

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 829 627**

(51) Int. Cl.:

**G02B 26/08** (2006.01)  
**G02B 3/00** (2006.01)  
**A61B 1/07** (2006.01)  
**A61B 1/00** (2006.01)  
**G02B 23/24** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2014 PCT/AU2014/000634**  
(87) Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2014 WO14201501**  
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2014 E 14813763 (1)**  
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2020 EP 3011380**

---

(54) Título: **Escáner óptico y sonda óptica de lente de escaneo**

(30) Prioridad:

**19.06.2013 AU 2013902228**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.06.2021**

(73) Titular/es:

**OPTISCAN PTY LTD (100.0%)  
15-17 Normanby Road  
Notting Hill, Victoria 3168, AU**

(72) Inventor/es:

**VANCE, RODERICK WILLIAM CHARLES**

(74) Agente/Representante:

**VIDAL GONZÁLEZ, María Ester**

**ES 2 829 627 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

Escáner óptico y sonda óptica de lente de escaneo

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un escáner óptico y una sonda óptica de lente de escaneo, de aplicación particular, pero de ninguna manera exclusiva como un microscopio, endoscopio o endomicroscopio.

10 Antecedentes de la Invención

En general, cuanto más lejos esté un objeto del centro del eje óptico de un sistema óptico, peor será la relación Strehl del sistema de formación de imágenes y, por tanto, más tenue aparecerá el objeto y peor será su relación señal/ruido. Además, existe una compensación entre el campo de visión y la apertura numérica: cuanto mayor es la apertura numérica de un sistema óptico (es decir, cuanto más pequeño es el objeto que puede resolver), más pequeño es el campo de visión sobre el cual la relación Strehl del sistema es aceptablemente grande (particularmente para sistemas *in vivo*) y sobre el cual el viñeteado es aceptablemente pequeño. Esta compensación surge del cambio de la geometría relativa de la óptica de formación de imágenes, el objeto y la imagen del objeto a medida que cambia la posición de un objeto en el campo de visión. Los sistemas ópticos prácticos que se optimizan para formación de imágenes en el eje no se optimizan simultáneamente para formación de imágenes fuera del eje. Cuanto mayor sea la apertura numérica del sistema, mayor será la sensibilidad de cualquier diseño a un cambio en la geometría relativa entre el objeto, el sistema de formación de imágenes y la imagen. Las aberraciones, en particular el coma, aumentan fuera del eje. La posición focal en las longitudes de onda de excitación y fluorescencia debe ser la misma dentro de las resoluciones lateral y axial del instrumento.

25 Por ejemplo, la Figura 1 es una vista esquemática de una lente colectora confocal de muchos elementos de la técnica anterior, con 0,3 NA, una relación Strehl de 0,8, desplazamiento cromático axial < 2 mm y desplazamiento cromático lateral < 150 nm en todo el campo de visión (FOV). Para fabricar esta lente con una relación Strehl de 0,5 o mayor en todo el campo de visión, es necesario considerar las limitaciones de las técnicas de fabricación existentes, y la agregación de imperfecciones de fabricación, etcétera, y tener en cuenta el radio de curvatura esperado de la superficie de formación de imágenes en el tejido (en este ejemplo, > 3 mm). Por lo tanto, se requiere un diseño o una relación Strehl teórica de 0,95, tanto en la longitud de onda de excitación de 488 nm como en la longitud de onda máxima de emisión de fluorescencia de 532 nm, junto con un desplazamiento cromático focal lateral de menos de 150 nm y un desplazamiento cromático focal axial de menos de 2  $\mu$ m entre las dos longitudes de onda en todo el campo de visión, todo con un radio de curvatura de la superficie de formación de imágenes en el tejido superior a 3 mm. Esto se logra mediante el uso del diseño de múltiples elementos de la lente que se muestra en la Figura 1.

30 La concatenación de diez elementos ópticos a su vez hace que sea costoso lograr la estricta calidad óptica y las tolerancias mecánicas requeridas. Suponiendo que la aberración de las imperfecciones de cada superficie se agrega incoherentemente, la aberración de las catorce interfaces de aire a cristal es aproximadamente  $\sqrt{14} \approx 3,7$  veces la aberración agregada por cada superficie. Las especificaciones ISO 10110 requeridas para cada superficie dentro del ensamblaje final son 3/0,5(0,5/-) RMSi < 0,05,  $\lambda = 633$  nm y 4/5'.

40 Un problema adicional de estos sistemas es la baja apertura numérica del campo de salida de la fibra. La apertura numérica (NA) de la salida de campo de una fibra de modo simple de 450 nm es de aproximadamente 0,1. Para muchas aplicaciones de formación de imágenes clínicas *in vivo*, se necesitan aperturas numéricas de 0,2 o más. Por lo tanto, se necesita aumento óptico si va a usarse un campo propio unido de fibra óptica de modo simple como el orificio confocal para aumentar esta apertura numérica en un factor de dos o más. Esto significa que la amplitud de escaneado de la fibra debe ser dos o más veces la del campo de visión en el tejido. Un sistema de escaneado con un aumento de 2 $\times$  debe lograr una amplitud de escaneo de la fibra óptica de dos veces el campo de visión deseado.

