

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
27 de enero de 2011 (27.01.2011)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2011/009974 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes: Sin clasificar

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2010/000310

(22) Fecha de presentación internacional:
16 de julio de 2010 (16.07.2010)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200901614 20 de julio de 2009 (20.07.2009) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID** [ES/ES]; Calle Ramiro de Maeztu, 7, OTRI-Vicerrectorado de Investigación, Universidad Politécnica de Madrid, E-28040 Madrid (ES).

(72) Inventor; e

(75) Inventor/Solicitante (para US solamente): **NAVARRO TOBAR, Álvaro** [ES/ES]; Calle Ramiro de Maeztu, 7, OTRI-Vicerrectorado de Investigación, Universidad Politécnica de Madrid, E-28040 Madrid (ES).

(74) Representante común: **UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID**; Calle Ramiro de

Maeztu, 7, OTRI-Vicerrectorado de Investigación, Universidad Politécnica de Madrid, E-28040 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: METHOD AND SYSTEM FOR MEASURING FLUORESCENCE LIFETIME IN THE FREQUENCY DOMAIN WITH HIGH BACKGROUND SIGNAL LEVELS

(54) Título : MÉTODO Y SISTEMA DE MEDIDA DEL TIEMPO DE VIDA DE FLUORESCENCIA EN EL DOMINIO DE LA FRECUENCIA CON ALTOS NIVELES DE SEÑAL DE FONDO

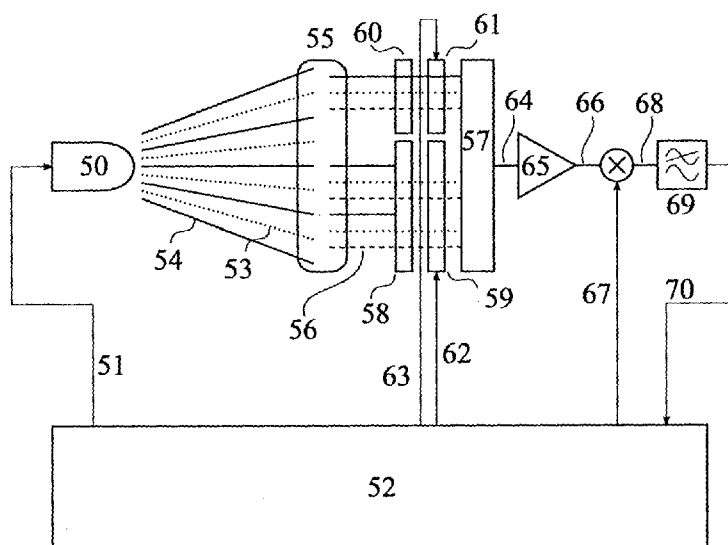


Fig 10

(57) Abstract: Measuring the half-life of fluorescence emission in the frequency domain is made difficult by the presence of background signals. A method and apparatus are proposed for detecting said lifetime even when the fluorescence is much lower than the background, without the need for a calibration sample, based on successive exploration of states in the system. The feature of these states is that the background signal is constant, whereas the signal of interest changes. The signal of interest may be recovered by cancelling the common signal. This method may be used to eliminate the effect of light dispersed by excitation, autofluorescence and electromagnetic interference.

(57) Resumen: La medida del tiempo de vida medio de la emisión fluorescente en el dominio de la frecuencia se ve dificultada por la presencia de señales de fondo. Se propone un método y un aparato para detectar dicho tiempo de vida incluso cuando la fluorescencia es mucho menor que el

[Continúa en la página siguiente]

**Publicada:**

- *sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))*

fondo, sin necesidad de una muestra de calibración, basado en una exploración sucesiva de estados en el sistema. Lo característico de estos estados es que la señal de fondo se mantiene constante, mientras que la señal de interés cambia. La señal de interés se podrá recuperar realizando una cancelación de la señal común. Esta técnica se puede utilizar para eliminar el efecto de la luz dispersada de excitación, de la autofluorescencia, y de la interferencia electromagnética.

TÍTULO

Método y sistema de medida del tiempo de vida de fluorescencia en el dominio de la frecuencia con altos niveles de señal de fondo

5 SECTOR TÉCNICO

La invención se encuadra en el sector de la química analítica. La detección del tiempo de vida de sustancias fluorescentes encuentra aplicación en diferentes sectores como los análisis clínicos, la detección de contaminantes en agua, procesos de control en la industria alimentaria, la medida de diversas magnitudes ambientales, etc.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Dado que la técnica de la medida del tiempo de vida de la fluorescencia en el dominio de la frecuencia se conoce y se utiliza desde hace varias décadas, está profundamente documentada en una gran cantidad de textos, artículos y patentes. Una excelente explicación de la técnica en sí, sus principios, su evolución histórica, y los avances recientes se puede encontrar en el libro "Principles of Fluorescence Spectroscopy", de Joseph R. Lakowicz, ed. Springer, Cap. 5.

Una gran cantidad de sustancias presenta emisión fluorescente y/o fosforescente. De aquí en adelante se empleará el término fluorescencia aunque todo lo dicho es aplicable también a la fosforescencia o cualquier otro tipo de fotoluminiscencia. Típicamente, al iluminar con luz de determinada longitud de onda dentro del rango de absorción de la sustancia, la fluorescencia puede ser observada como una emisión de luz en un rango de longitudes de onda mayores que las de la señal de excitación. Este fenómeno se puede caracterizar con diferentes magnitudes, como los rangos de longitudes de onda de excitación y emisión, la intensidad de dichas señales, o el tiempo de vida medio de la emisión. El perfil de decaimiento de la emisión fluorescente viene caracterizado por la caída de la intensidad con el tiempo una vez suprimida la fuente de excitación. Dicha caída toma a menudo una forma de caída monoexponencial, aunque diferentes circunstancias, como la presencia de varios fluoróforos o la inhomogeneidad de la muestra, hacen que dicho perfil se aproxime a menudo a una caída multiexponencial. En la figura 1 se puede observar un ejemplo del típico patrón de decaimiento de una

emisión fluorescente. El pulso de excitación (1) activa la emisión fluorescente (2 y 3) de distintos fluoróforos. La señal compuesta de caída en este ejemplo sería una caída biexponencial (4). La información que proporciona la medida de el (los) tiempo(s) de vida medio(s) es a menudo de utilidad dado que se ve modificado por diversos factores que estén afectando a la sustancia fluorescente.

Para medir dicho tiempo de vida, existen dos tipos fundamentales de métodos, los basados en medidas en el dominio del tiempo y aquellos basados en medidas en el dominio de la frecuencia, ambos de uso muy extendido. Los basados en el dominio del tiempo se basan en la medida directa del tiempo de caída con instrumentación a menudo compleja y sofisticada, como es el método de conteo de fotones individuales correlado en el tiempo (*time-correlated single photon counting*). Los métodos basados en el dominio de la frecuencia, a los que esta invención se refiere, se basan en la excitación de la muestra con una intensidad de luz modulada a determinada frecuencia, y la detección de la información de fase y amplitud de la señal fluorescente emitida.

La respuesta de una sustancia fluorescente ante una excitación modulada a una frecuencia determinada f es una señal también modulada a esa misma frecuencia y caracterizada por una determinada amplitud y un desfase con respecto a la señal de excitación. Dado que las señales de excitación y de fluorescencia comparten la misma frecuencia y se diferencian en su amplitud y fase, es común representar ambas por un vector complejo llamado fasor, cuyo módulo y fase se corresponden con la amplitud y el desfase de la sinusoidal correspondiente, respectivamente. Dado que el fasor es un número complejo, queda también completamente definido expresándolo en su forma cartesiana ($a + j \cdot b$), refiriéndonos a él entonces por su parte real y su parte imaginaria. A lo largo de este documento se usará la referencia al módulo, fase, parte o componente real o imaginaria de una señal para referirse a la característica correspondiente del fasor asociado.

Para una sustancia cuya fluorescencia presenta una evolución temporal que se aproxima a una caída multi-exponencial, de acuerdo con la siguiente expresión:

$$I_f(t) = \sum_i \alpha_i \cdot e^{-t/\tau_i}$$

La dependencia de la amplitud (normalizada al valor de bajas frecuencias) y la fase de la señal fluorescente (con respecto a la señal de excitación) viene determinada por el módulo y la fase del fasor complejo $I_f(f)$ (siendo $j = \sqrt{-1}$ la unidad imaginaria):

$$I_f(f) = \frac{\sum_i \frac{\alpha_i \tau_i}{1 + j2\pi f \tau_i}}{\sum_i \alpha_i \tau_i} = \frac{1}{\sum_i \alpha_i \tau_i} \left(\sum_i \frac{\alpha_i \tau_i}{1 + (2\pi f \tau_i)^2} - j \sum_i \frac{\alpha_i 2\pi f \tau_i^2}{1 + (2\pi f \tau_i)^2} \right)$$

Que, para el caso de una caída mono-exponencial, se simplifica a:

$$I_f(f) = \frac{1}{1 + (2\pi f \tau)^2} (1 - j2\pi f \tau) \Rightarrow \begin{cases} A(f) = \frac{1}{\sqrt{1 + (2\pi f \tau)^2}} \\ \phi(f) = \arctan(2\pi f \tau) \end{cases}$$

Siendo $A(f)$ el módulo del fasor y $\phi(f)$ la fase del mismo.

- 10 De estas ecuaciones se deduce que al excitar la sustancia fluorescente con luz modulada sinusoidalmente, la emisión será también una señal modulada sinusoidalmente, cuya amplitud de modulación disminuirá, y cuya fase crecerá con la frecuencia. Este efecto se ilustra en la figura 2 en el dominio del tiempo, y en la figura 3 en el dominio de la frecuencia para una caída monoexponencial. En la figura 2 se representa la amplitud de modulación normalizada de la señal de excitación (5) y la señal fluorescente (6) para el caso de $f = 1/2\pi\tau$. Se puede observar que la señal fluorescente (6) se ha desfasado con respecto de la de excitación (5). En la figura 3 se representa la amplitud (7) y la fase (8) en función de la frecuencia (normalizada al valor $1/2\pi\tau$). Como se puede observar, la amplitud (7) decrece al aumentar la frecuencia, mientras que la fase (8) aumenta de 0° a 90° .

