

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 911 722**

51 Int. Cl.:

<b>G01J 3/28</b>	(2006.01)
<b>G01N 21/27</b>	(2006.01)
<b>G02B 21/00</b>	(2006.01)
<b>G01J 3/12</b>	(2006.01)
<b>G01J 3/02</b>	(2006.01)
<b>G01J 3/10</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2015 PCT/ES2015/070732**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016 WO16055683**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2015 E 15849137 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.01.2022 EP 3206015**

54 Título: **Espectrofotómetro**

30 Prioridad:

**10.10.2014 ES 201431491**

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

**20.05.2022**

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (100.0%)  
C/ Serrano 117  
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**PINI, VALERIO;  
MONTEIRO KOSAKA, PRISCILA;  
TAMAYO DE MIGUEL, FRANCISCO, JAVIER;  
CALLEJA GOMEZ, MONTSERRAT;  
RAMOS VEGA, DANIEL;  
MALVAR VIDAL, OSCAR;  
RUZ MARTINEZ, JOSE JAIME y  
ENCINAR DEL POZO, MARIO**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**ES 2 911 722 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Espectrofotómetro

**Objeto de la invención**

5 La presente invención se refiere a un espectrofotómetro, específicamente, la presente invención se refiere a un espectrofotómetro con capacidad de realizar análisis simultáneos en diferentes puntos de una misma muestra disponiendo de una alta resolución espacial y sin requerir un sistema mecánico de barrido físico a lo largo de la muestra. Estos análisis simultáneos se realizan de forma secuencial en el rango espectral (para diferentes longitudes de onda) a fin de tener un análisis de espectrometría de varios puntos de una muestra y a diferentes longitudes de onda.

Además, la presente invención permite, en ciertas condiciones experimentales, la obtención de señales normalizadas mediante la realización de una única medida.

**Antecedentes de la invención**

15 Son conocidos en la técnica diferentes tipos de espectrofotómetros para el análisis de muestras de laboratorio que permiten, entre otros, realizar un análisis espectral de una muestra respecto a una referencia. El procedimiento de espectrofotometría consiste en utilizar un haz de luz (de diversas longitudes de onda de acuerdo con el análisis que se pretenda realizar), dirigirlo hacia la muestra y analizar la luz transmitida o reflejada por dicha muestra.

20 En el campo de la espectrofotometría estándar, las soluciones existentes están hechas para medir propiedades ópticas globales de una muestra, normalmente se trata de una muestra líquida puesta en una cubeta y medida en transmisión; por lo tanto, las medidas espectrales no tienen ninguna resolución espacial, tal y como se da a conocer, por ejemplo, en el documento US2013/0130400. Sin embargo, muchas de las aplicaciones científicas y técnicas requieren la caracterización óptica de una superficie con alta resolución espacial y por lo tanto un sistema estándar de espectrofotometría no es adecuado para todo este rango de aplicaciones.

25 En la literatura se pueden encontrar diferentes soluciones técnicas para el análisis espectral de una superficie resuelta espacialmente, también conocidas como técnicas micro-espectrofotométricas. La solución más comúnmente utilizada consiste en acoplar un espectrómetro a un microscopio óptico mediante una fibra óptica. El haz colimado de una fuente de luz se enfoca mediante un lente hacia la muestra y la luz que proviene de una pequeña región de la muestra se analiza mediante una fibra óptica puesta en el plan imagen del microscopio óptico. Sin embargo, aunque esta solución obtiene resultados aceptables, está condicionada por el diámetro de la fibra óptica y, además, se requieren diversas calibraciones, así como el alineamiento de la fibra óptica, dichas tareas requieren mucho tiempo del usuario y que dichos usuarios sean o, al menos, tengan acceso a personal especializado en este tipo de mediciones.

30 Existen otro tipo de soluciones técnicas que no requieren de una fibra óptica para realizar el análisis espectrofotométrico, ya que incorporan un espejo especial agujereado y, a través de dichos orificios, se transmite la luz en lugar de utilizar la fibra óptica.

35 Estas dos soluciones logran buena resolución espacial, pero tienen la gran desventaja de que el mapeo espacial (también denominado a lo largo de la memoria descriptiva como barrido en superficie) de una muestra hay que hacerlo de manera secuencial con un sistema mecánico de barrido que suele ser siempre muy lento. La resolución espacial en estos dos sistemas va a estar limitada y fijada por el diámetro de la fibra o del agujero del espejo y por la precisión del sistema de barrido.

40 Otra desventaja de estos dos sistemas es que siempre es necesario tomar cada una de las medidas con una muestra de referencia con el fin de eliminar la dependencia espectral de los fotodetectores, de la fuente de luz y las dependencias espectrales de todos los componentes ópticos.

Otros dispositivos y procedimientos de imágenes multiespectrales de muestras microscópicas se desvelan en los documentos US 6.650.357 B1, WO 2013/116253 A1, US 5.859.700 y US 7.443.508 B1.

**Descripción de la invención**

45 La presente invención se refiere a un procedimiento con las características de la reivindicación 1. Las modificaciones favorables de este procedimiento se definen en las reivindicaciones dependientes.

50 En un ejemplo no comprendido en la reivindicación 1, el espectrofotómetro comprende un emisor de haz de luz dirigido a través de una primera trayectoria óptica en una muestra, y un conjunto de fotodetectores dispuestos en una segunda trayectoria óptica definida como la trayectoria del haz de luz después de entrar en contacto con la muestra, en donde comprende medios para procesar el haz de luz recibido por los fotodetectores, dicho procesamiento significa tener una correlación en la que cada uno de los fotodetectores corresponde a un punto espacial de la muestra.

Es importante destacar que la fuente de luz dispone de medios para modificar la longitud de onda de la luz generada,

de tal manera que dispone de medios para modificar, de forma secuencial, la componente espectral de la luz que se genera y, en consecuencia, la componente espectral para la que se realizará el análisis de la muestra.

A título de ejemplo, se contemplan las siguientes opciones de emisores de luz:

- 5 1) Fuente de luz con banda espectral ancha (tal como una bombilla emisora de luz blanca) con un selector de longitud (tal como un monocromador, filtros ópticos, prismas etc.); o  
2) Una serie de múltiples fuentes de luz en una sola longitud de onda (por ejemplo, múltiples LED o múltiples LASER), de tal modo que no se necesitaría un selector de longitud de onda; solo necesitarían tener medios para seleccionar el LED que ilumina la muestra, de tal modo que el escaneo de longitud de onda se pueda realizar cambiando de un LED a otro.