45 Un sistema con una disposición óptica más simple se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Número 2011/0211104 y se explora además en "High-resolution resonant and nonresonant fiber-scanning confocal microscope", J. Biomedical Optics 16(2), 026007 (febrero de 2011). El documento US 2011/0211104 describe una sonda óptica para un endoscopio de escaneado confocal. La sonda comprende una guía óptica, una primera lente que se monta en una porción del extremo distal de la guía óptica para enfocar la luz de la guía óptica, un actuador para desplazar la porción del extremo distal y la primera lente para permitir el escaneado óptico, y una segunda lente en el interior de la sonda para recibir la radiación de la primera lente. La segunda lente, que comprende una lente negativa, desvía la radiación de la primera lente en una dirección correspondiente a una dirección de desplazamiento de la primera lente mediante el actuador. Se dice que la invención es particularmente útil para aumentar el campo de visión (FOV) de sondas ópticas desechables baratas. Así, la primera lente se acopla mecánicamente a la guía óptica, lo que evita la compensación entre el campo de visión y la apertura numérica, permitiendo valores altos de ambos parámetros, y también elimina el desplazamiento cromático lateral mientras la geometría relativa de la lente, el tejido fotografiado y el cubreobjetos permanecen igual que la geometría en el eje durante el escaneo.

Sin embargo, el sistema del documento US 2011/0211104 incluye varios canales eléctricos que corren a lo largo de un tubo de acero de escaneo que acopla la primera lente a la guía óptica, emplea lentes grandes y pesados y no aborda el problema de la aberración cromática (excepto para calcular la dispersión del pulso para formación de imágenes de muchos fotones).

5 El documento US 2001/055462 A1 describe un sistema integrado de adquisición de imágenes endoscópicas y administración terapéutica que usa iluminación óptica dirigida y escaneada proporcionada por una fibra óptica de escaneo o guía de ondas de luz que se impulsa mediante un actuador incluido en un extremo distal de un instrumento de diagnóstico/terapéutico y de formación de imágenes integrado; se dice que el sistema mejora las características topográficas, la visualización estereoscópica y la medición precisa de los tamaños de las características de una región de interés en el cuerpo de un paciente que facilitan el diagnóstico, el monitoreo y/o la terapia con el instrumento.

10 15 El documento US 7 068 878 B2 describe una fibra óptica con una región de sección transversal reducida adyacente a su extremo distal, que se fusiona a un componente óptico con un punto focal posterior que coincide sustancialmente con una fuente de luz efectiva de la fibra óptica. El componente óptico es "una lente de bola, una lente de tambor, una lente de índice graduado o un elemento óptico difractivo" [Resumen].

20 25 El documento US 20131/20550 A1 describe un sistema de microscopio de profundidad de campo extendido para la detección de objetos de fase que incluye un módulo óptico de formación de imágenes y un módulo de conversión de fase/intensidad. El módulo óptico de formación de imágenes tiene un grupo de lentes de objeto, en el que se añade una codificación de fase simétrica axial, para producir una aberración esférica simétrica axial. Puede obtenerse una función de dispersión de punto (PSF) y una imagen con profundidad de campo extendida con un nivel predeterminado de similitud.

30 35 40 El documento US 2004/254474 A1 describe un escáner de fibra óptica para formación de imágenes por excitación multifotónica, tomografía de coherencia óptica o para formación de imágenes confocales en las que se llevan a cabo exploraciones transversales en una pluralidad de profundidades sucesivamente diferentes dentro del tejido. El escáner de fibra óptica se implementa como un endoscopio de escaneado mediante el uso de una fibra óptica en voladizo que se impulsa a resonancia o casi resonancia mediante un actuador. El actuador se energiza con señales de activación que hacen que la fibra óptica escaneé en un patrón deseado a profundidades sucesivamente diferentes a medida que cambia la profundidad del punto focal.

#### Resumen de la Invención

45 50 55 En un primer aspecto general, una modalidad de la presente invención proporciona un grupo de lentes para un endoscopio o microscopio, que comprende:

uno o más elementos de lente, cada uno de índice de refracción uniforme, que se adapta para:

60 i) enfocar, con corrección de la aberración de frente de onda alta, la luz de activación o excitación que se recibe desde una punta de salida de una guía de ondas óptica (tal como una fibra óptica) que se ubica sustancialmente contra una superficie proximal del grupo de lentes hasta un campo de observación puntual con función de dispersión de punto estrecho más allá de una superficie distal del grupo de lentes (tal como fuera de una ventana óptica ubicada distalmente con relación a la superficie distal); y

65 ii) transmitir, con una corrección de la aberración de frente de onda alta, la fluorescencia o la luz de retorno reflejada que recibe la superficie distal desde el campo de observación puntual (y su vecindad definida por la función de dispersión de punto de longitud de onda de fluorescencia) de regreso a la punta de salida de la guía de onda óptica en la longitud de onda de fluorescencia;

50 en donde el grupo de lentes se acopla, en uso, a la punta distal de la guía de ondas óptica.