A partir de datos sobre la amplitud y la fase de modulación de la señal fluorescente en el dominio de la frecuencia se puede, por tanto, obtener información sobre las constantes que caracterizan la caída temporal de la fluorescencia. Según la cantidad de datos

aportados, sean estos una exploración continua del espectro de frecuencias en amplitud y fase, o incluso la simple medida de la fase a una frecuencia determinada, será mayor o menor la información que se pueda deducir. Según la información que se desee obtener en cada experimento y los límites en los que se conoce a priori que puede variar dicha información, será necesario realizar un barrido más o menos exhaustivo.

En los sistemas más completos, se realiza un barrido exhaustivo de frecuencias registrando la amplitud de la modulación y el desfase, y se hace un ajuste de los resultados a un modelo uni- o multi-exponencial, obteniendo como resultado los valores de tiempos de vida τ_i e intensidades relativas α_i deseados. En equipos para aplicaciones más específicas o con mayores requisitos de portabilidad, a menudo no es necesario obtener información tan completa o tan robusta sobre los tiempos de vida. En estas aplicaciones a menudo se ignora la información de amplitud, ya que esta está sujeta a derivas, como por ejemplo por la disminución de moléculas de fluoróforo o las variaciones a largo plazo de intensidad de la fuente de excitación, y se trabaja únicamente con la fase, proporcionando una medida más robusta frente a este tipo de variaciones. Existen aparatos en el mercado, de hecho, en los que la medida se obtiene únicamente de la medida de la fase a una única frecuencia de modulación, ya que esto es suficiente para obtener la información que se desea en la aplicación para la que están diseñados. Habitualmente se obtiene la amplitud de la modulación y/o la fase a través de un esquema de correlación cruzada o demodulación heterodina de la señal (siendo la frecuencia de modulación de la excitación f_s , se multiplica la señal por una portadora de una frecuencia $f_s + f_i$, con el resultado de obtener una señal en una frecuencia intermedia f_i , que contiene la información de la amplitud y la fase inicial).

En un sistema real la señal medida se encuentra contaminada por un fondo de medida (background) debido a una serie de señales que dificultan la correcta medida de la información de amplitud y fase.

$$I_m(f) = I_f(f) + I_b(f)$$

30

Entre estas señales interferentes $I_b(f)$ podemos contar, entre otras:

- Luz procedente de la fuente de excitación que alcanza el detector. Esto puede suceder por varios motivos, y, por lo general, se intenta evitar en el mayor grado posible a la hora de diseñar el sistema, con la utilización de filtros ópticos y disposiciones geométricas que minimicen este efecto. Esta luz puede ser del
5 rango de longitudes de onda usado para excitación (lo cual se suele solucionar con un filtro de fluorescencia que la elimina entre la muestra y el fotodetector) o en el rango de longitudes de onda de la fluorescencia (lo que se suele solucionar con un filtro de excitación entre la muestra y la fuente de excitación). Esta señal de fondo tiene siempre fase 0 con respecto a la señal de excitación y su amplitud
10 sufrirá muy pequeñas o nulas variaciones con la frecuencia. En la figura 4 se representa el efecto de la presencia de radiación procedente de la fuente de excitación en la medida de fluorescencia en el dominio de la frecuencia, sobre la amplitud (7) y la fase (8) de la señal, para valores del cociente $|I_b/I_f|$ de 0, 0.5, 1, 2 y 5. Cuanto mayor es la proporción de señal de fondo, más se aleja el
15 comportamiento en frecuencia del ideal, ilustrado en la figura 3.
- Luz procedente de autofluorescencia: la muestra a caracterizar puede contener otras sustancias fluorescentes que no sean de interés. Cuanto más similares sean estas señales a la de interés, más difícil será separar su efecto del de la señal. Las
20 diferencias entre la señal de fluorescencia y la de autofluorescencia pueden ser, principalmente, de rangos de longitud de onda de excitación y fluorescencia (en cuyo caso se podrá eliminar o reducir mediante filtrado óptico), y de separación de su(s) tiempo(s) de vida característico(s) con el (los) de la sustancia de interés (si son mucho mayores serán de poco interés pues la señal se habrá extinguido a
25 la frecuencia de exploración, mientras que si son mucho menores su efecto sobre la medida será similar al de la luz procedente de la excitación).
- Interferencia electromagnética entre el subsistema de modulación de intensidad de la excitación y el de amplificación de la señal fluorescente. Dado que las
30 frecuencias de funcionamiento de estos sistemas suelen estar entre 10 kHz y 1 GHz, existe la posibilidad que en un sistema en el que la fuente de excitación y el fotodetector están físicamente cerca y no lo suficientemente bien apantallados,

se produzca un acoplo de esta señal en el circuito de amplificación de la señal medida. Una señal de esta naturaleza tendrá una fase y una amplitud fuertemente dependientes de la frecuencia de modulación.

- 5 La presencia de estas señales de fondo dificulta la extracción de información útil de la medida de fluorescencia. En la medida de lo posible, y en función de la naturaleza de esta señal de fondo, se podrá intentar eliminar por diversas técnicas, atacando la causa del problema o intentando caracterizarla para poder restarla de la medida a posteriori. La sustracción de la señal de fondo, sin embargo, presenta el problema de la
- 10 propagación de errores. Si la señal de fondo es mayor que la propia señal fluorescente, una pequeña indeterminación en su medida se transformará en un error de magnitud comparable a la propia señal de fluorescencia. La manera de aliviar este problema es la mejor determinación de la señal de fondo.
- 15 La presencia de estas señales de fondo es precisamente uno de los mayores inconvenientes a la hora de conseguir un sistema de bajo coste y alto grado de miniaturización, dado que su cancelación requiere frecuentemente el diseño de un sistema con mayor complejidad óptica, con filtros, lentes, con componentes optoelectrónicos alejados entre sí y con fotodetectores de alta sensibilidad
- 20 (fotomultiplicadores y fotodiodos de avalancha).

El desarrollo de técnicas que permitan eliminar o reducir la influencia de las señales de fondo en la medida ha despertado y despierta un gran interés en la comunidad científica internacional.

- 25 Joseph R. Lakowicz, en el artículo "Correction for Contaminant Fluorescence in Frequency-Domain Fluorometry", publicado en la revista Analytical Biochemistry (año 1987), describe las bases de la sustracción de la señal de fondo, prestando atención especial a la propagación de errores. Sin embargo, su método requiere una medida
- 30 previa de las características de la señal de fondo con una muestra que no presente fluorescencia.

Gregory D. Reinhart, en el artículo "A Method for On-Line Background Subtraction in Frequency Domain Fluorometry", publicado en la revista Journal of Fluorescence (año 1991), describe un método en el que no es relevante la complejidad de la caída de la amplitud de fluorescencia. Sin embargo, nuevamente, es necesaria una medida en la que sólo se encuentra presente la señal atribuida al fondo.

Joseph R. Lakowicz, en el artículo "Background Suppression in Frequency-Domain Fluorometry", publicado en Analytical Biochemistry (año 2000) propone un método para eliminar la influencia de la señal de autofluorescencia cuando esta es de un tiempo de vida mucho menor que el de la señal de interés, y en el que no requiere la medida de una muestra "en blanco", gracias a la utilización de un fotomultiplicador con enventanado temporal. Sin embargo, es necesario tener una referencia simultánea a la medida de una muestra patrón con tiempo de vida conocido. La demostración experimental de este método fue reportada por Petr Herman en el artículo "Real-time background suppression during frequency domain lifetime measurements", publicado en Analytical Biochemistry (año 2001).

En el documento US 4150295 se describe un método para la eliminación de la autofluorescencia cuando esta tiene un espectro óptico de emisión mucho más ancho que el de la muestra de interés, y se sugiere la posibilidad de eliminarlo por técnica de enventanado en el dominio del tiempo.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El propósito de esta invención es la recuperación de la señal de interés de una medida del tiempo de vida de fluorescencia en el dominio de la frecuencia, en la que dicha señal puede ser mucho menor que la señal de fondo presente en la medida, sin la necesidad de realizar previamente o paralelamente una calibración de dicho fondo con una muestra conocida. La recuperación se basa en la inspección de la amplitud y/o la fase de modulación de la señal medida, y la exploración secuencial a través de varios estados en los que la señal de fondo se mantiene constante, para poder recuperar la señal de interés mediante la extracción de la señal cuya variación es sincrónica con el control de la variación entre estados. Este método permite la recuperación de una señal de fluorescencia mucho menor que el nivel de fondo, lo cual flexibiliza el diseño del sistema óptico, permitiendo el abaratamiento del mismo y una mayor miniaturización, al poder lograrse una mayor integración espacial sin aumentar con ello el efecto las señales interferentes sobre la medida.

A modo de introducción, y para facilitar la comprensión de la descripción, se resumen aquí brevemente las distintas realizaciones para eliminar la señal de fondo que se proponen:

1. Eliminación de una señal de fondo óptica, como la señal del emisor que alcanza el detector, o la señal de autofluorescencia. La cancelación se basa en que en este caso la señal de interés varía con la frecuencia de modulación, mientras que la señal no deseada se mantiene constante, o tiene una variación conocida, por lo que a partir de la información correspondiente a varias frecuencias de modulación se puede cancelar la parte común.

En el caso de que la construcción del sistema electro-óptico imponga variaciones en la señal (cambios de amplitud con la frecuencia, retardos que producen desfases, etc.) se proponen dos alternativas para normalizar esta señal antes de sustraer la parte común, y así poder seguir aplicando este sistema de detección:

1.1 Calibración previa del sistema.

1.2 Calibración del sistema durante la propia medida. Se proponen dos realizaciones, una en la que la calibración se realiza con un fotodetector adicional, y otra en la que la calibración se realiza con el mismo fotodetector, modificando las características de la luz que lo alcanza.

5

Además, se proponen dos realizaciones que tienen en cuenta sólo parte de la información del fasor medido, para obtener ventajas en exactitud de la medida o simplicidad del sistema:

10 1.3 Recuperación de la información de interés de la fluorescencia a partir únicamente de la parte real del fasor.

1.4 Recuperación de la información de interés de la fluorescencia a partir únicamente del módulo del fasor.

15

2. Eliminación de una señal de fondo electromagnética, que se mantiene constante al impedir el paso de luz por el sistema de medida. Al mantenerse constante la señal no deseada al bloquear el paso de la luz al detector, se podrán obtener medidas en ambas situaciones y eliminar la parte común, siendo la señal

20 resultante la de interés.