10 En una disposición especialmente preferente, la fuente del haz de luz comprende un monocromador para el control selectivo de la longitud de onda enviada a la muestra de tal manera que se emite un haz de luz de una determinada longitud de onda. De este modo, se realiza un análisis en simultáneo de distintos puntos de la muestra a una misma longitud de onda y, posteriormente, se selecciona mediante el monocromador otra longitud de onda de tal manera que la muestra se ilumina secuencialmente con diversas longitudes de onda.

15 El espectrofotómetro se puede hacer para aplicaciones de campo brillante y campo oscuro, tanto para mediciones de reflexión como de transmisión, siempre que se utilicen componentes ópticos adecuados para cada una de las técnicas.

Además, el espectrofotómetro se puede hacer para tomar medidas de polarización cruzada, siempre que los polarizadores apropiados estén acoplados a lo largo del haz que golpea la muestra y a lo largo de la trayectoria del haz que apunta hacia el conjunto de fotodetectores.

20 Preferentemente, el conjunto de fotodetectores es una cámara CCD en la que una serie de píxeles de esta comprende un fotodetector. Dicha serie puede ser de un píxel o un conjunto de ellos.

Para aplicaciones de microespectrofotometría, el espectrofotómetro tiene un conjunto de lentes en la primera trayectoria que sirven para colimar y enfocar la luz para que se puedan realizar lecturas incluso en aplicaciones que requieren un análisis submicrométrico.

25 En disposiciones particulares, la fuente del haz de luz comprende un monocromador, de tal modo que se emite un haz de luz de una determinada longitud de onda. De esta manera, se realiza un análisis paralelo en diferentes puntos de la misma muestra a la misma longitud de onda.

Entre las diferentes fuentes de haz con una amplia banda espectral que se puede utilizar para llevar a cabo el análisis espectrofotométrico, la fuente de haz puede ser una fuente de luz visible, ultravioleta y/o infrarroja.

30 En cuanto a los medios de transmisión de las señales ópticas, se prevé que la segunda trayectoria del haz de luz no comprenda los medios de transmisión de luz por cable. De esta manera, la resolución del dispositivo no depende del calibre de, por ejemplo, una fibra óptica.

En una disposición, la segunda trayectoria es la trayectoria definida por la luz cuando es reflejada por la muestra.

En una disposición, la segunda trayectoria es la trayectoria definida por la luz cuando pasa a través de la muestra.

### 35 **Descripción de los dibujos**

Como complemento a la descripción facilitada en el presente documento y con el fin de contribuir a que las características de la invención sean más fácilmente comprensibles, de acuerdo con una realización práctica preferente de la misma, dicha descripción va acompañada de un conjunto de dibujos que constituyen parte integrante de la misma, que a modo de ilustración y no de limitación representan lo siguiente:

40 La figura 1 muestra una vista esquemática de una disposición en la que la medición se realiza utilizando la luz reflejada por la muestra.

La figura 2 muestra una vista esquemática de una disposición en la que la medición se realiza utilizando la luz transmitida por la muestra.

La figura 3 muestra una vista en perspectiva de los elementos básicos de un espectrofotómetro.

45 La figura 4A muestra, para una primera prueba de concepto, una fotografía obtenida con un microscopio electrónico de barrido de un conjunto de micropalanca a analizar.

La figura 4B muestra las mediciones de la luz reflejada por una micropalanca en diferentes longitudes de onda. La figura 4C muestra un gráfico que muestra la micropalanca para la que se realizó la medición, así como las mediciones del cambio porcentual en la reflectividad normalizada de dicha micropalanca.

50 La figura 4D muestra un gráfico que muestra el cambio de reflectividad normalizado en función de la longitud de onda del emisor de luz, obtenido en tres posiciones diferentes a lo largo de la micropalanca (cerca del extremo sujeto de la micropalanca, en el medio y cerca del extremo libre).

La figura 5 muestra un mapa de espesor de varias palancas utilizando una medición espectrofotométrica en modo de campo brillante.

La figura 6 muestra imágenes de microscopio obtenidas en modo de campo oscuro, en una segunda prueba de concepto, para nanopartículas plasmáticas en diferentes longitudes de onda.

La figura 7 muestra un ejemplo de normalización de señales de acuerdo con la invención, obtenido mediante espectrofotometría aplicable a la prueba conceptual de la figura 6.

5 La figura 8 muestra los resultados obtenidos en la segunda prueba conceptual de espectrofotometría en modo de campo oscuro de nanopartículas plasmáticas, utilizando la normalización del tipo descrito, en referencia a la figura 7.

### **Realización preferente de la invención**

10 La figura 1 muestra una primera disposición, en particular, la figura 1 muestra un conjunto emisor de luz (1) y medios de transmisión y/o adaptación de dicha luz (2) y, en este caso particular, hay un divisor de haz (20) y un objetivo de microscopio (3) centrado en la muestra (4).

15 La salida de dicho conjunto emisor de luz (1) es un haz de luz que posteriormente pasa hacia los medios de transmisión y/o adaptación de dicha luz (2), siendo posible que dichos medios de transmisión y/o adaptación de luz (2) comprendan lentes y colimadores, entre otros. La salida de estos medios de transmisión y/o adaptación de luz (2) tiene el haz incidente (6) que se envía a la muestra (4) y, opcionalmente, puede haber elementos intermedios tal como divisores de haz (20), lentes (como objetivos de microscopio (3)), etc. Toda esta trayectoria se define como una primera trayectoria y, en lo sucesivo, este haz que se aplica a la muestra se denominará como el haz incidente (6). Posteriormente, se analiza la luz reflejada, siendo esta luz el nuevo haz que, posteriormente, se denomina haz resultante (7).

20 El haz resultante (7) pasa una vez más a través del objetivo del microscopio (3) y el divisor de haz (20) dirige este haz resultante (7) al conjunto de fotodetectores (5).

25 En este caso particular, se utiliza un objetivo de microscopio (3) para poder analizar la muestra con una resolución superior, sin embargo, este objetivo de microscopio (3) debe entenderse como un elemento meramente opcional, ya que puede omitirse si existen medios de muy alta resolución para analizar el haz resultante o si los propios fotodetectores tienen suficiente resolución espacial para llevar a cabo el análisis sin necesidad de incorporar dicho objetivo.

30 A continuación, se describe otra posible disposición con referencia a la figura 2. Esta configuración es útil para la caracterización espectral de muestras en transmisión debido a que el haz incidente y el haz resultante no comparten ningún elemento óptico. En esta realización se utilizan lentes de microscopio independientes (3), una para el haz incidente (6) y otra para el haz resultante (7).