Por lo tanto, el grupo de lentes rompe la compensación tradicional entre el campo de visión y la apertura numérica, ya que permite tener valores altos de ambos parámetros y también permite minimizar o eliminar el desplazamiento cromático lateral, al mantener la geometría relativa del grupo de lentes, la muestra de imagen y el cubreobjetos igual que la geometría en el eje a lo largo de un escaneo.

60 65 El grupo de lentes puede proporcionarse en un escáner que es muy pequeño y liviano mientras está altamente corregido ópticamente tanto para aberración como para desplazamiento cromático (ya sea "activa" o "pasivamente", como se describe a continuación); puede usarse una guía de ondas óptica desnuda (por ejemplo, una fibra óptica convencional totalmente de cristal sin revestimiento especializado u otro dispositivo de modificación de la rigidez/inercia) para que el sistema de lentes pueda miniaturizarse lo suficiente y escanearse a alta velocidad (es decir, a frecuencias de resonancia del orden de magnitud más rápida que los 150 Hz a los que se hace referencia en algunas de las técnicas anteriores). El grupo de lentes puede unirse directamente a la guía de ondas óptica (de escaneo) sin prácticamente ningún espacio de aire entre la guía de ondas óptica y el primer elemento de la guía de ondas, lo que simplifica la construcción y permite realizar fácilmente la alineación activa.

La presente invención permite la construcción de una sonda "universal" que permite la formación de imágenes simultáneas de un fotón y dos fotones con efectivamente cualquier número de fluoróforos, mientras que lleva todas las longitudes de onda al mismo foco dentro de 2 μm en un espectro de 450 nm a 850 nm y aperturas numéricas de hasta 0,5 NA, y posiblemente tan altas como 0,7 NA. Además, esta corrección cromática proporciona un rendimiento de formación de imágenes de dos fotones mejor que la técnica anterior discutida anteriormente.

5 En una modalidad, la luz de retorno de fluorescencia y la luz de activación o excitación tienen la misma longitud de onda (es decir, el sistema es un sistema de formación de imágenes en modo de reflexión).

10 En una modalidad, el grupo de lentes comprende además un elemento óptico de difracción que se une a la superficie distal. El grupo de lentes puede comprender una varilla de cristal sin foco, en donde el elemento de difracción proporciona el foco.

15 En otra modalidad, el grupo de lentes tiene un desplazamiento cromático que se corrige altamente de manera que el grupo de lentes enfoca la luz de fluorescencia que se recibe desde la punta de salida de la guía de ondas óptica al campo de observación puntual dentro de un pequeño margen de error (y por lo que, tanto la luz de activación como la luz de fluorescencia se enfocan en un campo de observación de punto común dentro de ese margen de error). En este contexto, "pequeño margen de error" significa pequeño en comparación con la resolución axial.

20 En una modalidad, el grupo de lentes tiene un desplazamiento cromático que se corrige altamente de manera que un paquete de onda de luz de entrada con ancho de pulso de menos de un picosegundo y centrado en una longitud de onda de la luz de activación solo se ensancha ligeramente en el ancho de pulso cuando pasa a través del grupo de lentes (de modo que la pérdida de la intensidad de pulso máxima y la eficiencia del acoplamiento de dos fotones son pequeñas), lo que hace que el sistema sea especialmente adecuado para la formación de imágenes de muchos fotones. Por ejemplo, sería deseable una pérdida de menos de 1 dB, pero también sería valioso un grupo de lentes (o sistema proporcionado con el mismo) con una pérdida de 2 dB o 3 dB.

25 El grupo de lentes puede tener criterios de corrección de resolución y aberración de manera que:

30 a) la apertura numérica de la luz enfocada por el grupo de lentes es (i) 0,15 o mayor cuando el grupo de lentes recibe luz de la guía de ondas óptica a una longitud de onda de luz de activación nominal, y (ii) 0,15 o mayor a una longitud de onda de emisión de fluorescencia máxima; y

35 b) o el producto de la primera y la segunda relación Strehl correspondiente medida en el campo de observación puntual es mayor o igual a 0,5 o el producto de Strehl generalizado:

$$\max_{\mathbf{r} \in \mathbb{R}^3} (\mathcal{S}(\mathbf{r}, \lambda_D)^N \times \mathcal{S}(\mathbf{r}, \lambda_F)^\alpha) \quad \text{Ecuación 1}$$

40 es mayor o igual a 0,5, la definición que sea aplicable a un modo de formación de imágenes de fluorescencia.