Por lo general, la variación entre los distintos estados se repetirá periódicamente, de tal manera que se mejore la robustez contra derivas de distintos componentes opto-electrónicos u otros factores ambientales que puedan modificar la medida, y que

25 cambien en rangos temporales más lentos que la frecuencia de repetición. Además de esto, una exploración periódica permite aumentar en tiempo real el tiempo de integración de la medida en caso de que sea necesario reducir el ruido presente en la medida, o para conseguir recuperar una señal más pequeña de lo habitual. Este esquema de realización es más robusto a ruido, interferencias externas, y derivas de los

30 componentes, ya que sólo las componentes de señal que varían de manera síncrona con el cambio de estado son detectadas. Sin embargo, es posible una realización en la que la secuencia de medición de estados se realiza una sola vez y no de manera repetitiva.

Por lo general, el sistema optoelectrónico constará de:

- 5 - Un subsistema de generación de luz de excitación modulada: típicamente un *diodo emisor de luz (LED) o diodo láser (LD)*, aunque no se excluyen otras realizaciones, como una fuente de luz no modulada seguida de un electromodulador, o cualquier otro medio presente o futuro.
 - Una muestra fluorescente a caracterizar
 - Un subsistema de detección de luz: típicamente compuesto por un fotodetector y
10 un subsistema de amplificación y/o demodulación apropiado, aunque no se excluyen otras realizaciones, tanto presentes como futuras.
 - Un subsistema de cancelación de la señal común: típicamente esta tarea será realizada por un subsistema digital, aunque no se excluyen otras realizaciones.
- 15 Por simplicidad, y sin pérdida de generalidad, se van a utilizar en esta descripción las ecuaciones correspondientes al caso de que la fluorescencia presente una caída monoexponencial. Generalmente se producirá una conversión de la señal medida por el fotodetector a una frecuencia intermedia, lo que es denominado método de correlación cruzada, o demodulación heterodina. La conversión se realizará por cualquiera de los
- 20 métodos habituales, como la modulación de la ganancia del fotodetector (fotomultiplicador o fotodiodo de avalancha) o multiplicación analógica de la señal eléctrica por la portadora de demodulación. La señal a la salida de este sistema, que contendrá información sobre la amplitud y la fase de la señal captada por el fotodetector, será analizada para recuperar la componente cuya variación es sincrónica
- 25 con el cambio de estado del sistema, y eliminar la componente común. La manera concreta en la que se realiza esta cancelación dependerá del caso concreto. En una aproximación más simple, se podría considerar que la variación se produce entre dos estados y la señal medida una señal eléctrica cuasi-continua que varía al variar dicho parámetro. Aplicando una técnica de demodulación lock-in, se podría extraer la señal de
- 30 interés cancelando el valor de continua que permanece constante durante toda la medida, que se correspondería con la señal de fondo. En situaciones más complejas, como la del caso en que se desee una exploración de más de dos estados, o cuando se

desee realizar algún cálculo matemático sobre la señal dicha cancelación puede ser realizada mediante procesamiento digital de señal tras una digitalización. Sin embargo no se excluyen otras posibles realizaciones para la cancelación de la señal común.

- 5 A continuación se van a describir las diferentes estrategias para aplicar este método a la cancelación de una señal de fondo de tipo luz de excitación y a una de tipo acoplo electromagnético.

1. Eliminación de una señal de fondo óptica cuya amplitud y fase de modulación
10 permanece constante (o tiene una variación conocida) con la variación de la frecuencia de modulación. Esta señal se corresponde con la señal de la fuente de excitación que alcanza el fotodetector, generalmente por deficiencias en el filtrado óptico. También es aplicable este método a la eliminación de la autofluorescencia de la muestra, que puede producirse, por ejemplo, por la presencia de otras sustancias fluorescentes en la misma,
15 y cuya medición no es de interés. En este caso, será preciso que el tiempo de vida de esta fluorescencia parásita que se desea eliminar sea o bien mayor o bien menor que el de la muestra a medir, pero con una separación espectral suficiente como para que se pueda separar su efecto y ser considerada una señal de amplitud y fase constantes (si su tiempo de vida es mucho menor que el de la muestra) o de amplitud despreciable y fase
20 irrelevante (si su tiempo de vida es mucho mayor que el de la muestra). También es aplicable este método para eliminar la posible fluorescencia del filtro óptico paso-largo utilizado para impedir la llegada de luz en longitudes de onda de excitación al fotodetector (es sabido que los filtros de vidrio coloreado presentan un cierto grado de fotoluminiscencia).

- 25 Este método se basa en que la señal óptica de excitación permanece constante al realizar una exploración de frecuencias, mientras que la señal fluorescente decrece en amplitud y se desfasa con respecto a la de excitación al aumentar la frecuencia de modulación. Si por razón de la arquitectura del sistema no fuera cierto que esta señal de excitación es
30 constante (y por tanto que la señal de fluorescencia de interés se encuentra también modificada por este mismo patrón), habría que realizar una corrección sobre la señal medida (que incluye la señal de fluorescencia de interés y la señal de fondo) para

corregir esta desviación, y poder anular el efecto de la señal de fondo y hacer significativa la medida de fluorescencia. Este puede ser el caso, por ejemplo, de un sistema en el que se use como fuente de luz de excitación un LED cuya velocidad no es lo suficientemente alta y por tanto su amplitud de modulación disminuye con la frecuencia, o un sistema con un cierto retardo constante, que se manifestaría como un aumento lineal de la fase de la señal medida con la frecuencia. En el presente documento se proponen dos realizaciones para llevar a cabo esta calibración, pero se va a describir primero el método de cancelación en caso de que esta no sea necesaria.

- La eliminación de la señal de fondo en el caso de que se pueda suponer constante la señal de fondo óptica se realiza haciendo una exploración secuencial de un determinado número de frecuencias de modulación de la excitación en el rango apropiado para obtener información sobre el tiempo de vida de la sustancia de interés. Si consideramos un sistema en el que se encuentran presentes, además de la señal de fluorescencia, señal debida a la excitación y a autofluorescencia de mayor y menor tiempo de vida, se puede expresar la señal que llega al fotodetector por el fasor complejo (se ha supuesto, por simplicidad y sin pérdida de generalidad, que todas las contribuciones son monoexponenciales):

$$I_m(f) = A_0 + \frac{a_{lf}}{1 + j2\pi f\tau_{lf}} + \frac{a_f}{1 + j2\pi f\tau_f} + \frac{a_{hf}}{1 + j2\pi f\tau_{hf}}$$

- Donde A_0 representa la señal invariante con la frecuencia y en fase 0, que se correspondería con la excitación, el segundo término agrupa las contribuciones fluorescentes con un tiempo de vida largo ($\tau_{lf} \gg \tau_f$), el tercer término se corresponde con la señal fluorescente de interés, y el cuarto término representa las contribuciones fluorescentes con un tiempo de vida corto ($\tau_{hf} \ll \tau_f$). El segundo término, correspondiente a señales con tiempo de vida largo, se puede despreciar, ya que a las frecuencias de exploración su amplitud habrá disminuido en gran medida, y no afectará a la medida. El cuarto término, por el contrario, no se puede despreciar, pero su efecto se puede incluir dentro de del primero, el de la excitación, ya que para las frecuencias de excitación que se explorarán, se cumplirá:

$$f \ll \frac{1}{2\pi\tau_{hf}} \Rightarrow \frac{a_{hf}}{1 + j2\pi f\tau_{hf}} \approx a_{hf}$$

Por tanto, la expresión anterior del fasor de señal medida será equivalente a la siguiente, en el que se han separado además la parte real y la imaginaria:

$$I_m(f) = A_0 + \frac{a_f}{1 + j2\pi f\tau_f} = \left[A_0 + \frac{a_f}{1 + (2\pi f\tau_f)^2} \right] + j \left[\frac{a_f 2\pi f\tau_f}{1 + (2\pi f\tau_f)^2} \right]$$

5

Dado que la presencia de un alto valor de A_0 dificulta y llega a imposibilitar la obtención de una medida correcta tanto de la fase como de la amplitud de la fluorescencia, es necesario eliminarlo. Al realizar una exploración en varias frecuencias alrededor de la frecuencia de interés es posible eliminar el efecto de la señal que permanece constante en todas ellas y extraer la información que varía. Esto se puede realizar de varias maneras, aunque a continuación se describe una de ellas. Se hace un barrido por un determinado conjunto de frecuencias que se repite periódicamente, y se registra el valor del fasor de señal medida en un sistema digital. En dicho sistema digital se mantiene un conjunto de variables que se corresponden con las frecuencias del barrido y que llamaremos “valor acumulado”, en la que se registra la información completa (real e imaginaria) del fasor medido. En cada ciclo, al valor acumulado de cada frecuencia, se le suma el valor medido de la frecuencia correspondiente, y se resta el valor medido correspondiente a la frecuencia de mayor valor (u otra cualquiera). De este modo, tras una sucesión suficientemente alta de ciclos de medición, se tienen los valores acumulados correspondientes a cada una de las frecuencias, libres de ruido y libres de la influencia de la señal de fondo. Estos valores se podrán ajustar con la fórmula correspondiente o realizar algún otro tipo de procesamiento que permita deducir la información útil deseada de la medida.

25 La gran ventaja de este método consiste en que la cancelación de la señal de fondo correspondiente a la excitación y a la autofluorescencia se elimina durante la propia medida sin necesidad de hacer ninguna medida ni calibración previa con una muestra patrón. La cancelación se basa precisamente en el hecho de que por su propia

naturaleza, la señal de interés tiene unas características variables con la frecuencia, mientras que la señal de fondo se mantiene constante. En los métodos existentes en el estado de la técnica, la cancelación de esta señal siempre se lleva a cabo mediante una anulación real (mediante elementos ópticos) o mediante la substracción de la señal de fondo, caracterizada en otra medida con una muestra patrón.