35 En esta disposición, se muestra una fuente de luz (10) con una banda espectral muy amplia (por ejemplo, una lámpara halógena, una lámpara de mercurio, una lámpara de xenón) conectada a un selector de longitud de onda (que puede ser un monocroma (11), un prisma, una serie de filtros ópticos, etc.). Esta configuración permite enviar secuencialmente longitudes de onda predeterminadas. El cambio secuencial y selectivo de la longitud de onda se puede llevar a cabo, por ejemplo, motorizando el selector de longitud de onda.

En esta disposición, el análisis de muestras puede llevarse a cabo alternativamente mediante el uso de un conjunto de emisores de luz en diferentes longitudes de onda que se pueden activar secuencialmente.

40 A la salida de dicho conjunto emisor de luz (1), la luz puede ser transferida, por ejemplo, por una fibra óptica (8) (o cualquier otro tipo de guía óptica) a los medios de transmisión y/o adaptación de dicha luz (2), que pueden comprender lentes o colimadores, entre otros. La salida de estos medios de transmisión y/o adaptación de la luz (2) tiene el haz incidente (6) que se envía a la muestra (4) y puede haber elementos intermedios tales como espejos (21), lentes de microscopio (3), etc.

45 A diferencia del caso de la figura 1, en esta disposición se analiza la luz que pasa a través de la muestra (4) para lo cual podríamos tener lentes de microscopio (3) para la luz que pasa a través de la muestra y también podríamos analizar el haz resultante (7) a través de un conjunto de fotodetectores (5).

Es importante señalar que las disposiciones actuales carecen de medios de transmisión de luz por cable a lo largo del haz resultante (7). No obstante, en algunas disposiciones se pueden utilizar medios cableados para transmitir el haz de luz incidente o los haces de luz en cualquier punto entre la fuente de luz y la muestra.

50 Esta falta de medios de transmisión por cable de luz (o fibras ópticas) de la luz resultante (7) tiene la ventaja de que la resolución espacial de una muestra analizada no depende del diámetro de la fibra óptica.

55 Para ilustrar este efecto, basta con suponer que su objetivo es analizar una muestra para determinar artefactos en dicha muestra con un diámetro de 5  $\mu\text{m}$  en una muestra de 1  $\text{mm}^2$ . Para poder detectar estos artefactos a través de técnicas espectrofotométricas estándar, debe haber una fibra óptica con un diámetro menor que los artefactos (al menos 1  $\mu\text{m}$ ), escanear toda la muestra, realizar tareas para alinearla y procesar datos para determinar qué parte de la muestra se está analizando. Sin embargo, la capacidad de realizar mediciones espectrales en paralelo y

simultáneamente en toda la muestra permite encontrar un pequeño artefacto en una muestra relativamente grande. Por ejemplo, con un haz incidente (6) que tiene un diámetro de al menos  $1 \text{ mm}^2$  y un conjunto de fotodetectores (5) con una resolución que permite detectar dichos artefactos y, sobre todo, no es necesario disponer de un sistema de barrido físico a lo largo de la muestra. Alternativamente, puede haber lentes de microscopio (3) que amplíen el haz resultante (7), facilitando el trabajo del conjunto de fotodetectores (5) ya que la imagen de la muestra es magnificada por dichas lentes.

La figura 3 es una visión en perspectiva de una disposición de ejemplo.

Esta figura muestra un conjunto emisor de luz (1) que comprende una fuente de luz (10) y un monocromador (11) (o, más generalmente, un selector de longitud de onda). Para facilitar la comprensión de la presente invención, se supone que el haz a la salida del monocromador (11) (en otras palabras, el haz incidente (6)) es un haz lineal. Además, en particular las realizaciones de la presente invención, el haz también puede ser un haz bidimensional, cuya longitud de onda puede modificarse secuencialmente.

El haz resultante se analiza de tal manera que un primer componente (101) corresponde a un cierto punto de la muestra y a este punto de la muestra se le asigna un primer fotodetector (110). Asimismo, un segundo componente (102) corresponde a un segundo punto de la muestra asignado a un segundo fotodetector (120), y un tercer componente (103) corresponde a un tercer fotodetector (130). Todos los puntos de la muestra analizada se iluminarán secuencialmente en las diferentes longitudes de onda preseleccionadas y se analizarán de manera similar para cada una de esas longitudes de onda. Esta correlación se almacena en medios de procesamiento, tal como un ordenador, y se puede configurar de acuerdo con la muestra. Además, en dichos medios de procesamiento, se puede analizar el tamaño de la muestra, por ejemplo, mediante un cuarto fotodetector (140) que no recibe luz y, por lo tanto, se pueden definir los límites del contenedor de la muestra que serían útiles para procedimientos posteriores.

De hecho, basta con tener una correlación entre los puntos de la muestra y los fotodetectores, de tal modo que se pueda determinar que el análisis realizado por cada uno de los detectores corresponde a coordenadas espaciales determinadas en la muestra.

Aunque la figura 3 se refiere a un haz incidente lineal para explicar fácilmente la disposición, es importante reiterar que, por ejemplo, se pueden utilizar haces circulares con un diámetro mayor que el de la muestra y que el conjunto de fotodetectores (5) no es una fila de fotodetectores, sino más bien una matriz de ellos, por ejemplo, como un conjunto de fotodetectores (5) que puede tener una cámara CCD en la que cada uno de los píxeles (o conjunto de ellos) corresponde a un fotodetector. De este modo, se pueden tomar medidas simultáneas en toda la muestra.

A continuación, se describe una primera prueba conceptual de las disposiciones, que se refiere a las figuras 4A, 4B, 4C y 4D. Estas figuras muestran la medición espectral de micropalancas del tipo utilizado en aplicaciones microelectrónicas. Esta prueba de concepto se llevó a cabo en reflexión en modo de campo brillante, es decir, utilizando una configuración similar a la de la figura 1.

Como prueba conceptual en modo de campo brillante, se llevó a cabo un análisis espectral en la superficie de los micropalancas de silicio (300) disponibles comercialmente (CLA500-010-08, Concentris, GmbH, Suiza); la figura 4 muestra imágenes obtenidas de un microscopio electrónico de barrido y se muestran las principales características geométricas de dichas micropalancas. Todo el conjunto está formado por ocho micropalancas conectadas al chip (400) a través de una región de presujeción de  $6 \mu\text{m}$  de espesor (301) (ver figura 4A). Dichas micropalancas (300) miden  $500 \mu\text{m}$  de largo,  $100 \mu\text{m}$  de ancho y  $1 \mu\text{m}$  de espesor. Las mediciones se realizaron mediante el uso de un objetivo de microscopio (objetivo 10x LU Plan Fluor, Nikon, apertura numérica N.A. 0.3).

