda abertura de entrada del microscopio óptico definida en el punto de entrada del camino óptico de referencia;

- una lente colimadora de inclinación variable 7 dispuesta en el camino óptico de referencia para conferirle una inclinación determinada al haz de referencia Lr con respecto al eje óptico del microscopio óptico;

- dicho elemento intermedio PM, el cual es una plataforma de rotación motorizada PM que soporta a la lente colimadora 7 y que, al girar, varía la inclinación de la misma; y

- un sistema de control en lazo cerrado SC para evaluar automáticamente en el espacio de Fourier una serie de parámetros del microscopio óptico, determinar un valor óptimo de ángulo de inclinación ϕ para el haz de referencia Lr, a partir del resultado de dicha evaluación, y controlar a la plataforma de rotación motorizada PM para que realicen dicha variación de inclinación de la lente colimadora 7 de acuerdo con el valor óptimo de ángulo de inclinación ϕ.

El kit también incluye:

- un primer divisor de haz 8 que se dispone en el microscopio óptico reemplazando al primer espejo 23 (ver Fig. 1), y permite el paso del haz objeto Lo a su través y la reflexión del haz de luz blanca L1; y

- un segundo divisor de haz 8' que se dispone en el microscopio óptico reemplazando al segundo espejo 23'' (ver Fig. 1) y permite el paso del haz de referencia Lr a su través y la reflexión del haz generado Lo'.

En una versión más básica del kit, éste no incluye al sistema de control en lazo cerrado SC ni a la plataforma de rotación motorizada PM, montándose la lente colimadora 7 con una plataforma de rotación manual para modificar, en el microscopio óptico, el ángulo entre el haz objeto y el haz de referencia.

En la Fig. 2 se ilustra el funcionamiento del microscopio en modo MHD, donde el haz objeto Lo incide sobre la muestra (no ilustrada), y el haz generado Lo' en dicha muestra, en este caso por la transmisión del haz objeto Lo por la misma, sigue el resto del camino óptico principal hasta la cámara CCD o CMOS 12 (o cualquier otra clase de disposición que incorpore un arreglo matricial de elementos fotosensibles) donde también llega el haz de referencia Lr inclinado respecto a Lo', registrándose en la cámara CCD 12 un holograma de la muestra a partir de un patrón de interferencia de ambos haces Lr y Lo'.

Una de las características principales que aprovecha el microscopio y kit de la presente invención, es el diseño optimizado de objetivo de microscopio 16 y lente de tubo 18 del microscopio óptico comercial. Este diseño permite que los campos ópticos registrados en el plano imagen de la lente de tubo 18 no presenten curvatura de fase, una característica esencial en MHD.

Al comparar la Fig. 1 con las Figs. 2 y 3 se observa que el microscopio modificado está constituido por un número pequeño de elementos perfectamente acoplables en el microscopio comercial, el cual es intervenido mínimamente para insertar/reemplazar las mencionadas partes. Al estar acoplado a un microscopio comercial, el microscopio modificado utiliza además el manejo de muestras, estabilidad, y robustez, entre otras características, que ofrecen los microscopios comerciales.

La Fig. 3 muestra al mismo microscopio de la Fig. 2, pero en este caso funcionando, de manera alternativa, como un microscopio óptico convencional, de igual modo que el de la Fig. 1, demostrando así el funcionamiento híbrido (modo holográfico y modo convencional) del microscopio del primer aspecto de la invención, para un ejemplo de realización. Esta figura muestra la posibilidad que brinda el microscopio y kit de la presente invención de permitir al usuario pasar de modo de imágenes cuantitativas de fase a las imágenes típicas de un microscopio comercial. En su funcionamiento comercial, el microscopio podría operar en algunos de los modos disponibles en el mercado.

Las imágenes registradas en la cámara CCD 12 cuando el modo MHD está activado, son procesadas siguiendo el esquema que se presenta en la Fig. 4. El algoritmo/software de adquisición y procesado de los hologramas digitales incluye los siguientes pasos:

- Registro del holograma digital.
- Cálculo de la transformada de Fourier rápida del holograma digital.
- Filtrado en el dominio de Fourier del orden objeto e identificación automática del ángulo formado por el haz de referencia y su correspondiente compensación.
- Cálculo de la transformada inversa de Fourier rápida del orden objeto.

- Cálculo de la fase cuantitativa del espécimen.

Los pasos arriba mencionados representan un bucle cerrado (ver Fig.4) y dado que tanto el número de operaciones necesarias es mínimo y su tiempo de cómputo es corto, la implementación del software para visualización cuantitativa de fase en tiempo real es factible sin grandes requerimientos de hardware. Existen una serie de parámetros libres que el usuario puede cambiar a voluntad: elección del filtro empleado en el espacio de Fourier (posición, forma y tamaño), ajuste fino del ángulo del haz de referencia (en caso de que fuese necesario), selección de la región de interés en el holograma e índice de refracción del espécimen a efectos de la medida cuantitativa del tamaño axial del mismo. Exceptuando este último parámetro, el resto podrían omitirse realizando un calibrado previo del microscopio que incluyese la información de los distintos objetivos de microscopio que se desean emplear.

Como cálculos adicionales pueden obtenerse la amplitud del espécimen a efectos de llevar a cabo el enfoque manual de éste, así como una representación tridimensional bien de la fase cuantitativa obtenida o de su correspondencia con el tamaño real de la muestra.

Para un ejemplo de realización del microscopio y el kit propuestos por la presente invención, éstos incluyen un software que implementa el algoritmo descrito, previamente instalado en un elemento de hardware (tal como el sistema de control SC), o en un medio de soporte adecuado, tal como un DVD, a partir del cual pueda instalarse en el propio sistema de control ya incluido en el microscopio óptico.

En la Fig. 5 se muestra el resultado de experimentos en los que se ha obtenido la reconstrucción de la imagen de un test de resolución (USAF 1951):

- Fig. 5(c): cuando el holograma se captura en las condiciones óptimas de ajuste (que implican el cumplimiento de las relaciones descritas anteriormente que incluyen a NA, M, Δp y ϕ), es decir para un ejemplo de realización preferido de la presente invención;

- Fig. 5(b):cuando se captura el holograma en plano imagen, pero sin ajustar los parámetros del sistema, para un ejemplo menos preferido de la presente invención ; y

- Fig. 5(a): cuando el holograma se captura fuera del plano imagen, según se aconseja en el estado de la técnica.