1.1 Calibración previa a la medida del error producido por la variación de A_0 con la frecuencia y posterior corrección. Si la señal de excitación no presenta una amplitud y fase de modulación constantes en todo el rango de frecuencias, se puede caracterizar la variación de esta señal de excitación con respecto a la frecuencia y luego aplicar esta calibración para corregir el valor medido. Dado que la fluorescencia es excitada precisamente con esta señal, su amplitud y fase se ven modificadas en la misma manera, por lo que la intensidad medida podría ser expresada como:

$$I_m(f) = A_0(f) \cdot \left(1 + \frac{a_f'}{1 + j2\pi f \tau_f} \right)$$

Donde esta vez $A_0(f)$ no se considera un valor real constante sino un número complejo variable con la frecuencia. Si es posible medir la respuesta del sistema en unas condiciones en las que la intensidad de fluorescencia sea 0 (o su respuesta temporal es perfectamente conocida), es posible medir la característica de variación $A_0(f)$. Una vez hecho esto, será suficiente con dividir cada medida por el patrón de calibración $A_0(f_i)$, obteniendo así un valor corregido del fasor medido, en el que la señal correspondiente a la excitación se mantiene constante con la frecuencia.

Nótese que esta calibración es conceptualmente distinta a la calibración de muestra patrón realizada habitualmente en el estado de la técnica. La calibración con muestra patrón suele corresponderse con una medida exacta del valor de fondo que luego será substraído de la señal. En esta alternativa se propone una calibración del patrón de variación de la señal de excitación para la correcta normalización de la señal medida, que permitirá la posterior cancelación de la señal de fondo al suprimir la parte que permanece invariante al cambiar la frecuencia. La diferencia entre estos dos esquemas de calibración previa, que pueden resultar similares a primera vista, queda manifiesta al

observar distintos fenómenos que el método propuesto es capaz de suprimir y el de sustracción directa (usado en el estado de la técnica) no:

1. Variación de la señal autofluorescente: causado, por ejemplo por que la muestra bajo análisis tiene una mayor concentración de sustancias fluorescentes parásitas que la que se usó en la calibración. Con el método propuesto la variación de la señal autofluorescente será eliminada, sea cual sea su amplitud, al ser aproximadamente constante con la frecuencia en el rango de interés.
2. Variación de la intensidad de la fuente de excitación que afecte por igual a todas las frecuencias. Esto puede suceder por múltiples motivos, por ejemplo, por una degradación a largo plazo de la fuente de luz, por algún pequeño cambio en el sistema óptico (desajuste de alineamiento por un golpe, por ejemplo), o por una pequeña variación de la cantidad de luz emitida por la fuente de excitación en la banda de la fluorescencia (banda amarilla en LEDs azules por ejemplo), o porque la muestra a analizar presente una mayor turbidez y, por tanto, mayor dispersión de la luz de excitación. Dado que esta variación afectaría por igual a todas las frecuencias de modulación, es correctamente corregida por el sistema propuesto, mientras que no lo sería por una mera sustracción del valor de fondo.

1.2 Medida de un valor de referencia durante el experimento utilizado para la corrección de la medida. Dicho valor de referencia utilizado para la corrección deberá darnos una buena aproximación de $A_0(f)$ (salvo coeficiente constantes que afecten por igual a todas las frecuencias). Por tanto es necesario que la relación fondo / fluorescencia sea mucho mayor (al menos en un factor 2) en esta señal de referencia que en la de medida.

Esto se puede conseguir con un esquema con dos fotodetectores como el representado en la figura 6. En este esquema, la fuente de excitación modulada (20) emite luz en la banda de excitación (26) y en la banda de fluorescencia (27). La luz alcanza la muestra fluorescente (21), produciéndose la señal fluorescente (28). Tras pasar por un filtro pasolargo (22), la luz de excitación en banda de fluorescencia (27) y la de fluorescencia (28) alcanzan el fotodetector principal (23). Por otro lado, la señal de excitación (26) alcanza el segundo fotodetector (25) tras ser filtrada, opcionalmente, por un filtro

pasocorto o neutro (24). La señal de este segundo fotodetector (25) serviría como referencia de amplitud y fase para corregir la del fotodetector principal (23).

Otra posible realización consistiría en la de utilización de un solo fotodetector en un
5 *esquema como el ilustrado en la figura 7. En este esquema, la fuente de excitación*
modulada (30) emite luz en la banda de excitación (37) y en la banda de fluorescencia
(38). La luz alcanza la muestra fluorescente (31), produciéndose la señal fluorescente
(39). La luz procedente de la muestra (31) puede alcanzar el fotodetector (36) por dos
caminos alternativos, que se seleccionarán cambiando las características de transmisión
10 *ópticas de sendos elementos (33 y 35) moduladores de la intensidad de la luz. Se*
propone que estos elementos (33 y 35) sean láminas LCD, aunque otras realizaciones
son posibles. En uno de los caminos la luz procedente de la muestra atraviesa un filtro
pasolargo (34), alcanzando el fotodetector (36) la luz del emisor en banda de
fluorescencia (37) y la señal fluorescente de interés (39). En el otro camino luz atraviesa
15 *un filtro (32) pasocorto o neutro antes de incidir sobre el fotodetector (36). La señal*
obtenida en los periodos en los que el LCD (33) transmite la luz y el LCD (35) la
bloquea puede ser utilizada como referencia de fase y amplitud, dado que la relación de
señal de fondo a señal fluorescente en esta medida es mucho mayor que la
correspondiente a la situación en que el LCD (33) bloquea la luz y el LCD (35) la
20 *transmite. Nótese que una señal de calibración de características adecuadas podría*
obtenerse también con la utilización de un único elemento modulador que bloquee o
deje pasar parte de la luz de excitación hasta el fotodetector.

De cualquiera de estas maneras obtenemos una señal de normalización en que la
25 *contribución de la fluorescencia es despreciable, y que contiene la información de los*
cambios de amplitud y de fase de la señal de excitación. Por tanto, dividiendo la señal
medida en cada frecuencia por esta señal de referencia, conseguimos corregir la
variabilidad de la señal de excitación y que posteriormente se pueda realizar
correctamente la cancelación de la señal de fondo.

30 *Antes de realizar la normalización será necesario que la señal de calibración sea mayor*
que el ruido presente en la medida. En un esquema de tratamiento de señal simplemente

aditivo, la presencia de valores de ruido mayores que la propia señal no es problemática ya que al ir integrando sucesivos ciclos de medida el ruido se va eliminando y es posible recuperar la señal. Sin embargo, al utilizar este método la división de una señal por otra que también está sujeta a ruido, el tiempo de convergencia aumentaría en exceso si el ruido fuera mayor que la señal de normalización. Por tanto sería preferible que a la hora de la normalización, la señal de referencia tuviera un nivel de ruido inferior a la señal en al menos un factor 5. Sin embargo tampoco conviene aumentar en exceso el tiempo de integración previo a la normalización, porque en ese caso se perdería parte de la ventaja del esquema de medida cíclico que elimina mejor derivas y señales interferentes de baja frecuencia.

Nótese que este esquema propuesto es distinto al esquema comúnmente utilizado en el estado de la técnica. En el estado de la técnica comúnmente se toma una señal de referencia que sirve para calibrar la fase de la señal fluorescente medida e independizarla de los retardos del circuito. Sin embargo, la señal fluorescente se considera eminentemente libre de señal de fondo por contribución de la excitación o autofluorescencia, dado que si esta se encontrase presente, la medida por fase sería inutilizable (véase figura 4), o bien sería necesaria la substracción de un fondo previamente adquirido. En el esquema propuesto esta señal de referencia sirve para normalizar la medida con la fase y la amplitud de la fuente de excitación, y esto permite la eliminación de una señal de fondo arbitrariamente grande, por mantenerse esta constante en amplitud y fase para las distintas frecuencias de medida.

Por cualquiera de los métodos descritos anteriormente es posible obtener una señal medida en la que el fasor de la señal de fondo es constante o varía suficientemente poco como para extraer la información de interés. En el caso más general, la información completa del fasor será recogida y el fondo cancelado en módulo y fase, realizándose luego el tratamiento matemático adecuado según la realización concreta. En el estado de la técnica está extendida la obtención de información a partir de la información completa del fasor (módulo y fase), y también a partir de la información de fase únicamente, dado que esta es más robusta que la amplitud a cambios en la intensidad de

la señal. Se proponen a continuación dos realizaciones para la recuperación de la señal de interés, una a partir de la parte real del fasor, y otra a partir de su módulo.

1.3 Recuperación de la información de interés de la fluorescencia a partir únicamente de

5 la parte real del fasor. La robustez del sistema frente a señales de autofluorescencia aumenta si se considera únicamente la componente real del fasor. Con anterioridad se ha considerado que la separación espectral en el dominio de la frecuencia entre la señal autofluorescente y la de interés es suficiente para considerar la primera como una constante (si su tiempo de vida es corto), por lo que sería cancelada junto con la señal
10 de excitación, o una señal de módulo despreciable (si su tiempo de vida es largo). Sin embargo esto no es del todo exacto, ya que una señal autofluorescente producirá un pequeño efecto sobre frecuencias alejadas de su frecuencia característica. Si la señal autofluorescente es mucho mayor que la señal de interés, la pequeña variación que produce a frecuencias alejadas podría ser relevante. Esta influencia se ha representado
15 en la en la figura 5. El eje de abscisas se corresponde con la frecuencia de modulación normalizada a la frecuencia característica de la emisión autofluorescente, y en el eje de ordenadas el valor de la parte real y la parte imaginaria normalizado al valor máximo del módulo del fasor (el valor para bajas frecuencias). Se han representado la curva de la parte real del fasor de la emisión autofluorescente (9), la parte imaginaria de dicho fasor
20 (10), y el valor complementario de la parte real, $1 - \text{Re}\{I_{af}\}$ (11).

- Para frecuencias de medida menores a la frecuencia típica de la autofluorescencia, se asumirá que la parte real (9) se mantiene constante. El error cometido en esta estimación es precisamente $1 - \text{Re}\{I_{af}\}$ (11). La parte imaginaria se asumirá despreciable, por lo que el error cometido será el propio
25 valor de la parte imaginaria (10). Como se puede ver, el error cometido es menor con la parte real que con la parte imaginaria.
- Para frecuencias de medida superiores a la de la autofluorescencia (este caso será el menos frecuente), se aproximarán a 0 tanto la parte real (9) como la imaginaria (10). Para frecuencias altas, el valor de la parte imaginaria (es decir,
30 el error cometido al asumirla nula) es mayor que el valor de la parte real.