Mediante el uso de un objetivo con bajo aumento, podemos tener un área de detección lo suficientemente grande como para medir simultáneamente cuatro palancas. El objetivo del microscopio utilizado garantiza una resolución espacial de aproximadamente  $1 \mu\text{m}$ . Se realizaron mediciones ópticas en el rango espectral visible de  $538 \text{ nm}$  a  $700 \text{ nm}$  con pasos de  $1 \text{ nm}$  y  $1 \text{ ms}$  de tiempo de adquisición para cada imagen. La caracterización completa de una muestra toma menos de 2 minutos.

Todas las mediciones se normalizaron con una muestra de referencia de silicio para eliminar la dependencia espectral de la fuente de luz, el CCD y todos los elementos ópticos utilizados. Toda la información que se presente a partir de ahora para esta prueba de concepto tendrá en cuenta esta normalización.

En la figura 4B, un primer gráfico (30) muestra las mediciones de la luz reflejada por una micropalanca en diferentes longitudes de onda. Dichas mediciones se toman simultáneamente en todos los puntos de la superficie, repitiendo esta medición para cada una de las longitudes de onda mostradas. Los objetos que se analizan son: una primera área (301) que corresponde a la presujeción; y la micropalanca, que corresponde a una segunda área (302).

Como se muestra en el primer gráfico (30), se han tomado medidas para longitudes de onda ( $\lambda$ ) de  $577 \text{ nm}$ ,  $589 \text{ nm}$ ,  $606 \text{ nm}$ ,  $622 \text{ nm}$ ,  $642 \text{ nm}$ ,  $662 \text{ nm}$  y  $686 \text{ nm}$ . Dichas mediciones se toman secuencialmente (en otras palabras, primero para  $577 \text{ nm}$ , luego para  $589 \mu\text{m}$ , y así sucesivamente).

Las imágenes de este primer gráfico (30) muestran diferencias notables en la reflectividad de la micropalanca (es

decir, en la segunda área (302)) dependiendo de la longitud de onda, mientras que en la primera área (301) no se observan variaciones notables en la reflectividad.

La figura 4C muestra una imagen óptica (306) de una micropalanca (300) que se ha medido, y bajo esta micropalanca (300), se muestra un segundo gráfico (31) con las medidas del cambio porcentual en la reflectividad normalizada obtenida a lo largo de la micropalanca (en otras palabras, a lo largo de la línea discontinua (307) de la imagen óptica (306)) en función de la longitud de onda (eje de ordenadas). En concreto, se analizarán tres puntos diferentes a lo largo de dicha micropalanca: la base (303), un punto intermedio (304) y el extremo libre (305).

Para cada punto de la micropalanca, se puede observar la modulación de la reflectividad en función de la longitud de onda. Esta modulación se debe a la presencia de múltiples reflexiones en el interior de la palanca que pueden producir interferencia constructiva (máximos de reflectividad) o interferencia destructiva (reflectividad mínima) dependiendo de la longitud de onda analizada. En el caso de la región de presujeción, este tipo de modulación no se observa porque la absorción de silicio no permite múltiples reflexiones dentro de una estructura más gruesa (6  $\mu\text{m}$ ).

La figura 4D muestra un tercer gráfico (32) que muestra cómo las modulaciones de reflectividad cambian entre la base (303), el punto intermedio (304) y el extremo libre (305) debido a las variaciones en el espesor a lo largo de la palanca. En esta prueba de concepto, el único parámetro que modifica el desplazamiento espectral se debe al cambio en la estructura de la palanca, de tal modo que con esta técnica óptica se puede calcular fácilmente el espesor de la estructura estudiada.

La figura 5 muestra un mapa de espesor de 5 de las micropalancas de la figura 4A utilizando una medición espectrofotométrica, en la que la escala de grises que se muestra a la derecha de cada figura representa el espesor de la palanca expresado en nanómetros. El mapa de espesor se obtuvo mediante el análisis de la reflectividad normalizada para cada píxel CCD y el ajuste de dicha reflectividad a un modelo teórico conocido en el estado de la técnica. Cada micropalanca se detecta a través de aproximadamente 50.000 píxeles.

Los mapas de espesor de la figura 5 muestran, de manera general, variaciones significativas de espesor en varias micropalancas a lo largo del ancho de estas. Algunas de las micropalancas, tal como la primera micropalanca (12) y la segunda micropalanca (13) presentan una buena homogeneidad de espesor, sin embargo, la tercera micropalanca (14), la cuarta micropalanca (15) y la quinta micropalanca (16) muestran variaciones significativas de espesor que merecen un análisis más profundo.

En particular, la tercera micropalanca (14) tiene una grieta (141) con un espesor sustancialmente más delgado que el resto de su superficie y un segundo paso (142) que tiene un espesor significativamente mayor que el resto.

En cuanto a la cuarta micropalanca (15), tiene una primera área (151) con un espesor sustancialmente mayor que el de una segunda área (152).

Por último, la quinta micropalanca (16) tiene una primera área (160) que es más espesa cerca de la región de sujeción y una segunda área (161) donde su espesor es mucho menor que el espesor promedio.

La segunda prueba conceptual consistió en el estudio espectrofotométrico de nanopartículas plasmónicas de oro de 100 nm de diámetro. En este caso, la presente invención se utiliza para una medición de espectroscopia de reflectancia de campo oscuro, como se conoce en el estado de la técnica, de acuerdo con el diagrama experimental que se muestra en la figura 1. Para llevar a cabo mediciones espectroscópicas de campo oscuro, se modificó el sistema experimental de la primera prueba conceptual, sustituyendo el objetivo del microscopio por uno del campo oscuro (LU Plan Fluor 100X, Nikon, apertura numérica N.A. 0.9) y el divisor de haz por uno específico para este modo.

Como se puede observar en la figura 6, en esta prueba se midió una muestra de silicio (17) con una serie de nanopartículas de oro depositadas en ella. La alta apertura numérica del objetivo utilizado (apertura numérica 0,9) garantiza, en este caso, una resolución espacial de aproximadamente 300 nm.

En la presente invención, toda la muestra (17) se midió sin barrido de la superficie y solo iluminando secuencialmente toda la muestra en diversas longitudes de onda para los diferentes valores de dicha longitud de onda. Se tomaron mediciones en el rango espectral visible de 480 nm a 680 nm con pasos de 1 nm y un tiempo de adquisición de 30 ms para cada imagen.

A modo de ilustración, la figura 6 muestra imágenes de luz dispersada por una sola nanopartícula (170) en algunas de las longitudes de onda del rango espectral visible, es decir, a 495 nm (171), 508 nm (172), 554 nm (173), 574 nm (174), 608 nm (175) y 658 nm (176).

En dichas mediciones, se observa que el comportamiento de la luz dispersada es diferente dependiendo de la longitud de onda que se vaya a analizar. La luz dispersa de dicha nanopartícula se ha normalizado de acuerdo con un procedimiento que representa un importante elemento de novedad en comparación con las técnicas experimentales anteriores.