45 El grupo de lentes puede tener criterios de ampliación de pulso definidos de manera que un paquete de ondas de luz de entrada centrado en una longitud de onda de excitación nominal y de veinte femtosegundos de duración se amplie a un paquete de ondas de igual longitud de onda central y de menos de cien femtosegundos de duración mediante una contribución de múltiples rutas del grupo de lentes.

50 El grupo de lentes puede tener un diámetro exterior de menos de 1 mm, una longitud de menos de 5 mm y una masa de menos de 20 mg.

55 El grupo de lentes puede comprender (i) dos cristales distintos en el grupo de lentes, (ii) una interfaz esférica entre los dos cristales distintos y (iii) una superficie distal que es asférica, por lo que el grupo de lentes se adapta para pares de longitud de onda de activación/fluorescencia en un espectro de luz visible ampliado con una longitud de onda de 450 nm a 850 nm.

60 En una modalidad, el grupo de lentes comprende un tipo de cristal (y carece de dispositivos de corrección de desplazamiento cromático), en donde el grupo de lentes comprende una cantidad de cristal de manera que los campos de ondas transmitidos tienen un tiempo de transmisión insuficiente para dispersarse en un grado que produciría una relación Strehl menor de 0,5, por lo que el grupo de lentes se adapta para pares de longitudes de onda de activación/fluorescencia estrechamente espaciados (normalmente 50 nm de separación o menos).

65 El grupo de lentes puede comprender una pluralidad de cristales de más de un tipo, en donde el grupo de lentes tiene una dispersión que se cancela mutuamente y el grupo de lentes se adapta para su uso con cualquier par de longitudes de onda de activación/fluorescencia (que incluye los pares donde las longitudes de onda de fluorescencia y excitación son iguales) en el rango de longitud de onda del espectro de luz visible ampliado de 450 nm a 850 nm. Dos de los cristales pueden separarse por un espacio intermedio (tal como un espacio libre o de aire).

En esta modalidad, por lo tanto, la pluralidad de cristales incluye al menos dos tipos de cristal. De hecho, la pluralidad de cristales puede ser todos diferentes entre sí. En general, sin embargo, proporcionan una dispersión que se cancelan mutuamente. En la práctica, esto comúnmente (pero no siempre) significa que el orden de los cristales es el tipo A seguido del tipo B (en el grupo proximal), luego el tipo B seguido del tipo A (en el grupo distal).

5 En una modalidad, el grupo de lentes comprende una varilla cilíndrica homogénea y una rejilla de difracción unida al extremo distal de la misma, en donde la rejilla (en lugar de una superficie refractiva) enfoca la luz de activación al campo de observación puntual y guía la luz de retorno desde el campo de observación puntual hacia la punta de salida de la guía de ondas óptica.

10 En otra modalidad, el grupo de lentes comprende una varilla cilíndrica homogénea y una rejilla de difracción unida al extremo distal de la misma, en donde la rejilla (en lugar de una superficie refractiva) enfoca la luz de activación al campo de observación puntual, la rejilla guía la luz de retorno hacia la punta de salida de la guía de ondas óptica, una primera porción de la rejilla se configura para enfocar la luz de activación y una segunda porción se configura para recolectar la luz de retorno (por ejemplo, fluorescencia).

15 En otra modalidad más, el grupo de lentes comprende una pluralidad de elementos de lente (de cristales similares o diferentes) pegados o unidos entre sí de otro modo después de la fabricación, normalmente mediante mecanizado. Esto permite que se construyan fácilmente mediante robots CNC de fabricación de lentes, que de otra manera tienden a romper lentes cuyo perfil lateral es demasiado largo y delgado.

20 En un segundo aspecto amplio, la presente invención proporciona un sistema óptico, que comprende un grupo de lentes como se describió anteriormente.

25 El sistema óptico puede comprender la guía de ondas óptica.

30 En una modalidad, el sistema óptico comprende además un soporte en voladizo configurado para sujetar la guía de ondas óptica, un imán montado en la guía de ondas óptica y un sistema de accionamiento para hacer que el imán vibre en dos planos de manera que la superficie distal del grupo de lentes se escanea a alta velocidad para crear un amplio campo de visión de la imagen de la luz de retorno (por ejemplo, fluorescencia).

35 El sistema de accionamiento puede configurarse para escanear en una primera dirección con una frecuencia de al menos 500 Hz y escanear en una segunda dirección orthogonal a la primera dirección con una frecuencia de al menos 0,5 Hz, de manera que una imagen cuyo campo de visión esté en al menos  $200\mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$  puede obtenerse de la luz de retorno (por ejemplo, fluorescencia).