Por tanto, un método basado en el análisis de la parte real será siempre más fiable a la hora de eliminar la autofluorescencia que uno que utilice la información de la parte imaginaria. Además de esto, el valor de la parte real es mucho menos sensible a pequeños errores en la determinación de la fase de referencia en la medida que el de la parte imaginaria.

1.4 Recuperación de la información de interés de la fluorescencia a partir únicamente del módulo del fasor. Esta realización puede ser elegida por ser imposible recuperar correctamente la fase de la señal medida, o porque resulte conveniente hacerlo así de cara a una mayor simplicidad del sistema. Supondremos, por tanto, que disponemos de una señal en la que la señal de fondo $A_0(f)$ no es un valor real constante, pero sí es un complejo de módulo constante y fase variable con la frecuencia:

$$A_0(f) = |A_0| \cdot e^{j\varphi(f)}$$

Esta situación puede darse, por ejemplo, en un sistema en el que no se tiene perfectamente calibrado el retardo que sufre la señal al atravesarlo, pero se sabe que la fuente de excitación se modula con una amplitud que permanece constante en todas las frecuencias. Dado que la señal fluorescente es excitada precisamente con una señal idéntica en fase a la señal de fondo que se está intentando eliminar, tendrá la misma fase inicial que ésta:

$$I_m(f) = A_0(f) \cdot \left(1 + \frac{a_f'}{1 + j2\pi f \tau_f} \right) = \left(|A_0| + \frac{|A_0| \cdot a_f'}{1 + j2\pi f \tau_f} \right) \cdot e^{j\varphi(f)}$$

En una situación como esta en la que no disponemos de una referencia de fase clara para poder separar las componentes real e imaginaria, es necesaria una modificación del método original. Dado que la fase de la señal medida es una información poco útil en este caso, se puede obtener la información deseada a partir tan sólo del módulo de este fasor, que responde a la siguiente fórmula (donde se ha hecho $a_f = |A_0| \cdot a_f'$):

$$|I_m(f)| = \sqrt{\left(|A_0| + \frac{a_f}{1 + (2\pi f \tau_f)^2} \right)^2 + \left(\frac{a_f 2\pi f \tau_f}{1 + (2\pi f \tau_f)^2} \right)^2} =$$

$$= \sqrt{|A_0|^2 + (2|A_0| + a_f) \frac{a_f}{1 + (2\pi f \tau_f)^2}}$$

En este caso, como se puede deducir de las ecuaciones, el patrón de variación de la fracción de la señal que cambia con la frecuencia se ve modificado por la relación entre la señal de fondo y la señal fluorescente. Por tanto, el mecanismo consistente en anular la componente constante por diferencia entre distintas medidas no se puede aplicar de igual modo. Se podrá, sin embargo, en este caso, registrar el valor acumulado completo (sin restar la constante) y realizar posteriormente un ajuste de esta curva a la fórmula correspondiente. Este ajuste, sin embargo, requiere una mayor capacidad de cálculo, y puede suceder que esta no se encuentre disponible en el equipo.

10

Una alternativa a esta opción consiste en hacer la substracción del valor de continua, y obtener de estos datos el tiempo de vida aplicando una corrección. En la figura 9 se representa la curva de $(|I_m(f)| - |A_0|)/a_f$ en función de la frecuencia para distintos valores de ρ , parámetro adimensional definido como el cociente entre la intensidad de la señal de fondo y la intensidad de la señal de fluorescencia (para bajas frecuencias). En concreto, para $\rho = 0$ (41), $\rho = 0.2$ (42), $\rho = 0.5$ (43), $\rho = 1$ (44), $\rho = 2$ (45), $\rho = 10$ (46). Como se puede observar, para distintos valores de ρ se obtienen distintos patrones de caída de la intensidad. Sin embargo, teniendo un conocimiento a priori de la magnitud aproximada del parámetro ρ (es decir, de la magnitud aproximada de la señal de fondo y de la señal fluorescente) se puede obtener una buena estimación del valor $f_0 = 1/2\pi\tau_f$ buscado, que es relativamente insensible a variaciones de este parámetro ρ . Supongamos, por ejemplo, que obtenemos una estimación de la frecuencia f_0 a partir de una frecuencia medida f_m que corresponde al momento en que la intensidad normalizada ha caído a un valor $k = 1/\sqrt{2} = 0.707$. En este caso la corrección a aplicar sería:

$$f_0 = f_m \cdot \sqrt{\frac{(2\rho + k) \cdot k}{(1 - k) \cdot (2\rho + k + 1)}}$$

25

La elasticidad de la función $f_0(\rho)$, que expresa el porcentaje de variación de la magnitud medida f_0 producido por un porcentaje de variación en la variable ρ , permite cuantificar el posible error en la medida de f_0 que produce el desconocimiento del verdadero valor del parámetro ρ :

$$5 \quad Ef_0(\rho) = \frac{df_0/f_0}{d\rho/\rho} = \frac{\rho}{(2\rho + k) \cdot (2\rho + k + 1)}$$

Como se puede ver en la figura 9, para $k = 1/\sqrt{2}$ la elasticidad de $f_0(\rho)$ tiene un máximo de 0.11 para $\rho = 0.5$, y decrece a una razón de 1 década por década. Esto significa que el impacto de una incorrecta calibración del parámetro ρ sobre la frecuencia medida es mínimo (por ejemplo, un error del 20% en ρ se transformaría en menos de un 2% de error en f_0). De hecho, si la señal de fondo es mayor que la señal fluorescente, que será el caso habitual de utilización de este método, la sensibilidad de la medida de la frecuencia al parámetro ρ es mucho menor.

2. Eliminación de la interferencia electromagnética (IEM) que se acopla entre la electrónica de modulación y la amplificación en detección. Esta señal de fondo tiene por su propia naturaleza una amplitud y fase que son variables con la frecuencia de la modulación, por lo que no podrá ser eliminada por el método descrito anteriormente. Sin embargo esta señal, al no proceder de un acoplo óptico al fotodetector, permanece invariable, y, por tanto, podrá ser eliminada, si se impide la llegada de luz al fotodetector por algún medio que no modifique la geometría ni características electromagnéticas del sistema. Aunque en este apartado nos referimos a la IEM, este procedimiento servirá para eliminar cualquier señal de fondo presente en la medida cuya amplitud y fase no se vea modificada al impedir el paso de la luz hasta el fotodetector, como por ejemplo el causado por el efecto de acoplo de señal a través de la alimentación del sistema. Para conseguir esto, se propone la interposición de una lámina de cristal líquido (LCD) entre la sustancia fluorescente y el fotodetector, aunque será válido cualquier otro método por el que se pueda modificar significativamente la cantidad de luz incidente sobre el detector sin cambiar las características de acoplo electromagnético, y preferentemente que no utilice componentes mecánicos. Nótese que

no es necesario que el elemento de modulación bloquee completamente el paso de luz, ya que la luz que no se consiga bloquear simplemente será señal común a los dos estados y será por tanto eliminada. La utilización de un elemento de modulación opto-electrónico en vez de un sistema mecánico presenta numerosas ventajas, como la mayor
5 frecuencia de modulación, la mayor capacidad de integración, y la menor modificación del acoplo electromagnético, permitiendo una mejor sustracción del valor de fondo.

Dado que en este sólo es necesario conmutar entre dos estados para la eliminación del efecto de la señal de fondo, esta operación podrá ser realizada, además de por un
10 método digital similar al explicado con anterioridad, por un método puramente analógico, consistente en una demodulación lock-in de la señal que varía al cambiar de estado el modulador de amplitud, síncrona con la señal que controla esta conmutación.

Dado que es posible que una medida presente señales de fondo de distintos tipos que sea
15 necesario neutralizar, en ocasiones será necesario aplicar más de una técnica de corrección de fondo. La manera en que se apliquen en su conjunto dependerá de los requisitos de la medida y de diversos factores del sistema experimental, aunque lo más sencillo, al menos conceptualmente, es suponer una sucesión de etapas de cancelación. Los requisitos concretos de señal para cada una de las etapas impondrán por lo general
20 un orden concreto para esta concatenación. En la "Descripción de una realización preferida" se detalla un posible ejemplo de combinación, aunque para un cualquier entendido en la materia la modificación de este sistema para adaptarlo a las características concretas de otros sistemas o el diseño de un esquema a medida sin apartarse del espíritu y alcance de lo aquí descrito y reivindicado debería ser sencillo.

Además, será evidente que se pueden concebir otras formas o formas adicionales de la invención, y formas de realización distintas a las formas de realización especificadas descritas anteriormente sin apartarse del espíritu y del alcance de las reivindicaciones anexas y, por lo tanto, se pretende que el alcance de esta invención solamente sea regido
5 por las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características del invento de
10 acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica del mismo y para complementar esta descripción, se acompaña como parte integrante de la misma un juego de dibujos, cuyo carácter es ilustrativo y no limitativo. En estos dibujos:

Fig 1: patrón de caída en el dominio del tiempo de la intensidad de una emisión
15 fluorescente con caída biexponencial, excitada con un pulso estrecho de radiación.

Fig 2: representación temporal del desfase y pérdida de modulación de una señal fluorescente al acercarse el periodo de la oscilación a su tiempo de vida medio.

20 Fig 3: variación de la amplitud normalizada y la fase de modulación de una señal fluorescente monoexponencial frente a la frecuencia normalizada.

Fig 4: variación de la amplitud normalizada y la fase de una señal fluorescente monoexponencial frente a la frecuencia normalizada con la presencia de distintos
25 niveles de señal de fondo correspondiente a la excitación.

Fig 5: representación de la influencia de una señal autofluorescente sobre la parte real y la parte imaginaria de una medida, para frecuencias alejadas de su frecuencia característica.

Fig 6: representación esquemática del sistema de calibración de fase y amplitud de la excitación en tiempo real con dos fotodetectores separados situados en caminos ópticos distintos, donde:

- (20) es una fuente de excitación modulada
- 5 (21) es la muestra fluorescente
- (22) es un filtro pasolargo
- (23) es el fotodetector principal
- (24) es un filtro pasocorto o neutro
- (25) es el fotodetector secundario
- 10 (26) es la señal de excitación
- (27) es la luz de excitación en banda de fluorescencia
- (28) es la señal fluorescente

Fig 7: representación esquemática del sistema de calibración de fase y amplitud de la excitación en tiempo real con un único fotodetector y dos caminos ópticos distintos, donde:

- (30) es una fuente de excitación modulada
- (31) es la muestra fluorescente
- (32) es un filtro pasocorto o neutro
- 20 (33) es una lámina de cristal líquido
- (34) es un filtro pasolargo
- (35) es una lámina de cristal líquido
- (36) es el fotodetector
- (37) es la señal de excitación
- 25 (38) es la señal de excitación en banda de fluorescencia
- (39) es la señal fluorescente

Fig 8: representación de la caída de la amplitud de la señal medida menos su parte constante con la frecuencia para distintos valores de la relación fondo/fluorescencia.