La figura 7 muestra un dibujo esquemático de una realización de normalización de la señal obtenida mediante

espectrofotometría aplicable a la prueba conceptual de la figura 6.

5 Cada objeto de dispersión de luz (22) tiene a su alrededor una región más oscura (23) que representa la luz dispersa que proviene de la muestra y que es muy útil como señal de referencia para el objeto de dispersión de luz cercana. De esta manera, la normalización de la señal se lleva a cabo de una manera muy específica para cada objeto de dispersión de luz, asegurando un aumento notable en la medición de la relación señal-ruido.

10 Con este procedimiento de normalización, la señal a medir se obtiene a través de una única medición, y asimismo, la señal de referencia se obtiene en las mismas condiciones experimentales (con la misma intensidad de la fuente de luz, el mismo foco y la misma intensidad de iluminación). Otra ventaja añadida de este aspecto es que la caracterización óptica de la muestra es más rápida ya que no es necesario realizar dos mediciones sucesivas, como es el caso de los espectrómetros del estado de la técnica.

La figura 8 muestra los espectros normalizados de la luz dispersa para diversas nanopartículas de la figura 6.

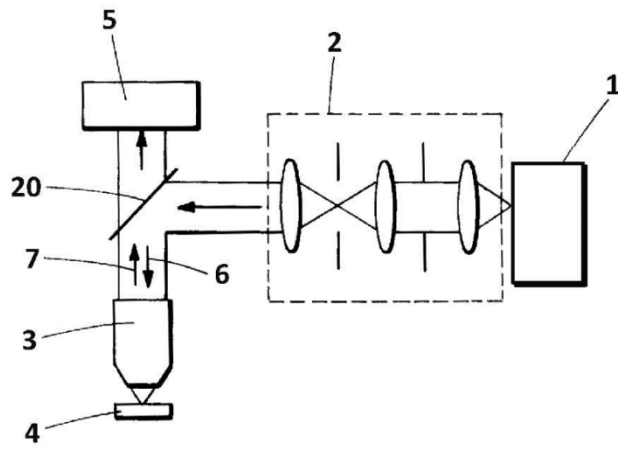
Los datos se procesaron con una función escrita en Matlab®, que reconoce automáticamente todas las posiciones de las nanopartículas y lleva a cabo la normalización de la luz dispersa para cada una de esas nanopartículas.

Además, muestra el espectro normalizado de la dispersión media (18) de todas las nanopartículas de la figura 6.

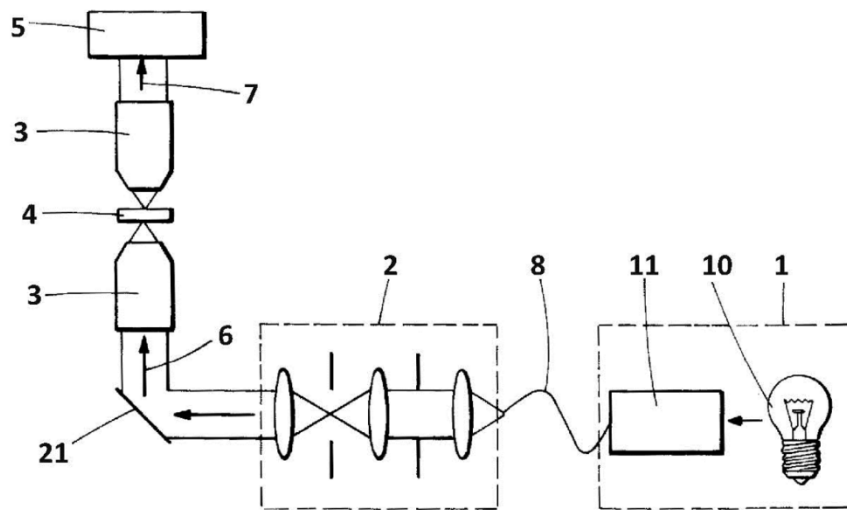
15

**REIVINDICACIONES**

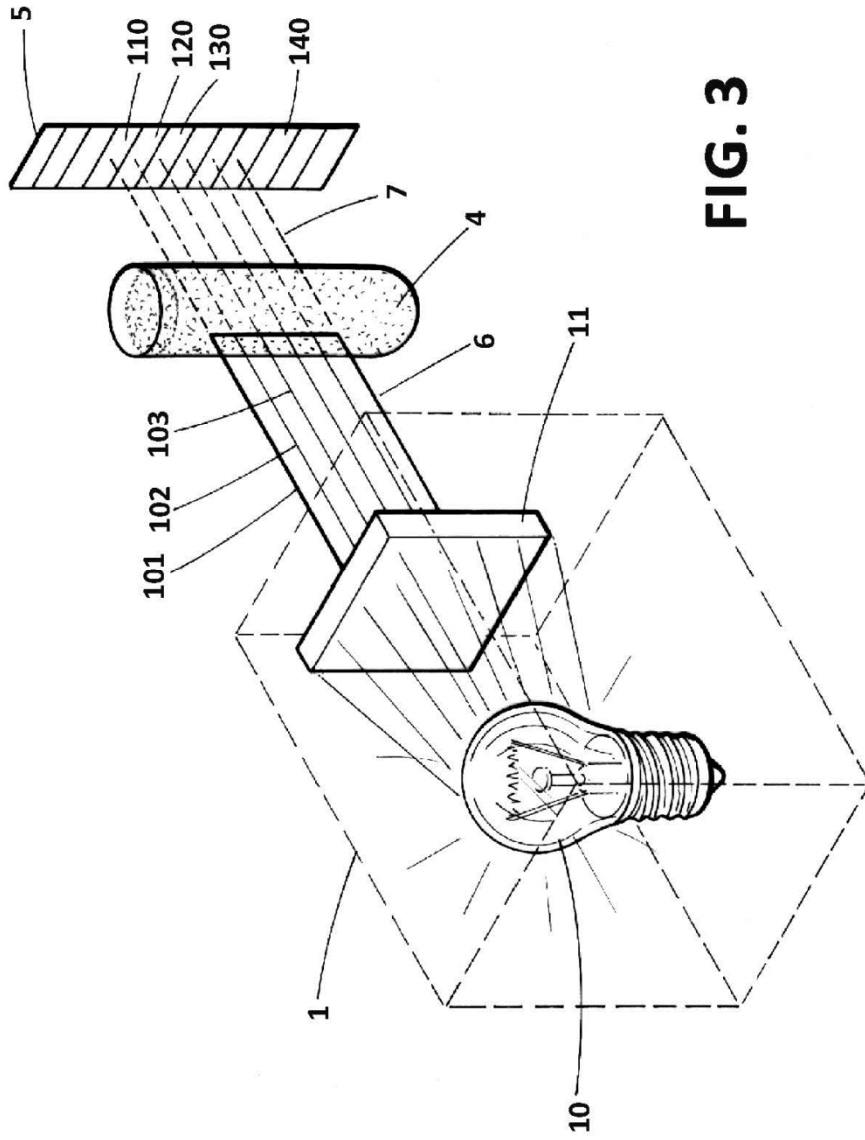
1. Un procedimiento para el estudio espectrofotométrico de nanopartículas plasmónicas de oro, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 5           - dirigir la luz desde un emisor de un haz de luz (1) a través de una primera trayectoria óptica hacia una muestra (4) que comprende las nanopartículas, iluminando de este modo secuencialmente la totalidad de la muestra a diversas longitudes de onda,  
          - detectar la luz dispersa después de que haya pasado a través de un objetivo de campo oscuro por un conjunto de fotodetectores (5) dispuestos en una segunda trayectoria óptica definida como la trayectoria del haz de luz después de entrar en contacto con la muestra (4),
- 10          - procesar el haz de luz recibido por los fotodetectores (5), mediante medios de procesamiento que tengan una correlación, en el que cada uno de los fotodetectores (5) corresponda a un punto espacial de la muestra (4) y,  
          - normalizar la luz dispersa de cada nanopartícula utilizando la región más oscura alrededor de la partícula como señal de referencia.
- 15          2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el emisor (1) comprende una fuente de luz (10) con una amplia banda espectral y un selector de longitud de onda.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado porque** comprende medios para modificar la longitud de onda seleccionada por el selector de longitud de onda.
4. El procedimiento de acuerdo con la cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, **caracterizado porque** el selector de longitud de onda es un monocromador (11).
- 20          5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el emisor (1) comprende una serie de fuentes de luz, generando cada una de dichas fuentes de luz un haz de luz a una longitud de onda diferente.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** comprende medios para seleccionar la fuente de luz (10) que ilumina la muestra (4).
- 25          7. El procedimiento de la reivindicación 6, **caracterizado porque** los medios para seleccionar la fuente de luz (10) que ilumina la muestra comprenden medios para la modificación secuencial de la fuente que ilumina la muestra (4).
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el conjunto de fotodetectores (5) es una cámara CCD en la que cada uno de los píxeles de la serie de píxeles de dicha cámara CCD es un fotodetector.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** tiene una pluralidad de lentes en la primera trayectoria.
- 30          10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la segunda trayectoria del haz de luz comprende medios inalámbricos de transmisión de luz.