Nótese que en la Fig. 5 se ha mostrado en la columna de la izquierda la transformada de Fourier del holograma. Esta transformada es la que contiene la información que permite hacer la reconstrucción. Sólo en el caso de la Fig. 5(c) el contenido frecuencial del objeto (en el interior del círculo continuo) se puede aislar sin interferencias con otros términos perturbadores.

Como puede observarse en la Fig. 5, a pesar de que el microscopio de la presente invención está trabajando con una NA menor, la calidad de la reconstrucción, tanto en términos de resolución como de ruido, se ve claramente mejorada con respecto a los otros dos casos.

Para observar mejor la mejora en resolución, en la Fig.6 se muestra una vista ampliada de las reconstrucciones para los casos b) y c), correspondientes a los ejemplos de realización de la presente invención.

Con respecto a los tiempos de cálculo, se ha hecho una comparación de los tres casos realizando el procesamiento con MatLab en un procesador i7 de 4Gb de RAM (con otras máquinas se obtendrían proporciones similares). En particular se ha comprobado que calcular la reconstrucción 5(c) a partir del holograma consume 117 mili-segundos (lo que ya en estos momentos proporciona una tasa de 8 imágenes por segundo) mientras que la reconstrucción 5(a) consume 462 mili-segundos (2 imágenes por segundo).

Todos los aspectos de la invención presentan las siguientes características que lo diferencian de los métodos de cuantificación de fase conocidos hasta el momento:

- Utilización de un sistema afocal-telecéntrico para el registro de los hologramas [8]. Esta característica, que está incorporada de forma nativa en la parte óptica de los microscopios comerciales, elimina la curvatura de fase presente en los sistemas estándar de MHD, por lo cual no es necesario realizar ningún otro procedimiento de compensación para la cuantificación de la fase [9-11].

- Captura de hologramas en el plano imagen del microscopio. Este método de registro permite tener información inmediata de la muestra en estudio, sin necesidad de

calcular por métodos numéricos el campo en un plano situado a distancia del plano de captura. Además el holograma capturado está libre de aberraciones ópticas, ya que en este caso el objetivo de microscopio se utiliza en su configuración optimizada por los fabricantes.

- Posibilidad de reenfoque numérico. Para aplicaciones en las cuales se trabaja con muestras tridimensionales, la presente invención permite reenfocar por medio de cálculo numérico a las diferentes secciones de la muestra. Esto se ejecuta de manera análoga como lo hacen las técnicas convencionales de MHD, es decir, aplicando los algoritmos basados en la propagación del espectro angular [12], o transformada de Fresnel [13].

- Se puede operar en configuración fuera de eje o en eje [13]. Para la primera se permite la compensación automática del haz de referencia. Para la segunda se emplea un método de corrimiento de fase [14, 15].

- La obtención de imágenes cuya resolución está limitada exclusivamente por la difracción. Al eliminar la propagación numérica por su registro en plano imagen, es posible ajustar el microscopio de forma que no se produzca un deterioro en la resolución, lo que permite aprovechar al máximo la resolución proporcionada por el microscopio óptico usado como base.

- Menor número de operaciones para obtener imágenes cuantitativas de fase. Puesto que no se requiere propagación numérica ni compensación numérica de la curvatura de fase, se puede proporcionar información cuantitativa de fase en tiempo real.

- Posibilidad de operar en modo de cuantificación de imágenes de fase o los modos de funcionamiento ofrecidos por el microscopio convencional huésped.

Un experto en la materia podría introducir cambios y modificaciones en los ejemplos de realización descritos sin salirse del alcance de la invención según está definido en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1.- Microscopio para la obtención de imágenes cuantitativas de fase por medio de microscopía holográfica digital, que comprende:

- una fuente de luz coherente (1) y un divisor de haz de luz coherente (3) dispuesto a la salida de la misma para generar un haz objeto (Lo), con el que iluminar una muestra, y un haz de referencia (Lr);

- unos medios de registro (12) que registran un holograma de dicha muestra a partir de un patrón de interferencia de dicho haz de referencia (Lr) y de un haz generado (Lo') en dicha muestra por la transmisión o reflexión de dicho haz objeto (Lo) sobre la misma; y

- un sistema óptico que incluye elementos ópticos dispuestos distanciados entre sí formando:

  - un camino óptico principal entre un punto de entrada de dicho haz objeto (Lo) y dichos medios de registro (12), que incluye unos elementos ópticos que constituyen un sistema afocal y telecéntrico; y

  - un camino óptico de referencia dispuesto entre un punto de entrada de dicho haz de referencia ydichos medios de registro (12), y que comparte parte de los elementos ópticos con dicho camino óptico principal;

estando el microscopio **caracterizado** porque dichos medios de registro (12) registran dicho holograma en el plano imagen de dicho sistema óptico.

2.- Microscopio según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho sistema óptico comprende, en dicho camino óptico principal, un objetivo (16) que recoge dicho haz generado (Lo') en dicha muestra y una lente de tubo (18), formando dicho holograma en el plano focal imagen de dicha lente de tubo.

3.- Microscopio según la reivindicación 2, caracterizado porque el sistema óptico comprende, en dicho camino óptico principal, los siguientes elementos ópticos, dispuestos en orden desde dicho punto de entrada del haz objeto (Lo) hasta los medios de registro (12): un primer divisor de haz (8) que permite el paso del haz objeto a su través, una lente

condensadora (14), un elemento porta-muestras (15), dicho objetivo (16), un espejo (23'), dicha lente de tubo (18), un segundo divisor de haz (8') que refleja el haz objeto, una lente (9), un espejo abatible o lámina separadora (10) y una lente formadora de imagen (11).

4.- Microscopio según la reivindicación 3, caracterizado porque el sistema óptico comprende, en dicho camino óptico de referencia, los siguientes elementos ópticos, dispuestos en orden desde dicho punto de entrada del haz de referencia (Lr) y los medios de registro (12): una lente colimadora de inclinación variable (7) que permite variar el ángulo que forma el haz de referencia con el eje óptico del microscopio, dicho segundo divisor de haz (8') que permite el paso del haz de referencia a su través, dicha lente (9), dicho espejo abatible o lámina separadora (10) y dicha lente formadora de imagen (11).