30

Fig 9: representación de la elasticidad de la estimación de la frecuencia característica de una emisión fluorescente con respecto a la relación fondo/fluorescencia.

Fig 10: representación esquemática de la realización preferida, donde:

- (50) es un LED
- (51) es la señal que modula la fuente de excitación
- 5 (52) es un microcontrolador
- (53) emisión del LED en banda roja
- (54) emisión del LED en banda azul
- (55) muestra fluorescente
- (56) emisión fluorescente
- 10 (57) fotodiodo
- (58) filtro de fluorescencia (pasolargo)
- (59) LCD
- (60) filtro neutro
- (61) LCD
- 15 (62) señal de control del primer LCD
- (63) señal de control del segundo LCD
- (64) señal eléctrica producida por el fotodiodo
- (65) amplificador
- (66) señal amplificada
- 20 (67) señal que multiplica a la señal amplificada
- (68) señal resultante de la multiplicación de (67) y (68)
- (69) filtro paso bajo
- (70) señal demodulada

25 Fig 11: diagrama de estados de la realización preferida, donde:

(80) Inicialización; (81) Estado A: calibración interferencia; (82) Estado B: referencia de fase y amplitud; (83) Estado C: señal fluorescente y fondo; (84) Acumulación; (85) Corrección de interferencia, amplitud y fase; (86) Cancelación fondo y ajuste; (87) Presentación de resultados

DESCRIPCIÓN DE UNA REALIZACIÓN PREFERIDA

La realización que se describe tiene como objetivo medir el tiempo de vida de una señal fluorescente con excitación en el azul y emisión en el rojo, con una caída monoexponencial cuyo tiempo de vida puede variar entre 100 ns y 1 μ s. En la figura 10 se puede observar un diagrama esquemático del sistema, en el que se han obviado algunos elementos necesarios para su realización (acondicionadores de señal, alimentación, interfaz humana para la presentación de resultados o selección de opciones de la medida, etc.), porque se ha preferido poner especial énfasis en los aspectos que son específicos de esta invención. Se utiliza como fuente de luz para la excitación un diodo emisor de luz o LED (50) modulado en frecuencia por una señal (51), que es a su vez generada por un microcontrolador (52). El LED (50), a pesar de ser azul tiene una pequeña emisión (53) en la banda roja además de la emisión principal azul (54). La luz procedente del LED (50) alcanza la muestra (55) provocando la emisión fluorescente (56).

La luz procedente de la muestra (55) puede alcanzar el fotodiodo (57) por dos caminos distintos. En el primer camino atraviesa un filtro de fluorescencia (58) que bloquea la luz azul y un LCD (59), mientras que por el segundo camino atraviesa un filtro neutro (60) y otro LCD (61). Ambos LCD son controlados por el microcontrolador (52), el primer LCD (59) a través de la señal (62) y el segundo LCD (61) a través de la señal (63). La señal eléctrica (64) producida por el fotodiodo (57) es amplificada por un amplificador (65) y multiplicada por una señal (67) generada por el microcontrolador (52). Tras un filtrado paso bajo (69) la señal (50) es digitalizada y procesada por el microcontrolador (52).

La señal (51) que excita el LED (50) es una señal cuadrada. Su frecuencia puede tomar alguno de los valores del conjunto de frecuencias $\{f_i\} = \{10 \text{ kHz}, 20 \text{ kHz}, 50 \text{ kHz}, 100 \text{ kHz}, 200 \text{ kHz}, 500 \text{ kHz}, 1 \text{ MHz}, 2 \text{ MHz}, 5 \text{ MHz}, 10 \text{ MHz}\}$. La señal (67) por la que se multiplica la señal amplificada (66) es una señal sinusoidal cuya frecuencia es 1 kHz

superior a la frecuencia de la señal (51) que excita el LED (50). Por tanto la señal (68) consistirá en una señal de frecuencia 1 kHz que contiene toda la información y la fase de la señal (64) (correlación cruzada o heterodinado). Las componentes inservibles de alta frecuencia de esta señal son eliminadas por el filtro paso bajo (69) y la señal
5 resultante (70) es digitalizada y analizada por el microcontrolador (52) para extraer la información de amplitud y fase. Esta información se registra en forma de fasor complejo.

En la figura 11 se ilustra un diagrama de estados para la mejor comprensión del sistema
10 de medida.

Lo primero que se hace es pasar por un estado de inicialización (80) en el que se ponen a cero los valores de todas las variables a utilizar.

- 15 El microcontrolador conmuta los LCDs (59 y 61) entre tres posibles estados:
1. Estado A (81): ambos LCDs (59 y 61) opacos (estado A). La señal registrada se corresponde con la señal de fondo de interferencia electromagnética, dado que no llega luz al detector.
 2. Estado B (82): LCD (59) opaco y LCD (61) transparente. La señal registrada se
20 corresponde con la referencia de fase y amplitud que se usará para calibrar la señal medida, contaminada por la señal de fondo de interferencia electromagnética.
 3. Estado C (83): LCD (59) transparente y LCD (61) opaco. La señal registrada se
25 corresponde con la señal medida de fluorescencia, contaminada por las señales de fondo de excitación, autofluorescencia y interferencia electromagnética.

El microcontrolador varía el sistema secuencialmente por los estados A (81), B (82) y C (83), realizando en cada uno de ellos un barrido completo por el conjunto de frecuencias de excitación $\{f_i\}$. Se emplean 10 ms en la medida de cada frecuencia, y 100 ms en la
30 medida de cada estado (todas las posibles frecuencias de un mismo estado de los LCD). Para cada estado (A, B, ó C) se registra el conjunto de fasores complejos medidos para cada frecuencia, $\{a_i\}$, $\{b_i\}$, $\{c_i\}$. Tras cada recorrido por los tres posibles estados, se

acumula (84) el valor medido del fasor en respectivos conjuntos de variables complejas $\{A_i\}$, $\{B_i\}$, $\{C_i\}$, de tal modo que $A_i = A_i + a_i$, $B_i = B_i + b_i$, $C_i = C_i + c_i$. Tras esto se calcula (85) un nuevo conjunto de valores complejos $\{D_i\}$ que se corresponden con los fasores la señal medida libre de la influencia del fondo de interferencia electromagnética y con amplitud y fase corregida por el valor de calibración: $D_i = (C_i - A_i) / (B_i - A_i)$. Tras esto se calcula (86) un nuevo conjunto de valores complejos $\{E_i\}$ que se corresponden con los fasores de la señal medida, con la parte común eliminada: $E_i = D_i - D_{10MHz}$. De este conjunto de valores se tomará la parte real y se realizará un ajuste con la ecuación:

$$10 \quad \text{Re}\{E_i\} = \frac{\alpha}{1 + (2\pi f_i \tau)^2} + \kappa$$

De tal modo que se obtendrán los parámetros α y τ que caracterizan la emisión fluorescente, y un parámetro κ correspondiente a un valor de continua no eliminado. Si el ajuste no fuera lo suficientemente bueno, se considerará que la señal es todavía demasiado débil o el ruido muy alto, por lo que se procederá a realizar otro ciclo completo por los estados A, B y C, y se realizará un nuevo ajuste. Si el ajuste fuera suficientemente bueno, se procederá a la presentación de resultados (87).

A la vista de esta descripción y juego de figuras, el experto en la materia podrá entender que la invención ha sido descrita según algunas realizaciones preferentes de la misma, pero que múltiples variaciones pueden ser introducidas en dichas realizaciones preferentes, sin salir del objeto de la invención tal y como ha sido reivindicada.

APLICACIÓN INDUSTRIAL

25 La técnica de fluorescencia se usa para multitud de análisis en química analítica, para medidas medioambientales, detección de sustancias peligrosas, y para todo tipo de análisis clínicos, médicos, biológicos que utilicen marcadores fluorescentes para medir cualquier variable.

REIVINDICACIONES

1. Método de medida del patrón de decaimiento temporal de la intensidad fluorescente en el dominio de la frecuencia, **caracterizado por** los siguientes pasos:
- 5
- a. Exploración de la señal medida en distintos estados del sistema, en los que la señal de fondo permanece constante o varía de una forma conocida, y la señal de interés varía de una forma a determinar, siendo que la(s) característica(s) que varía(n) entre distintos estados consiste(n)
- 10
- en:
- i. Un cambio en la frecuencia de modulación de la luz de excitación, de tal modo que una o varias de las características de la señal de fondo (módulo, fase, parte real, parte imaginaria) permanece(n) constante(s) o varía(n) de forma conocida, y que la
- 15
- señal de fluorescencia presenta un cambio en la amplitud y/o fase de modulación al variar la frecuencia de modulación.
- y/o
- ii. Un bloqueo total o parcial del camino óptico entre la sustancia fluorescente y el fotodetector, utilizando algún medio no
- 20
- mecánico que permita conmutar un elemento entre dos estados de transmisión óptica sin alterar las características eléctricas del medio, o alterándolas de tal manera en que la variación del acoplo electromagnético entre el subsistema de modulación y la señal medida sea menor que la señal de interés.
- 25
- b. Cancelación de la parte común de la señal en las medidas tomadas en distintos estados del sistema, de tal forma que la señal de fondo es cancelada y la señal de interés recuperada.
2. Método según reivindicación 1, **caracterizado por** que al variar la frecuencia de
- 30
- modulación, alguna(s) de las características de la señal de fondo varía(n) de una forma que se conoce por la realización de una medida de calibración en condiciones conocidas previa a la medida de interés, y que la información de

esta medida de calibración previa se usa para realizar una corrección de la señal medida, para luego realizar la cancelación de la señal común entre distintas frecuencias de medida.