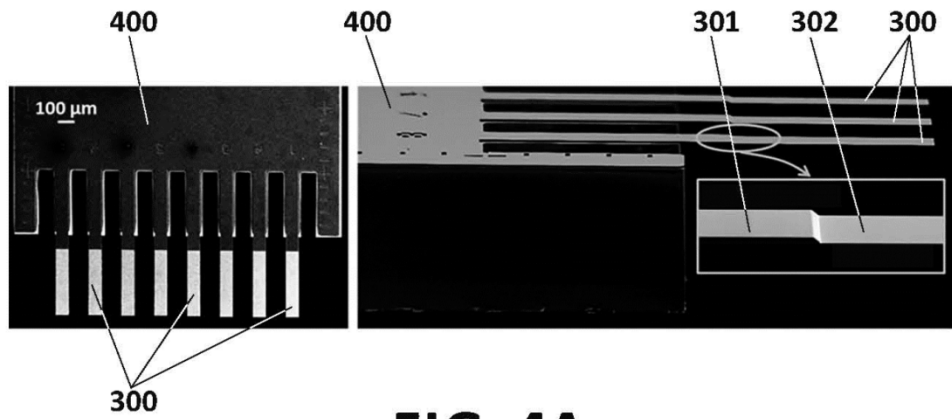
**FIG. 1**



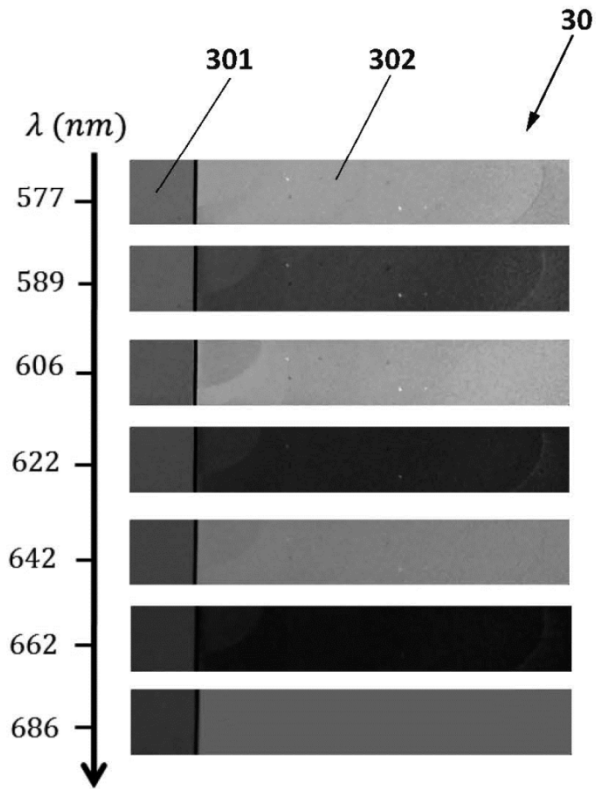
**FIG. 2**



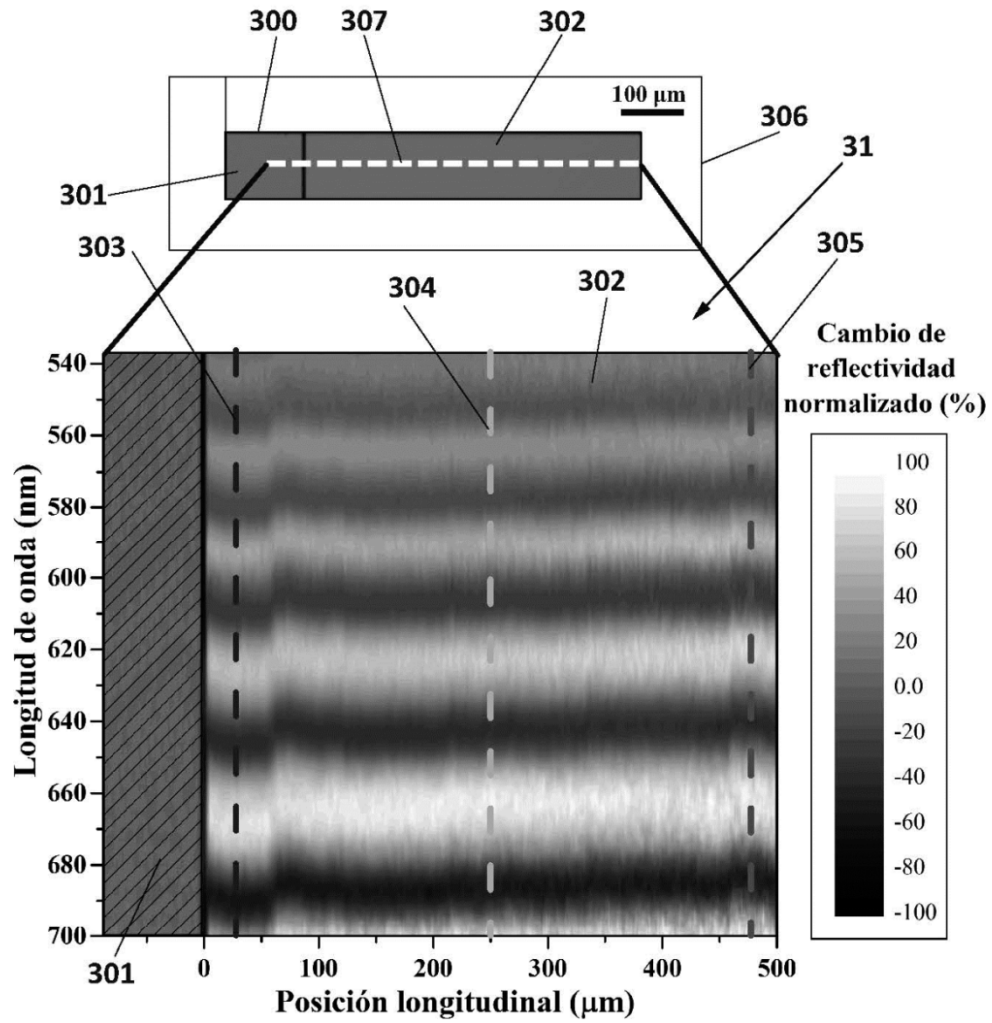