40 En un tercer aspecto amplio, la presente invención proporciona un sistema óptico que comprende:

una guía de ondas óptica que tiene un núcleo principal (*por ejemplo*, modo simple) y un núcleo secundario altamente multimodal; y uno o más elementos de lente, cada uno de índice de refracción uniforme;

45 en donde una punta de salida de la guía de ondas óptica se ubica sustancialmente contra una superficie proximal del grupo de lentes; el núcleo principal se configura para transmitir luz de activación o excitación desde una fuente de luz al grupo de lentes;

el grupo de lentes se configura para

i. enfocar, con corrección de aberración de frente de onda alta, la luz de activación o excitación que se recibe desde la punta de salida de una guía de onda óptica a un campo de observación puntual con función de dispersión de punto estrecho más allá de una superficie distal del grupo de lentes (tal como fuera de una ventana óptica ubicada distalmente con relación a la superficie distal); y

ii. transmitir, con una corrección de aberración modesta, la fluorescencia desde el campo de observación puntual (y su vecindad definida por la función de dispersión de punto de longitud de onda de fluorescencia) de regreso a la punta de salida de la guía de ondas óptica en la longitud de onda de fluorescencia; y

el núcleo secundario se configura para recibir la fluorescencia.

50 En una modalidad, el sistema óptico tiene criterios de corrección de resolución y aberración tales que:

60 a) la apertura numérica de la luz enfocada es mayor o igual a 0,15 cuando la guía de ondas óptica se activa a una longitud de onda de activación nominal; y

b) la potencia del producto Strehl:  
65 c)

$$\max_{\mathbf{r} \in \mathbb{R}^3} (\mathcal{S}(\mathbf{r}, \lambda_D)^N) \quad \text{Ecuación 2}$$

- 5 es mayor que o igual a 0,5 para formación de imágenes N-fotón (es decir, la potencia N = 2 para formación de imágenes de dos fotones, N = 3 para formación de tres fotones, etcétera).
- 10 En el sistema óptico de los aspectos segundo y tercero, la guía de ondas óptica puede comprender además uno o más núcleos de guía de luz auxiliares, de modo que la apertura numérica de formación de imágenes puede cambiarse entre el valor principal de alta resolución y un valor bajo (digamos 0,1 NA), posiblemente con etapas intermedias para permitir al usuario colocar la imagen fácilmente, con una resolución axial gruesa y alta tolerancia a los errores de ubicación y la inestabilidad de la mano y luego cambiar a un modo de alta resolución (con menor tolerancia) una vez que se ha identificado el tejido objetivo.
- 15 En el sistema óptico del segundo y tercer aspecto, la guía de ondas óptica puede comprender además uno o más núcleos de guía de luz auxiliares desplazados axial y lateralmente para recibir selectivamente la luz de retorno desde diferentes profundidades de formación de imágenes.
- 20 En una modalidad, el sistema óptico comprende una ventana óptica cuasi-elipsoidal con una forma de superficie seleccionada para ser paralela a una superficie de escaneo de un vértice del grupo de lentes, por lo que una geometría relativa del grupo de lentes, una región activa ópticamente instantánea de la ventana óptica y el campo de observación puntual en un lado distal de la ventana óptica permanecen invariables a lo largo de una porción de adquisición de imágenes de un escaneo.
- 25 En un cuarto aspecto amplio, la presente invención proporciona un método de alineación activa, que comprende:
- 30     montar una guía de ondas óptica y un grupo de lentes como se describió anteriormente que comprende una pluralidad de elementos de lente en una plantilla de alineación con una punta de salida de la guía de ondas óptica sustancialmente contra una superficie proximal del grupo de lentes que activa ópticamente la guía de ondas óptica;
- 35     dirigir la luz de salida del grupo de lentes a un detector óptico (tales como un sensor de frente de onda, un aparato de prueba de estrellas de astrónomo o un interferómetro);
- 40     establecer una posición y orientación relativas óptimas de mínima aberración mediante el ajuste de la posición y la orientación relativas del grupo de lentes y la guía de ondas óptica;
- 45     unir los elementos de la lente o ensamblarlos de otro modo en una posición y orientación relativas fijas.
- 50 En un quinto aspecto amplio, la presente invención proporciona un método de evaluación de la calidad de la superficie de la lente, que comprende:
- 55     colocar un orificio de diámetro conocido en un foco de un sistema óptico como se describió anteriormente;
- 60     activar ópticamente la guía de ondas óptica;
- 65     medir una potencia transmitida a través del orificio;
- 70     quitar el orificio y medir una potencia de salida total; y
- 75     determinar una medida de la rugosidad media cuadrática de la superficie de la lente a partir de una relación entre la potencia a través del orificio y la potencia total.
- 80 En un sexto aspecto amplio, la presente invención proporciona un sistema de formación de imágenes de fluorescencia de espectro estrecho de uno o muchos fotones *in vivo* que comprende el sistema óptico descrito anteriormente.
- 85 Cabe señalar que cualquiera de las diferentes características individuales de cada uno de los aspectos anteriores de la invención, y cualquiera de las diferentes características individuales de las modalidades descritas en la presente descripción incluidas en las reivindicaciones, pueden combinarse según sea adecuado y deseado.
- 90 Breve Descripción de los Dibujos
- 95 Para que la invención pueda determinarse más claramente, se describirán ahora modalidades, a modo de ejemplo, con referencia al dibujo adjunto, en el que:
- 100 65 La Figura 1 es una vista esquemática de una lente colectora confocal de muchos elementos de la técnica anterior;