- 5 3. Método según reivindicación 1, **caracterizado por** que al variar la frecuencia de modulación, alguna(s) de las características de la señal de fondo varía(n) de una forma que se conoce por la obtención durante el propio experimento de una señal y que sirva para calibrar dicha variación y que esta señal X se caracteriza por que la relación entre la señal de fondo debida a la excitación y la de fluorescencia es mayor que dicha relación en la señal Y de medida de la
- 10 fluorescencia, realizandose posteriormente una corrección de la señal Y con el patrón de calibración X, procediendo a la cancelación de la señal común entre las distintas frecuencias de medida.
- 15 4. Método según reivindicación 3, **caracterizado por** que las señales X (de calibración) e Y (de medida) se obtienen de dos fotodetectores distintos.
- 20 5. Método según reivindicación 3, **caracterizado por** que las señales X (de calibración) e Y (de medida) proceden del mismo fotodetector, y se corresponden con dos estados distintos del sistema en que la relación entre señal de fondo debida a la excitación y la señal de fluorescencia es mayor para el estado correspondiente a la señal X que para el correspondiente a la señal Y.
- 25 6. Método según reivindicaciones 1, 2, 3, 4 ó 5, **caracterizado por** que la información de interés se obtiene únicamente a partir de la parte real del fasor de medida.
- 30 7. Método según reivindicaciones 1, 2, 3, 4 ó 5, **caracterizado por** que la información de interés se obtiene únicamente a partir del módulo del fasor de medida.

8. Sistema de medida del patrón de decaimiento temporal medida que implementa el método descrito en la reivindicación 1, **caracterizado por** que posee:
- a. Un subsistema de generación de luz de excitación modulada
 - b. Una muestra fluorescente a caracterizar
 - 5 c. Un subsistema de detección de luz
 - d. Un subsistema de cancelación de la señal común.
9. Sistema según reivindicación 8, **caracterizado por** que realiza una calibración de la señal medida con una señal de calibración adquirida previamente a la
- 10 realización del experimento de interés, tal y como se describe en la reivindicación 2.
10. Sistema según reivindicación 8, **caracterizado por** que realiza una calibración de la señal medida Y con una señal de calibración X adquirida durante el propio
- 15 experimento de interés, siendo en la señal X mayor la relación de la señal de fondo debida a la excitación y la señal de fluorescencia que en la señal Y, tal y como se describe en la reivindicación 3.
11. Sistema según reivindicación 10, **caracterizado por** que posee al menos dos
- 20 fotodetectores distintos, de tal modo que de uno de ellos se obtiene la señal de calibración X y del otro fotodetector se obtiene la señal de medida Y.
12. Sistema según reivindicación 10, **caracterizado por** que las señales de calibración X y de medida Y se proceden del mismo fotodetector y se obtienen
- 25 en dos estados distintos del sistema, que se caracterizan porque la relación entre la señal de fondo debida a la excitación y la señal de fluorescencia es mayor en la señal de calibración X que en la de medida Y, lo que se consigue variando entre estados distintos la característica de transmisión óptica de al menos un elemento modulador, de tal manera que bloquee o deje pasar parte de la luz que
- 30 incide sobre el fotodetector.

13. Sistema según reivindicación 12, **caracterizado por** que el(los) elementos moduladores cuya transmisión óptica se hace variar consiste(n) en lámina(s) de cristal líquido (LCD).
- 5 14. Sistema según reivindicación 8, **caracterizado por** que el(los) elementos moduladores cuya transmisión óptica se hace variar para obtener dos señales, una de señal, y una de caracterización de la interferencia electromagnética, consiste(n) en lámina(s) de cristal líquido (LCD).