5.- Microscopio según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende, dispuesto entre una de las salidas del divisor de haz de luz coherente (3) y dicho punto de entrada del haz de referencia un variador de intensidad y camino óptico (5).

6.- Microscopio según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque está previsto también para la obtención de imágenes por medio de microscopía óptica, para lo cual comprende:

- una fuente de luz blanca (21) dispuesta para iluminar dicha muestra;

- una disposición de elementos ópticos que incluyen a los elementos ópticos de dicho camino óptico principal de dichosistema óptico dispuestos entre dicha fuente de luz blanca (21) y los medios de registro (12); y

- dichos medios de registro (12) que registran también una imagen óptica de dicha muestraen el plano imagen del sistema óptico.

7.- Microscopio según la reivindicación 6 cuando depende de la 4, caracterizado porque comprende además una lente (22) dispuesta a la salida de dicha fuente de luz blanca (21), un ocular (13) dispuesto para recibir el haz de luz blanca reflejado por dicho espejo abatible o lámina separadora (10) y permitir la visión directa de la imagen óptica de la muestra y un mecanismo de enfoque (17).

8.- Microscopio según la reivindicación 6 ó 7, caracterizado porque comprende unos medios de selección para seleccionar trabajar de manera alternativa según microscopía holográfica digital o según microscopía óptica.

9.- Microscopio según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende unos medios de control que controlan la operación de los elementos del microscopio y que incluyen unos medios de procesamiento en conexión con los medios de registro que reciben el holograma registrado, en formato digital, y lo procesan para calcular la fase cuantitativa de la muestra.

10.- Método para la obtención de imágenes cuantitativas de fase por medio de microscopía holográfica digital, que comprende:

- generar un haz de luz coherente y dividirlo en un haz objeto (Lo) y un haz de referencia (Lr);

- emitir dicho haz objeto (Lo) sobre una muestra para generar en la misma un correspondiente haz (Lo') por la transmisión o reflexión de dicho haz objeto sobre dicha muestra, pasando dicho haz objeto (Lo) por parte de un camino óptico principal de un sistema óptico y dicho haz generado (Lo') por el resto de dicho camino principal, donde dicho camino principal comprende unos elementos ópticos que constituyen un sistema afocal y telecéntrico formado por al menos un objetivo, para recoger dicho haz generado (Lo') en dicha muestra, y una lente de tubo; y

- registrar un holograma de dicha muestra a partir de un patrón de interferencia de dicho haz de referencia (Lr) y de dicho haz generado (Lo') en la muestra;
estando el método **caracterizado** porque comprende registrar dicho holograma en el plano imagen de dicho sistema óptico, al final de dicho camino principal.

11.- Método según la reivindicación 10, caracterizado porque dicho sistema óptico es el sistema óptico de un microscopio óptico, realizándose dicho registro de dicho holograma en unos medios de registro del microscopio óptico.

12.- Método según la reivindicación 11, caracterizado porque comprende ajustar los siguientes parámetros del microscopio óptico para proporcionar un holograma digital cuya

imagen cuantitativa de fase tenga una resolución lateral máxima y perturbación mínima, y hacer un uso optimizado del espacio ancho de banda para obtener imágenes limitadas únicamente por la difracción:

NA: apertura numérica del objetivo del microscopio óptico;

M: aumento lateral de dicho sistema telecéntrico;

Δp: tamaño de los píxeles de dichos medios de registro; y

ϕ: ángulo que forma el haz de referencia con el eje óptico del microscopio;

de manera que se cumplan las siguientes relaciones:

$$\frac{NA}{M} \leq \frac{\lambda}{\sqrt{2}\left(\sqrt{2}+3\right)\Delta p} \text{ y } \sin^{-1}\left(\frac{3}{\sqrt{8}\pi}\frac{NA}{M}\right) \leq \phi$$

donde λ es la longitud de onda del haz de luz coherente.

13.- Método según la reivindicación 12, caracterizado porque comprende capturar y procesar dicho holograma mediante la realización de las siguientes etapas de manera secuencial, en bucle cerrado:

- adquisición del holograma digital;

- cálculo de la transformada de Fourier rápida del holograma digital;

- filtrado en el dominio de Fourier del orden objeto e identificación automática del ángulo formado por el haz de referencia y su correspondiente compensación, si se trabaja fuera de eje, o corrimiento de fase, si se trabaja en eje;

- cálculo de la transformada inversa de Fourier rápida del orden objeto; y

- cálculo de la fase cuantitativa del espécimen o muestra.

14.- Programa de ordenador que incluye instrucciones de código que cuando se ejecutan en un ordenador implementan las etapas del método según la reivindicación 13.

15.- Kit para adaptar un microscopio óptico para la obtención de imágenes cuantitativas de fase por medio de microscopía holográfica digital, del tipo que comprende:

- una fuente de luz coherente (1) y un divisor de haz de luz coherente (3) conectado o a conectar a la salida de la misma para generar, por una primera salida, un haz objeto (Lo), con el que iluminar una muestra, y, por una segunda salida, un haz de referencia (Lr);

- unos primeros medios de guiado de luz coherente a conectar entre dicha primera salida de dicho divisor de haz de luz coherente (3) y un punto de entrada de un camino óptico principal del microscopio óptico que incluye unos elementos ópticos que constituyen un sistema afocal y telecéntrico y que discurre entre dicho punto de entrada y unos medios de registro (12) del microscopio óptico;

- unos segundos medios de guiado de luz coherente a conectar entre dicha segunda salida de dicho divisor de haz de luz coherente (3) y un punto de entrada de un camino óptico de referencia que comparte parte de los elementos ópticos con dicho camino óptico principal y que finaliza en dichos medios de registro (12);

- un elemento óptico a disponer en dicho camino óptico de referencia para conferirle una inclinación determinada al haz de referencia (Lr) con respecto al eje óptico del microscopio óptico;

estando el kit **caracterizado** porque comprende además:

- unos medios de soporte para soportar a dicho elemento óptico con una inclinación variable,

- unos medios de actuación para variar la inclinación del elemento óptico, actuando sobre el mismo o sobre dichos medios de soporte,

- un sistema de control en lazo cerrado para evaluar automáticamente en el espacio de Fourier una serie de parámetros del microscopio óptico que determinan el desempeño del microscopio cuando se utiliza para la obtención de imágenes cuantitativas de fase por medio de microscopía holográfica digital, determinar un valor óptimo de ángulo de inclinación ϕ para el haz de referencia (Lr), a partir del resultado de dicha evaluación, y controlar a dichos medios de actuación para que realicen dicha variación de inclinación de acuerdo con dicho valor óptimo de ángulo de inclinación ϕ.