- las Figuras 2A y 2B son vistas esquemáticas de un escáner de acuerdo con una modalidad de la presente invención;
- la Figura 3 es una vista esquemática más detallada del grupo de lentes del escáner de las Figuras 2A y 2B;
- 5 la Figura 4 es una representación gráfica de la definición de una superficie asférica;
- la Figura 5 es una vista esquemática de un 'sistema de referencia' que omite el grupo de lentes;
- 10 la Figura 6 es una vista esquemática de un Sistema No Corregido de 0,26 NA con rayos para una entrada de 0,095 NA de la guía de luz de acuerdo con una modalidad de la presente invención;
- la Figura 7 es una vista esquemática del Perfil para el Sistema No Corregido de 0,30 NA "0,47/0,30 NA No Corregido" de acuerdo con una modalidad de la presente invención;
- 15 la Figura 8 es una vista esquemática del perfil para el Sistema Universal de 0,33 NA "0,50/0,33 NA Universal" de acuerdo con una modalidad de la presente invención;
- la Figura 9 es una vista esquemática de la compensación del error de alineación de la lente de acuerdo con una modalidad de la presente invención;
- 20 la Figura 10 es un gráfico del número máximo de fotones devueltos para microscopía confocal de un fotón en función del descentramiento de la fibra de excitación para diferentes modalidades de la presente invención;
- la Figura 11 es una vista esquemática de la resolución lateral para microscopía de un fotón en función del descentramiento de la fibra de excitación para diferentes modalidades de la presente invención;
- 25 la Figura 12 es una vista esquemática de resolución axial para microscopía de un fotón en función del descentramiento de la fibra de excitación para diferentes modalidades de la presente invención;
- la Figura 13 es un gráfico del número máximo de fotones devueltos para microscopía de un fotón como función del descentramiento de la interfaz esférica para el sistema "050/033 Universal" de una modalidad de la presente invención;
- 30 la Figura 14 es un gráfico de la eficacia del número de fotones máximo del esquema de compensación activa devueltos para microscopía de un fotón como función de la posición de la fibra para sistemas de acuerdo con una modalidad de la presente invención con un descentramiento de interfaz esférica de 10 mm;
- la Figura 15 es un gráfico de la eficacia de la corrección cromática; es una vista esquemática de respuestas axiales para el sistema "050 033 Universal" de una modalidad de la presente invención para longitudes de onda en el rango de longitud de onda de 450 nm a 850 nm;
- 40 la Figura 16 es un gráfico de la efectividad de la corrección cromática, es una vista esquemática del desplazamiento de la posición del foco axial para el sistema "050 033 Universal" con longitudes de onda en el rango de longitud de onda de 450 nm a 850 nm para sistemas ideales y compensados de acuerdo con las modalidades de la presente invención;
- 45 la Figura 17 es un gráfico de la eficacia de la corrección cromática después de que la compensación, es una vista esquemática del desplazamiento cromático lateral para el sistema "050 033 Universal" en el rango de longitud de onda de 450 nm a 850 nm para sistemas ideales y compensados de acuerdo con modalidades de la presente invención;
- 50 la Figura 18 es un gráfico de la eficacia de la corrección cromática después de la compensación, es una vista esquemática de la pérdida de aberración para el sistema "050 033 Universal" en el rango de longitud de onda de 450 nm a 850 nm para sistemas ideales y compensados de acuerdo con modalidades de la presente invención;
- 55 la Figura 19 es un gráfico de la efectividad de la corrección cromática después de la compensación, es una vista esquemática de la resolución lateral para el sistema "050 033 Universal" en el rango de longitud de onda de 450 nm a 850 nm para sistemas ideales y compensados de acuerdo con modalidades de la presente invención;
- la Figura 20 es un gráfico de la respuesta de fase para sistemas completos y solo para el rayo central para el sistema "050 033 Universal" de acuerdo con una modalidad de la presente invención;
- 60 la Figura 21 es un gráfico de la fase de rutas múltiples (fase relativa al rayo central) para el sistema "050 033 Universal" de acuerdo con una modalidad de la presente invención;
- 65 la Figura 22 es una vista esquemática de pulsos de salida de sistemas compensados y no compensados de acuerdo con modalidades de la presente invención;