**FIG. 3**



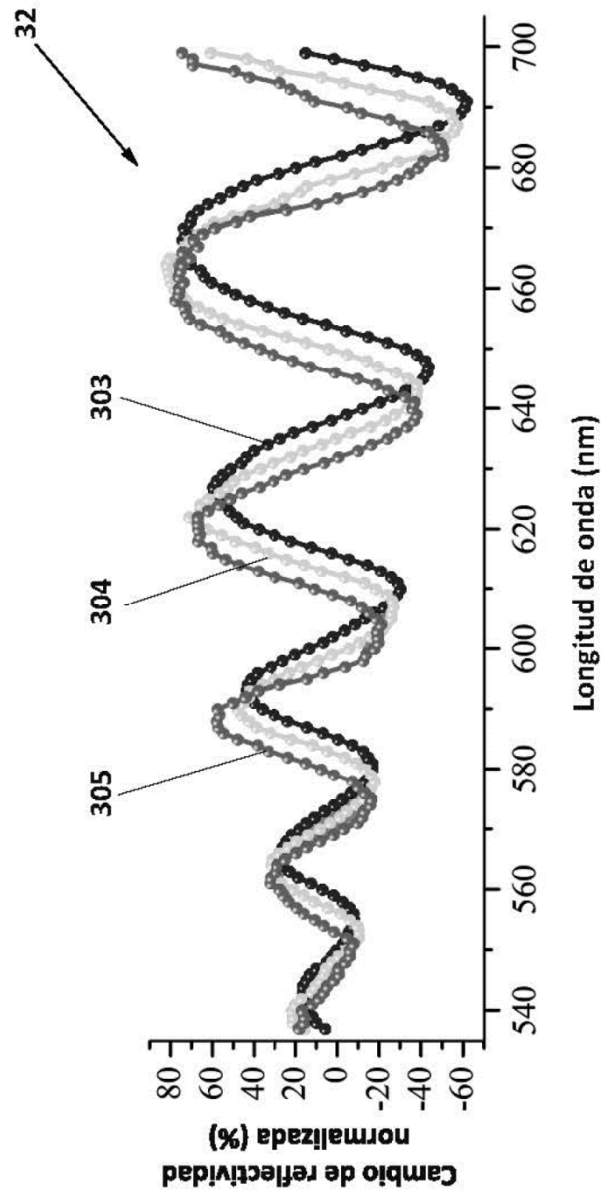
**FIG. 4A**



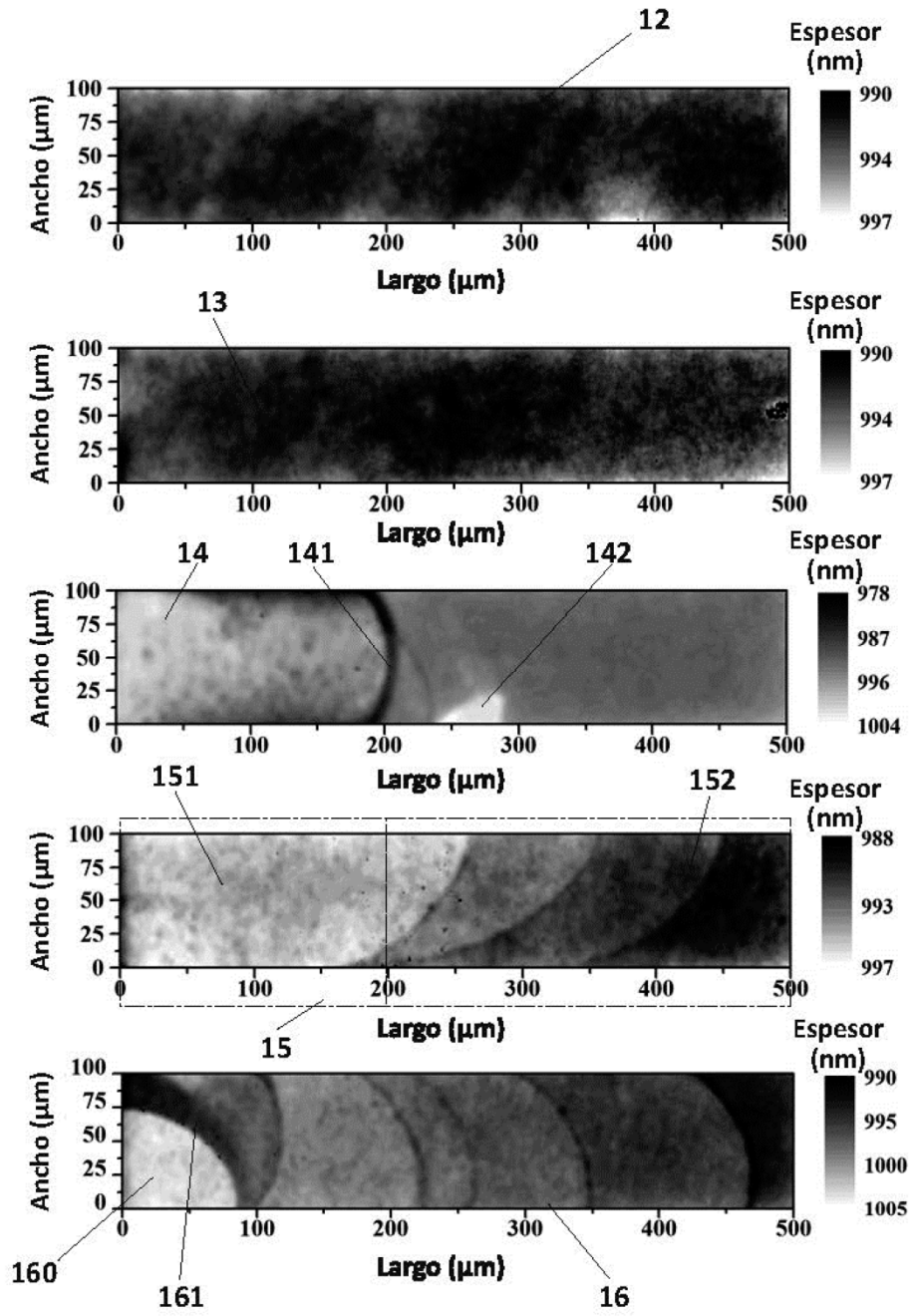
**FIG. 4B**



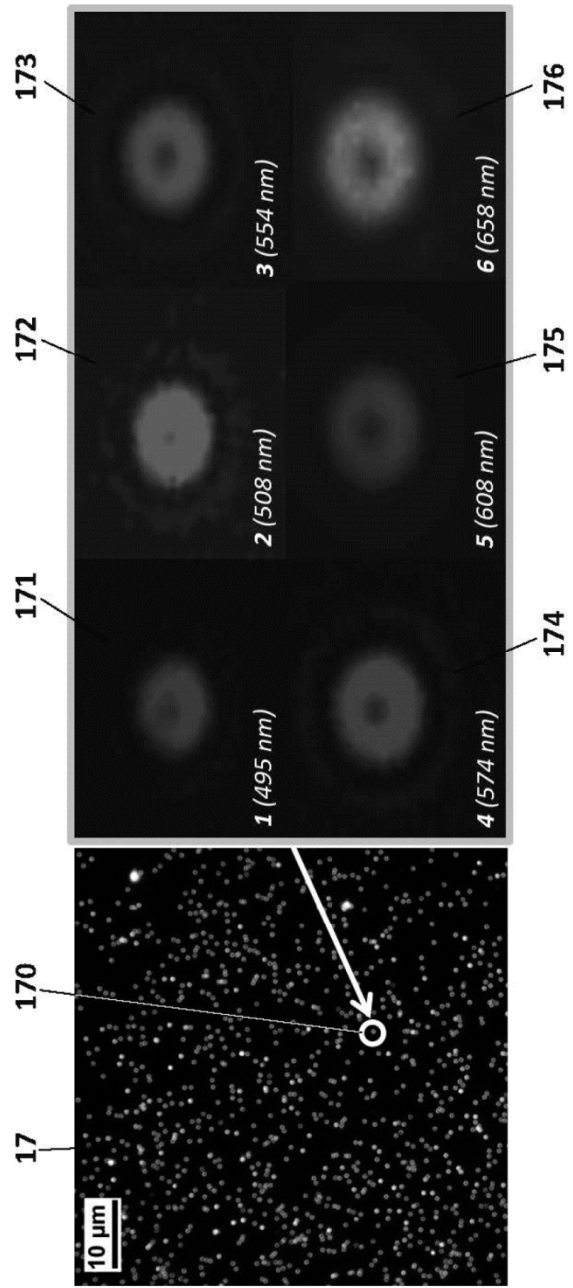