16.- Kit según la reivindicación 15, caracterizado porque dichos medios de soporte y dichos medios de actuación comprenden una plataforma de rotación motorizada (PM) configurada para variar la inclinación del elemento óptico por el giro de la misma.

17.- Kit según la reivindicación 15 ó 16, caracterizado porque:

- dichos primeros medios de guiado de luz coherente comprenden un tramo de fibra óptica (4) con un primer extremo a conectar a dicha primera salida del divisor de haz de luz coherente (3), y un conector de fibra óptica (6) a conectar a un segundo extremo de dicho tramo de fibra óptica (4) y previsto para acoplarse a una primera abertura de entrada del microscopio óptico definida en dicho punto de entrada del camino óptico principal;

- dichos segundos medios de guiado de luz coherente comprenden un conductor de fibra óptica (4'), con un elemento variador de intensidad y camino óptico (5) incorporado, teniendo dicho conductor de fibra óptica (4') un primer extremo a conectar a dicha segunda salida del divisor de haz de luz coherente (3), y un conector de fibra óptica (6') a conectar a un segundo extremo de dicho conductor de fibra óptica (4') y previsto para acoplarse a una segunda abertura de entrada del microscopio óptico definida en dicho punto de entrada del camino óptico de referencia o a un elemento intermedio acoplado a dicha segunda abertura.

18.- Kit según la reivindicación 17 cuando depende de la 16, caracterizado porque dicho elemento intermedio es dicha plataforma de rotación motorizada (PM).

19.- Kit según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, caracterizado porque comprende además:

- un primer divisor de haz (8) a disponer en el microscopio óptico, reemplazando un primer espejo (23) del mismo dispuesto entre una fuente de luz blanca (21) y una lente condensadora (14) del microscopio óptico, de manera que dicho primer divisor de haz (8) permita el paso del haz objeto (Lo) a su través y refleje el haz de luz blanca (L1) generado por dicha fuente de luz blanca (21), o viceversa, para dirigir a ambos hacia la lente condensadora (14); y

- un segundo divisor de haz (8') a disponer en el microscopio óptico, reemplazando un segundo espejo (23'') del mismo dispuesto entre una lente de tubo (18) y una lente (9) del microscopio óptico, de manera que dicho segundo divisor de haz (8) permita el paso del

haz de referencia (Lr) a su través y refleje el haz proveniente de la lente de tubo (18), o viceversa, para dirigir a ambos hacia dichos medios de registro (12) del microscopio óptico.

20.- Kit según la reivindicación 19, caracterizado porque dicho elemento óptico de inclinación variable es una lente colimadora de inclinación variable (7) a disponer entre el punto de entrada del haz de referencia y dicho segundo divisor de haz (8').

21.- Kit según la reivindicación 15, caracterizado porque dicho sistema de control en lazo cerrado incluye un algoritmo encargado de realizar dicha determinación del valor óptimo de ángulo de inclinación ϕ de manera que se cumpla la relación del método según la reivindicación 12:

$$\sin^{-1}\left(\frac{3}{\sqrt{8}\pi}\frac{NA}{M}\right)\leq\phi$$

siendo dichos parámetros del microscopio óptico a evaluar en el espacio de Fourier: NA, M y Δp.