- la Figura 23 es una vista esquemática de pulsos de salida de sistemas compensados de acuerdo con modalidades de la presente invención;
- 5 la Figura 24 es una imagen de calentamiento local por haz de 1 W 0,1 NA que se difracta a través de una varilla de cristal Schott N-SF66 de dimensiones Ø 0,5 mm × 5 mm;
- la Figura 25 es una vista esquemática de un sistema "0,80/0,57 NA Universal" de acuerdo con una modalidad de la presente invención a escala 70:1;
- 10 la Figura 26 es una vista esquemática de doble colimación en el sistema de la Figura 25;
- la Figura 27 es una vista esquemática de un sistema de muchos fotones de espectro amplio de acuerdo con una modalidad de la presente invención;
- 15 la Figura 28 es una vista esquemática de un sistema de fibra de muchos núcleos de acuerdo con una modalidad de la presente invención;
- 20 la Figura 29 es una vista esquemática de un sistema de fibra de muchos núcleos de acuerdo con otra modalidad de la presente invención;
- las Figuras 30A y 30B son una vista esquemática de sistemas ópticos con una lente holográfica (rejilla) sobre un sustrato cilíndrico escaneado de acuerdo con modalidades de la presente invención;
- 25 la Figura 31 es una vista esquemática del sistema óptico y de la lente difractiva de 0,2 NA, 1 mm de distancia de trabajo de la Figura 30A;
- la Figura 32 es una vista esquemática de la lente holográfica (rejilla) sectorizada del sistema óptico de la Figura 30B, en la que una media rejilla se dedica a enfocar la luz de activación, la otra mitad a enfocar la luz fluorescente;
- 30 la Figura 33 es una vista esquemática de la función de dispersión de punto del plano focal para la rejilla sectorizada de la Figura 32 para (izquierda) 488 nm de longitud de onda de activación (derecha) 532 nm de longitud de onda de fluorescencia;
- 35 la Figura 34 es una vista esquemática de la respuesta confocal del plano focal para la rejilla sectorizada de la Figura 32 con longitudes de onda máxima de activación de 488 nm y de fluorescencia de 532 nm, que incluye (izquierda) la respuesta confocal para el fluoróforo subresoluble, y (derecha) la raíz cuadrada de la respuesta confocal;
- la Figura 35 es una vista esquemática de un aparato de alineación activa de acuerdo con una modalidad de la presente invención;
- 40 la Figura 36 es una vista esquemática del aparato de evaluación de la calidad de la rugosidad superficial de acuerdo con una modalidad de la presente invención;
- la Figura 37 es una vista esquemática de energía circundante en función del radio circundante para 0,3 NA de acuerdo con una modalidad de la presente invención;
- 45 la Figura 38 es una vista esquemática de la fracción máxima de potencia a través del orificio en el aparato de evaluación de la calidad de la Figura 36 en función de la rugosidad de la superficie de la lente RMS;
- 50 las Figuras 39A y 39B son vistas esquemáticas de especificaciones de aberración aceptables e inaceptables, respectivamente, que ilustran cómo deben cumplirse las especificaciones de aberración en el mismo punto focal nominal para las longitudes de onda de excitación y fluorescencia;
- 55 la Figura 40 es una vista esquemática de las coordenadas de la definición de Petermann II de NA, como se emplea en la presente descripción; y
- la Figura 41 es un gráfico que indica la resolubilidad de dos puntos Gaussianos trazando la intensidad normalizada frente al desplazamiento lateral normalizado para diferentes separaciones de puntos.
- 60 Descripción Detallada
- De acuerdo con un primer grupo de modalidades de la presente invención, se proporcionan sistemas ópticos adecuados para una amplia gama de pares de longitudes de onda de activación/fluorescencia en el espectro de luz visible ampliado de 450 nm a 850 nm de longitud de onda, que comprenden (i) un grupo de lentes de dos cristales diferentes, (ii) una interfaz esférica entre ellos, y (iii) una superficie asférica en la superficie distal o de salida del grupo de lentes.

Las Figuras 2A y 2B son vistas esquemáticas de un sistema óptico 10 de acuerdo con una modalidad de este primer grupo. Con referencia a la Figura 2A, que representa el sistema óptico 10 en reposo, el sistema óptico 10 incluye una fibra óptica de escaneo 12 y un grupo de lentes 14 acoplado a la punta distal 16 de la fibra óptica 12. En esta modalidad, la fibra óptica 12 tiene la forma de una fibra óptica de sílice de modo simple de 450 nm con un diámetro de 125  $\mu\text{m}$ . El grupo de lentes 14 es generalmente cilíndrico con un diámetro de 250  $\mu\text{m}$  y una longitud de 2,49 mm. Los 1,79 mm proximales del grupo de lentes 14 actúa como sustrato y comprende cristal N-SF66, mientras que los 0,7 mm distales o delanteros del grupo de lentes 14 comprenden una lente asférica 18 de cristal L-LAM60 (descrita con mayor detalle a continuación). El grupo de lentes 14 comprende dos cristales diferentes: en este ejemplo, el sustrato comprende cristal N-SF66, mientras que la lente asférica 18 comprende cristal L-LAM60. La interfaz entre los dos componentes del grupo de lentes 14 es esférica y la cara delantera o distal de la lente asférica 18 es asférica.