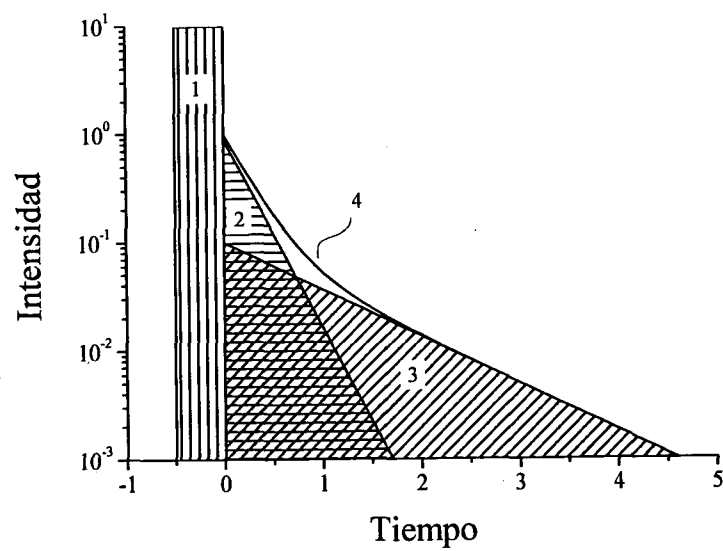


Fig 1

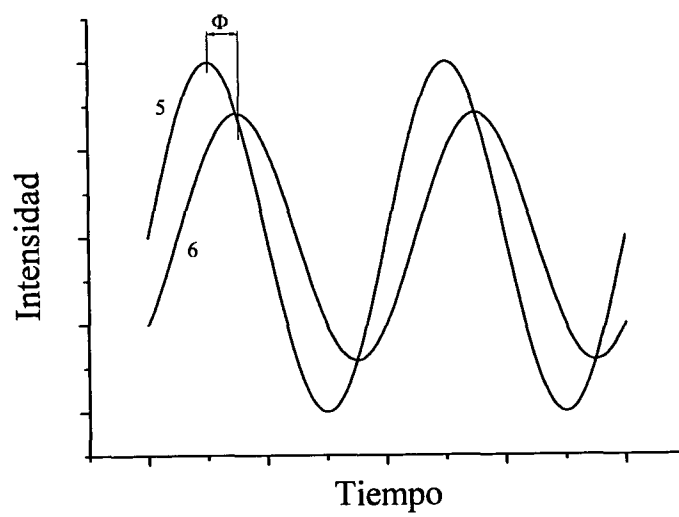


Fig 2

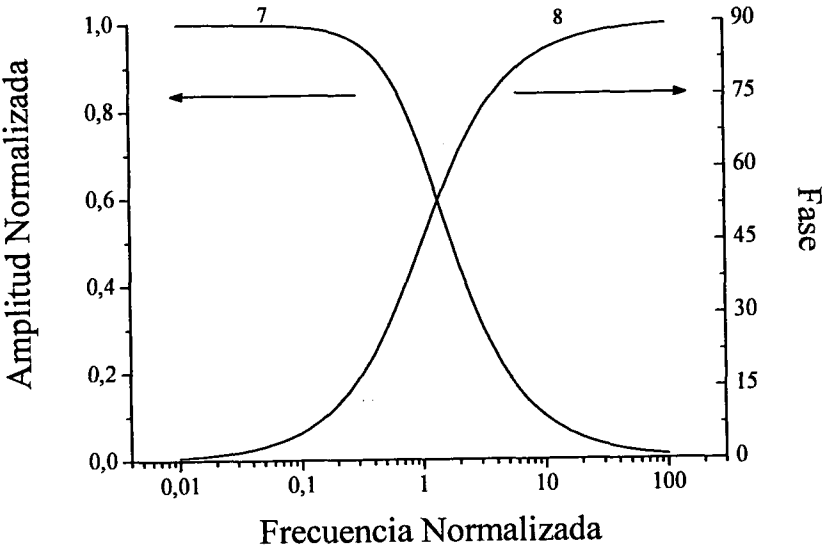


Fig 3

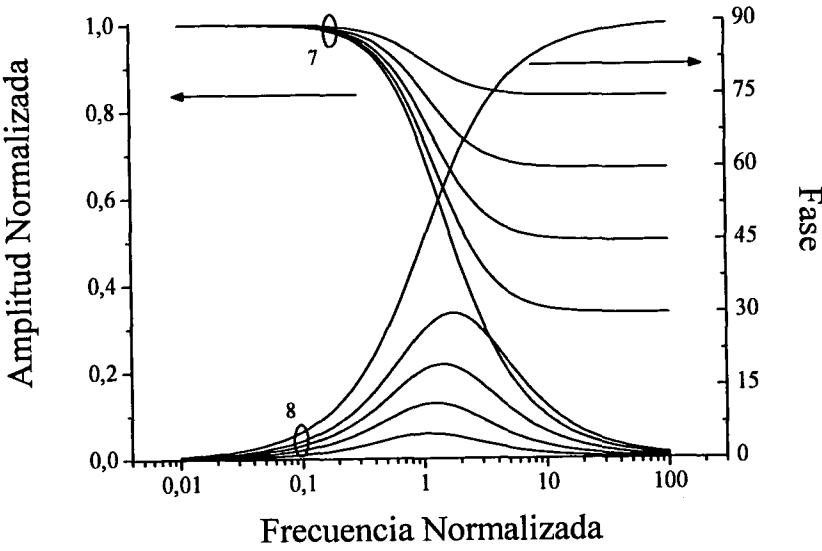


Fig 4

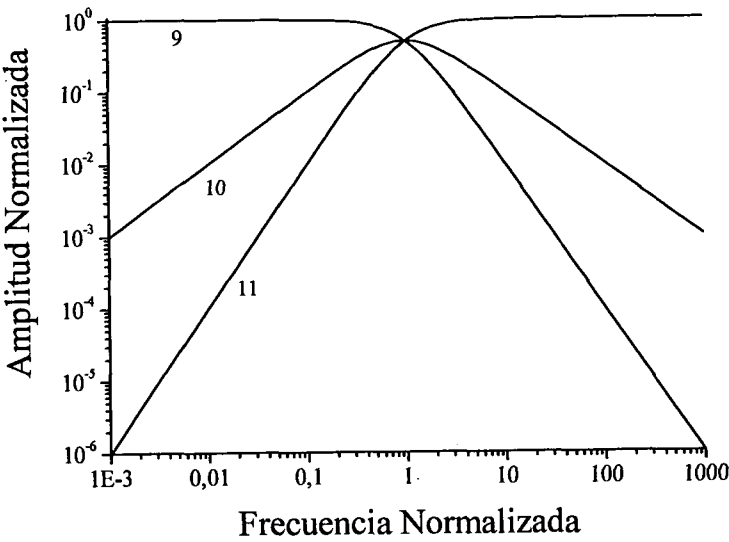


Fig 5

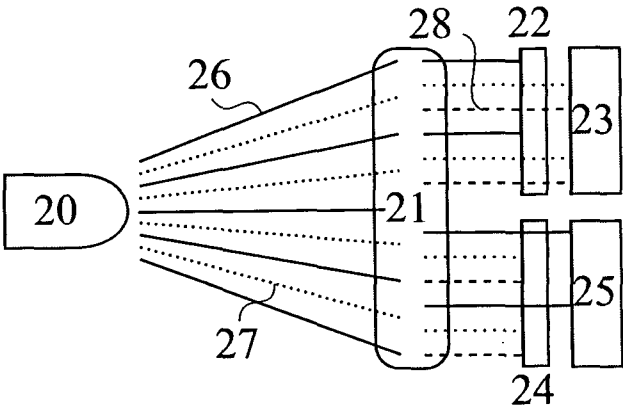


Fig 6

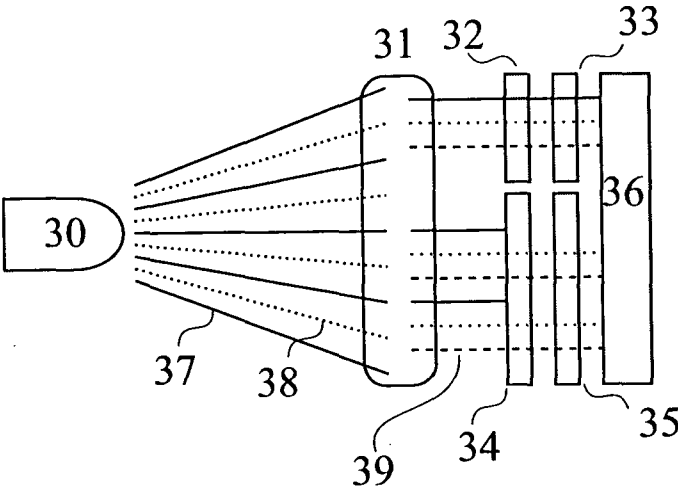


Fig 7

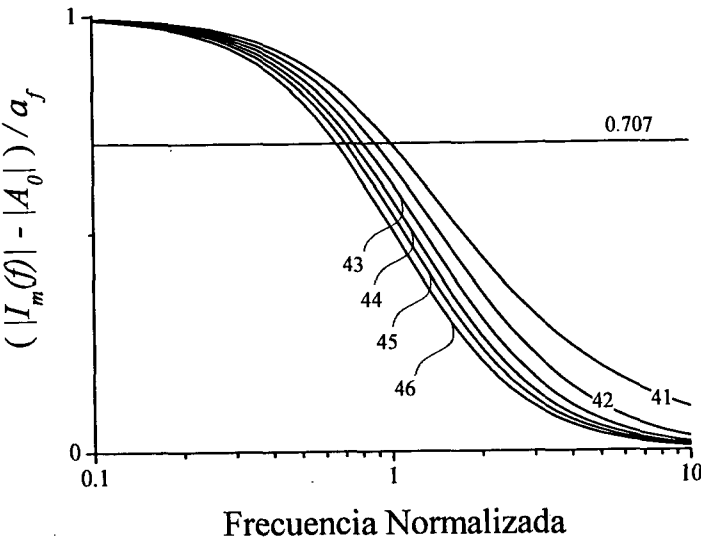


Fig 8

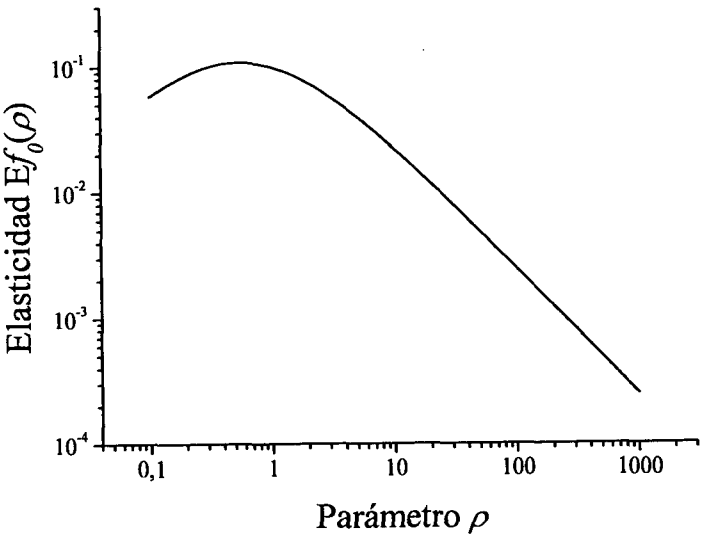


Fig 9

5/6

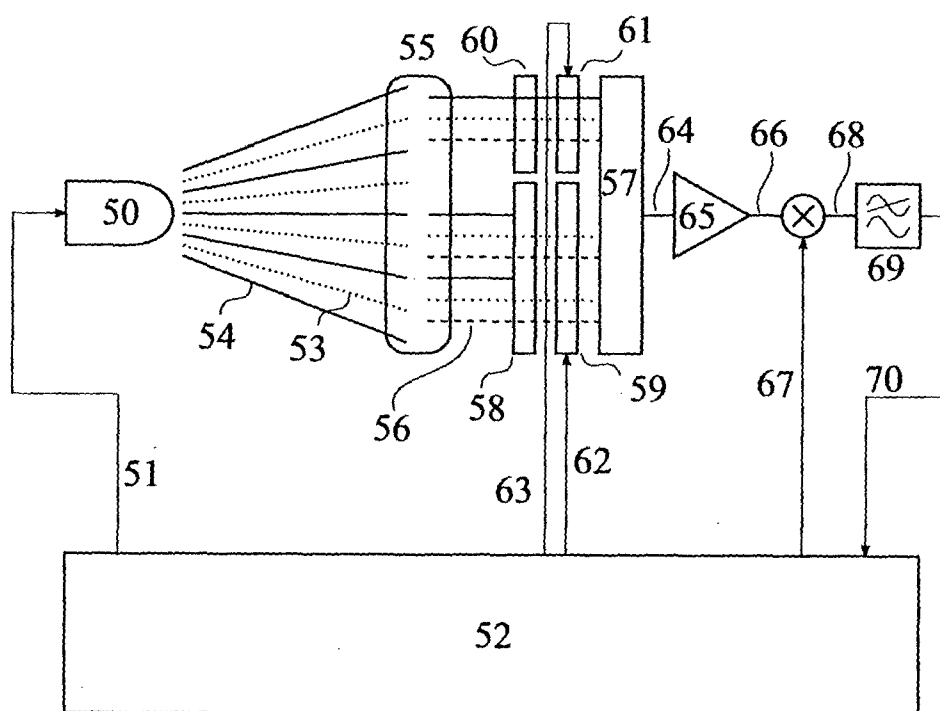


Fig 10

6/6

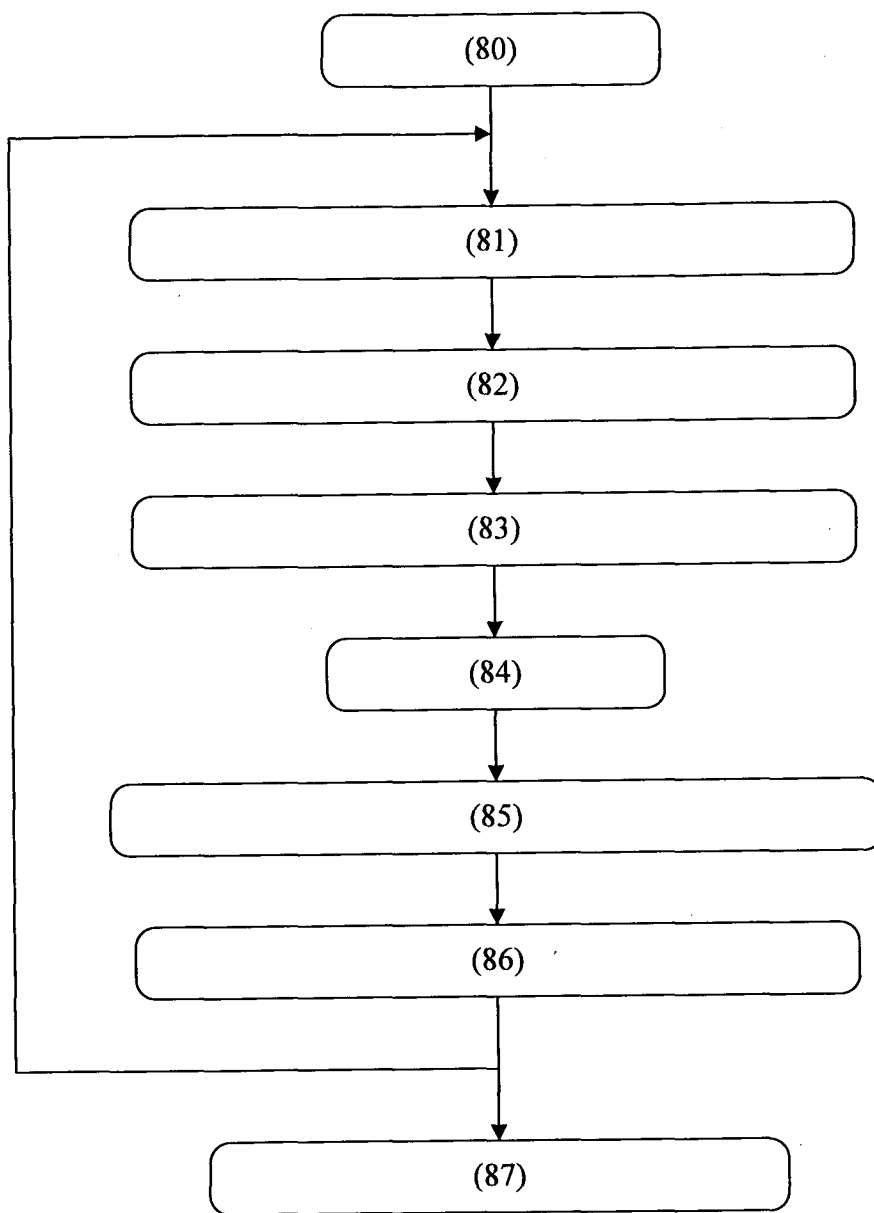


Fig 11