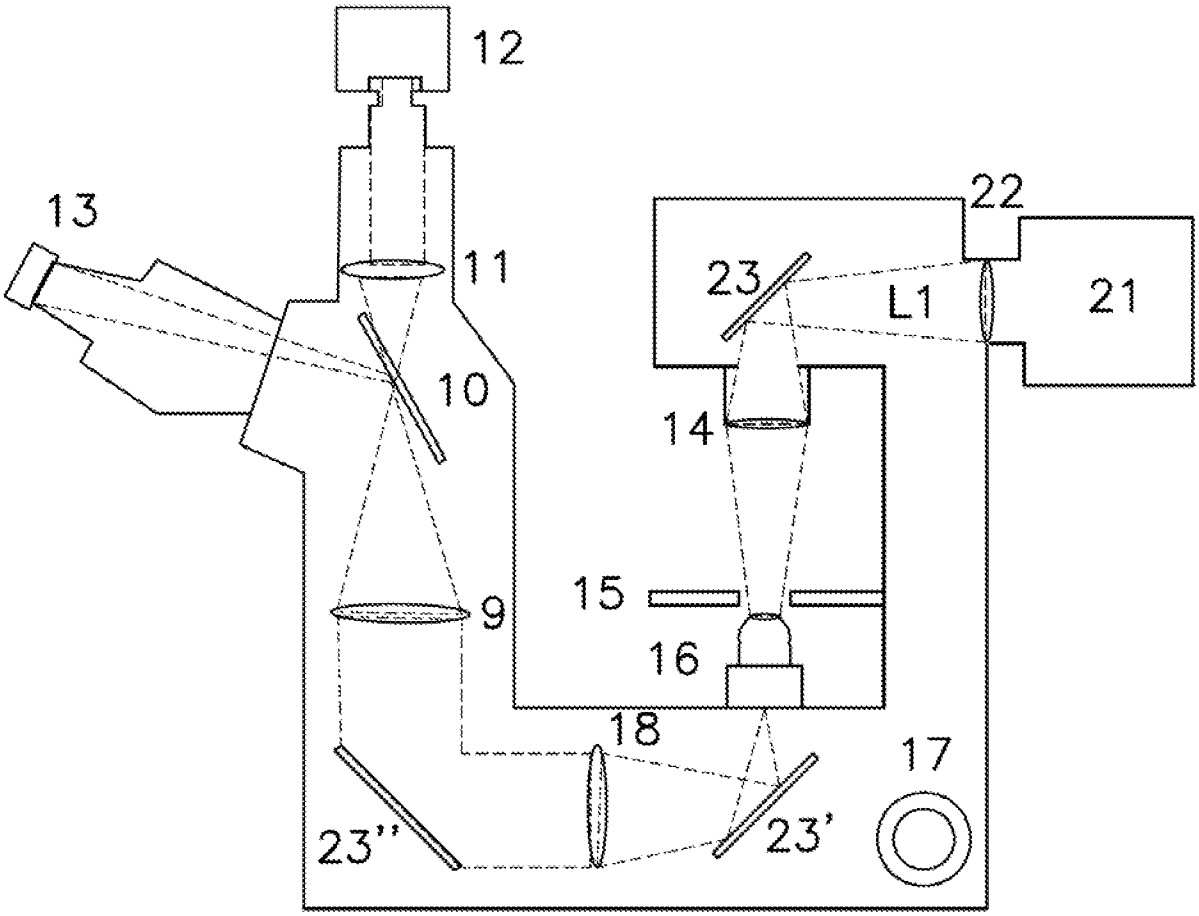


Fig. 1

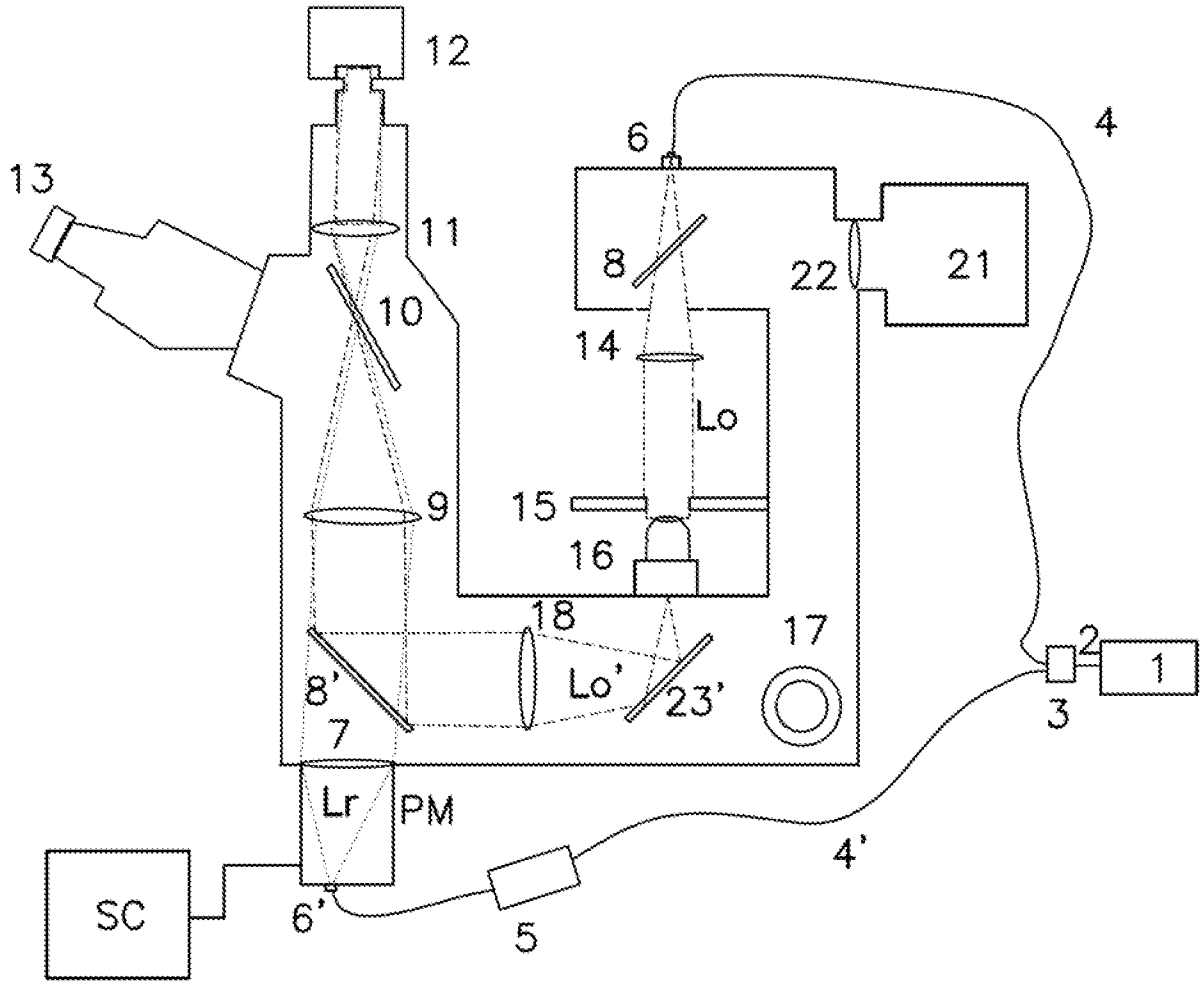


Fig.2

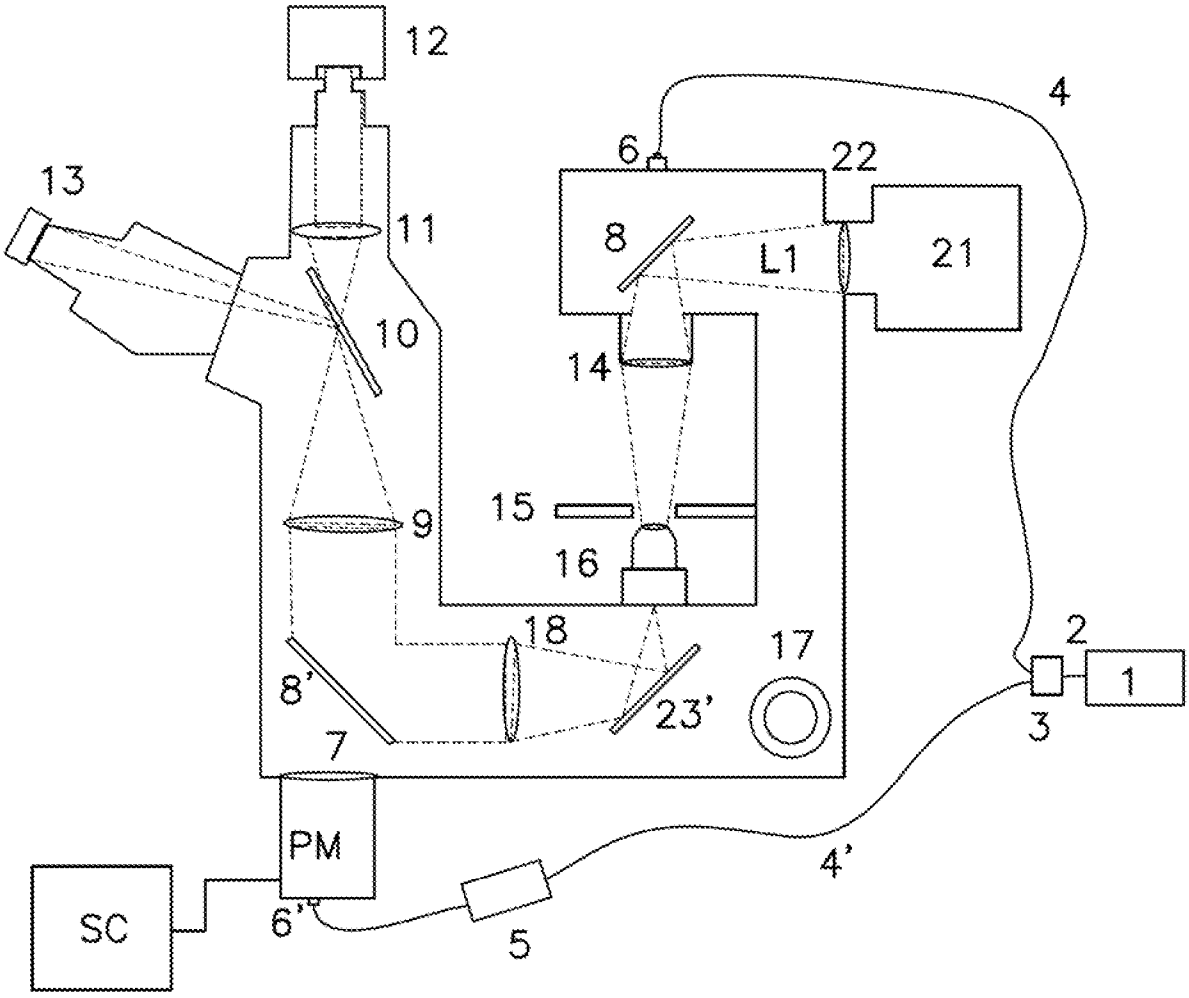
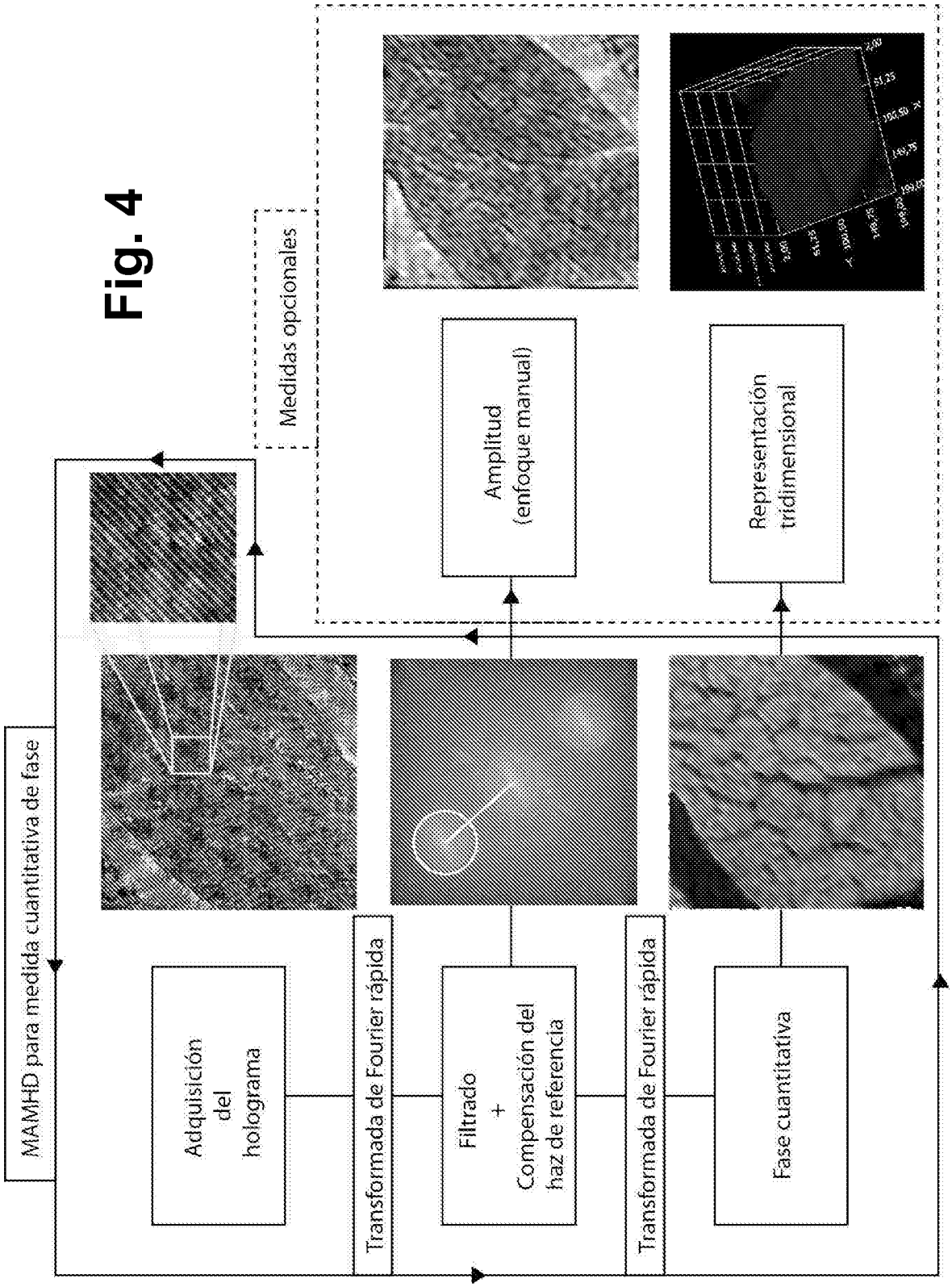


Fig.3

Fig. 4


MAMHD para medida cuantitativa de fase
Adquisición del holograma
Transformada de Fourier rápida
Filtrado + Compensación del haz de referencia
Transformada de Fourier rápida
Fase cuantitativa
Medidas opcionales
Amplitud (enfoque manual)
Representación tridimensional