**FIG. 4C**



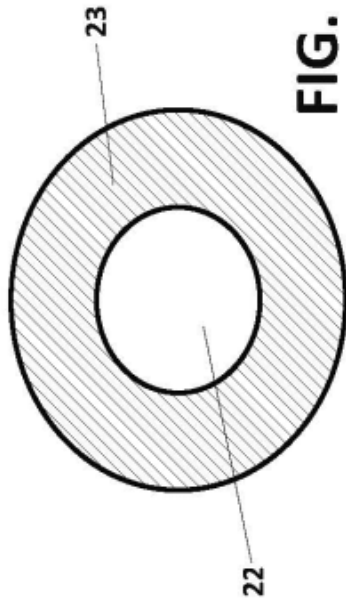
**FIG. 4D**



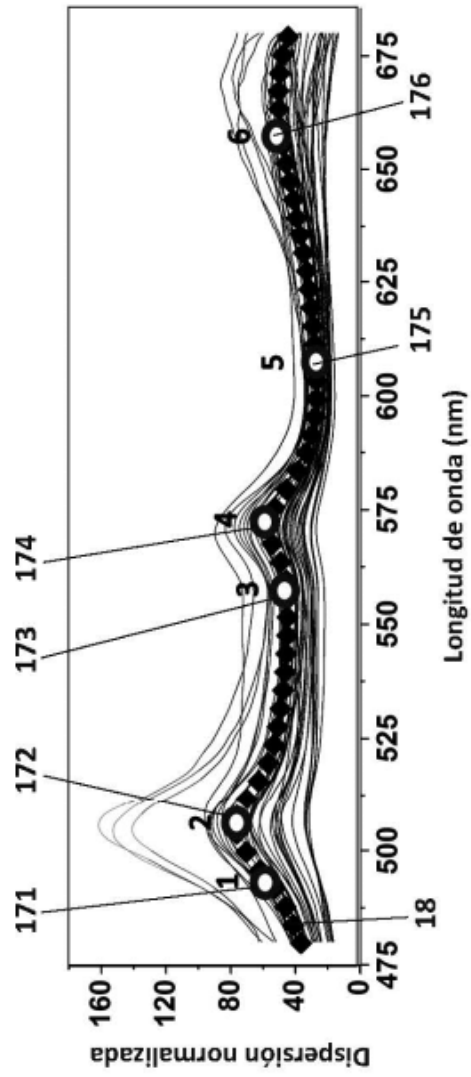
**FIG. 5**



**FIG. 6**



**FIG. 7**



**FIG. 8**