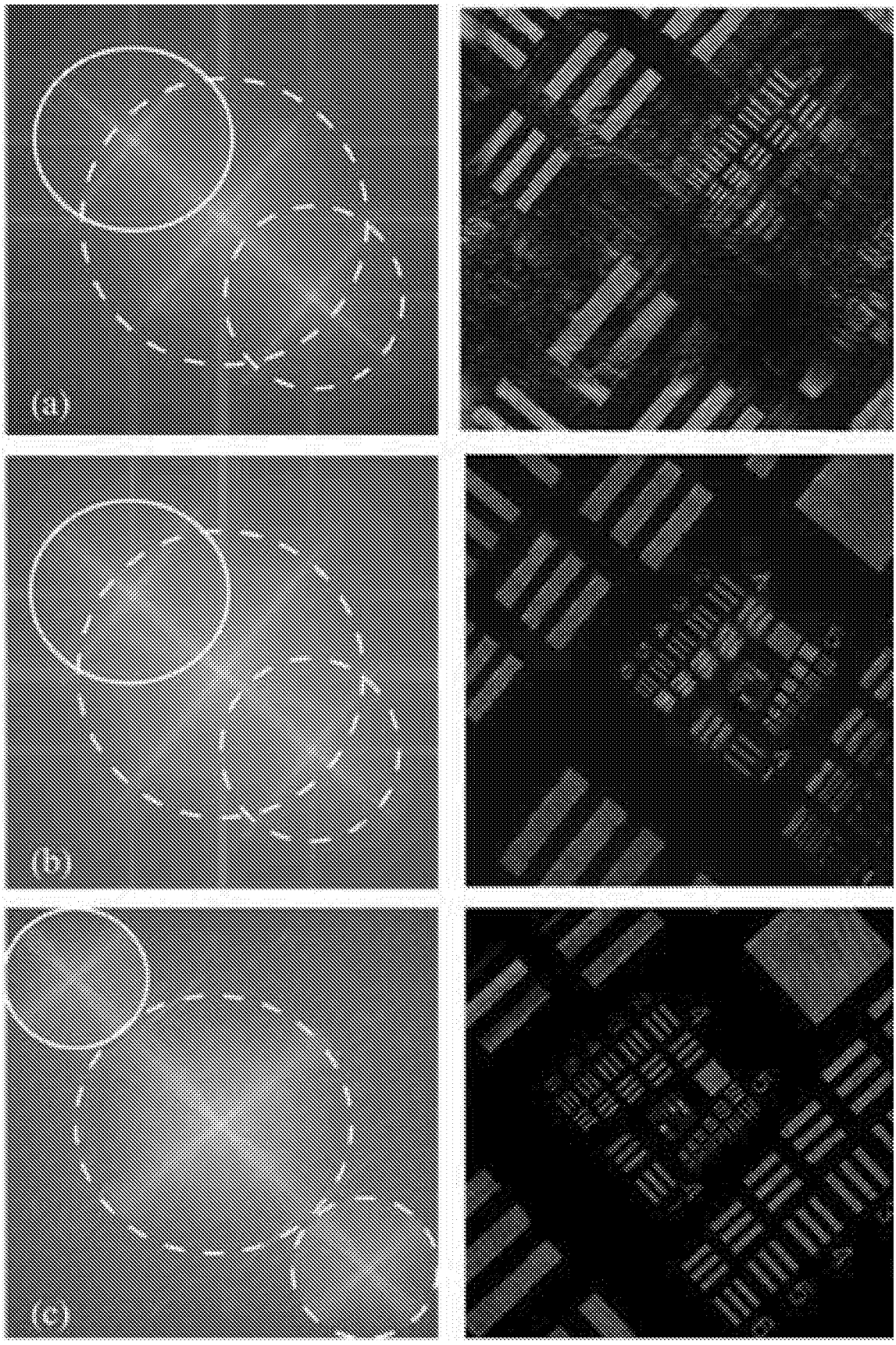
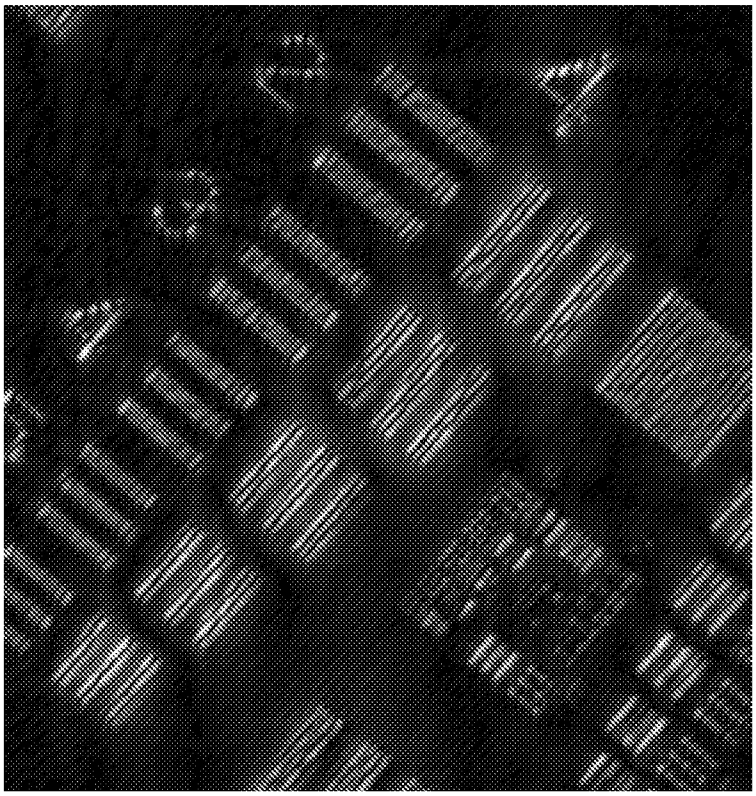
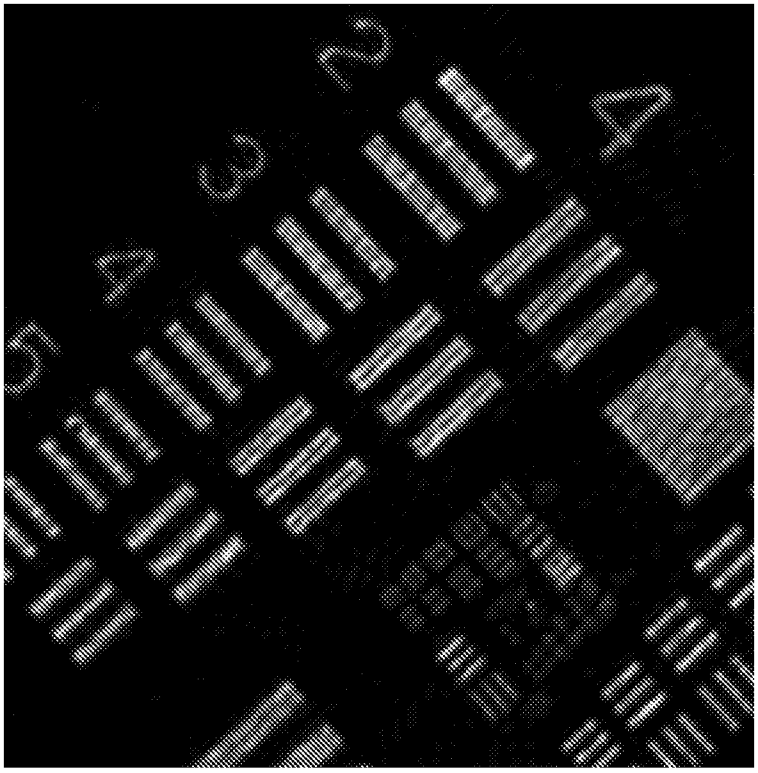


Fig. 5



b)



c)

Fig. 6

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201331584

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 30.10.2013

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2010037861 A1 (UNIV BRUXELLES et al.) 08.04.2010	1,10,15
A	WO 2011042442 A1 (DUBOIS FRANK et al.) 14.04.2011	1,10,15
A	US 2013070251 A1 (DAS BHARGAB et al.) 21.03.2013	1,10,15
A	US 2011043878 A1 (ASUNDI ANAND KRISHNA et al.) 24.02.2011	1,10,15

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
24.09.2014	M. C. González Vasserot	1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G03H1/00 (2006.01)
G02B21/36 (2006.01)
G02B26/06 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G03H, G02B

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.09.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-21	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1-21	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2010037861 A1 (UNIV BRUXELLES et al.)	08.04.2010
D02	WO 2011042442 A1 (DUBOIS FRANK et al.)	14.04.2011
D03	US 2013070251 A1 (DAS BHARGAB et al.)	21.03.2013
D04	US 2011043878 A1 (ASUNDI ANAND KRISHNA et al.)	24.02.2011

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

Los documentos citados solo muestran el estado general de la técnica, y no se consideran de particular relevancia. Así, la invención reivindicada se considera que cumple los requisitos de novedad, actividad inventiva y aplicación industrial.
1.- El objeto de la presente solicitud de patente consiste en un microscopio para la obtención de imágenes cuantitativas de fase por medio de microscopía holográfica digital, que incluye un sistema óptico afocal y telecéntrico, y más particularmente a un microscopio con unos medios de registro que registran un holograma en el plano imagen del sistema óptico.
Un segundo objeto de la invención concierne a un método para la obtención de imágenes cuantitativas de fase por medio de microscopía holográfica digital, que comprende registrar un holograma en el plano imagen de un sistema óptico afocal y telecéntrico.
Un tercer objeto de la invención concierne a un programa de ordenador adaptado para implementar parte de las etapas del método del segundo aspecto.
Un cuarto objeto de la invención concierne a un kit para adaptar un microscopio óptico para la obtención de imágenes cuantitativas de fase por medio de microscopía holográfica digital, que comprende, entre otros elementos, unos medios para controlar y variar el ángulo de inclinación de un haz de referencia.
2.- El problema planteado por el solicitante es ofrecer una alternativa al estado de la técnica que cubra las deficiencias halladas en el mismo, mediante la proporción de un Microscopio Holográfico Digital y método de operación que ofrezca unos resultados y prestaciones superiores a los conocidos en el estado de la técnica, permitiendo realizar un enfoque en tiempo real, alcanzar la resolución espacial dictada por la óptica del sistema de registros del holograma y hacer uso optimizado del espacio ancho de banda.
El documento D1 puede considerarse como el representante del estado de la técnica más cercano ya que en este documento confluyen la mayoría de las características técnicas reivindicadas.
Análisis de las reivindicaciones independientes 1,10,15
Reivindicación 1
D1 se diferencia del documento de solicitud de patente en que los medios de registro que registran el holograma de la muestra a partir de un patrón de interferencia de dicho haz de referencia y de un haz generado en la muestra por la transmisión o reflexión del haz objeto sobre la misma no registran dicho holograma en el plano imagen de dicho sistema óptico. La reivindicación 1 es nueva (Art. 6.1 LP 11/1986) y tiene actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986).
Reivindicación 10
D1 tampoco en el método se contempla registrar un holograma de la muestra a partir de un patrón de interferencia del haz de referencia y del haz generado registrando el holograma en el plano imagen del sistema óptico al final del camino principal. Por tanto la reivindicación 10 de la solicitud es nueva (Art. 6.1 LP 11/1986) y tiene actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986).
Reivindicación 15
Además tampoco en el kit para adaptar un microscopio óptico para la obtención de imágenes cuantitativas de fase por medio de microscopía holográfica digital comprende un sistema de control en lazo cerrado para evaluar automáticamente en el espacio de Fourier una serie de parámetros del microscopio óptico que determinan el desempeño del microscopio cuando se utiliza para la obtención de imágenes cuantitativas de fase promedio de microscopía holográfica digital, determinar un valor óptimo de ángulo de inclinación para el haz de referencia, a partir del resultado de dicha evaluación, y controlar a dichos medios de actuación para que realicen dicha variación de inclinación de acuerdo con dicho valor óptimo de ángulo de inclinación. Así la reivindicación 15 es nueva (Art. 6.1 LP 11/1986) y tiene actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986).
Análisis del resto de los documentos
De este modo, ni el documento D1, ni ninguno del resto de los documentos citados en el Informe del Estado de la Técnica, tomados solos o en combinación, revelan la invención en estudio tal y como es definida en las reivindicaciones independientes, de modo que los documentos citados solo muestran el estado general de la técnica, y no se consideran de particular relevancia. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia a una combinación que pudiera hacer evidente la invención definida por estas reivindicaciones y no se considera obvio para una persona experta en la materia aplicar las características incluidas en los documentos citados y llegar a la invención como se revela en la misma.