Se proporciona un collar 20 en el extremo proximal o trasero del grupo de lentes 14 para conectar de forma segura el grupo de lentes 14 y la fibra óptica 12; el collar 20 generalmente comprende un menisco de cola, pero puede comprender cualquier otro material adecuado para realizar esta función y compatible con la aplicación prevista del sistema óptico 10. Alternativamente, el collar 20 puede ser integral con el grupo de lentes 14.

El escáner 12 también incluye un soporte 22 en forma de cojinete en voladizo, como el que se muestra en la Figura 2A de la Patente de Estados Unidos Número 7,920,312 (que se incorpora en la presente descripción como referencia), en el que se sujetla fibra óptica 12, y un imán 24 para usar en la activación del escáner, que se monta en fibra óptica 12 entre el soporte 22 y el grupo de lentes 14. En esta modalidad, el imán 24 es un imán de cobalto de samario con una sección transversal cuadrada de 700  $\mu\text{m} \times 700 \mu\text{m}$ , y una densidad media nominal de 7083 kg.m<sup>-3</sup> para tener en cuenta el hueco o la ranura cortada para acomodar la fibra óptica 12.

En uso, el sistema óptico 10 generalmente estaría alojado dentro, por ejemplo, de un cabezal de endoscopio, que deseablemente incluiría una ventana óptica; en esta modalidad, esta ventana óptica tiene la forma de una ventana elipsoidal o cubreobjetos 26 que se adapta al movimiento de la lente asférica 18 y, al ser elipsoidal, reduce la distorsión óptica que de otro modo podría introducir la ventana y, por lo tanto, mantiene el rendimiento óptico en todo el campo de visión cuando la curvatura de la superficie de escaneo y/o la apertura numérica del escáner es alta. La ventana 26 es de N-BK7 en esta y las otras modalidades descritas a continuación, que también tiene una buena biocompatibilidad.

La Figura 2B representa el sistema óptico 10 en uso, que ilustra la flexión o el desplazamiento de sus componentes cuando la lente asférica 18 está en un extremo de un escaneo de amplitud de 0,5 mm cuando el sistema óptico 10 se emplea en el primer modo de vibración de armónicos. Para lograr tal movimiento de escaneo, el imán 24 se acciona para ejecutar una traslación de lado a lado (sin rotación) de 0,15 mm. La frecuencia de resonancia de este modo es de 1617 Hz. Un mecanismo de activación adecuado se describe en la Patente de los Estados Unidos Número 7,920,312, que comprende un par de bobinas de excitación en Y que se disponen por encima y por debajo del imán 24 (para ejecutar un escaneo en Y lineal no resonante: véanse las bobinas 54a y 54b de la Figura 3 de la Patente de los Estados Unidos Número 7,920,312) y un par de bobinas de excitación en X que se disponen a cada lado del imán 24 (para ejecutar un escaneo en X sinusoidal resonante: véanse las bobinas 56a y 56b de la Figura 3 de la patente los Estados Unidos número 7,920,312).

Se espera que alrededor del 70 % del campo de visión se use cuando el sistema óptico 10 construya una imagen escaneada por tramas, el resto es la parte posterior del escaneo sinusoidal y, por lo tanto, se distorsiona mucho debido a la desaceleración de la punta de la lente para cambiar de dirección. El sistema óptico 10 tiene aproximadamente 700  $\mu\text{m} \times 700 \mu\text{m}$  de campo de visión.

La curvatura de la superficie de escaneo de este ejemplo es alta, con un radio de curvatura de escaneo en X rápido y resonante de 2,6 mm. La curvatura principal en la dirección ortogonal o Y (exploración lenta, no resonante) es de 8,2 mm. Aun así, con esta alta curvatura, la superficie de escaneo se desvía de la planitud solo 24  $\mu\text{m}$  sobre el total de 700  $\mu\text{m} \times 700 \mu\text{m}$  de campo de visión. Son posibles sistemas más largos y de menor frecuencia con radios de curvatura correspondientemente más largos, de acuerdo con otra modalidad de la presente invención.

La Figura 3 es una vista esquemática más detallada del grupo de lentes 14 y su acoplamiento a la fibra óptica 12 (aunque omite el collar 20 por simplicidad). Como se describió anteriormente, el grupo de lentes 14 comprende un sustrato proximal 30 de cristal N-SF66 y una lente asférica distal 18 de cristal L-LAM60, ambos con un eje óptico 32 en reposo. El grupo de lentes 14 se adapta para formar imágenes en el rango de longitud de onda de 450 nm a 850 nm. La Figura 4 es una representación gráfica de la definición de una superficie asférica.

En una modalidad alternativa, el sistema óptico 10 se adapta para su uso como escáner de fluorescencia, y se adapta para pares de longitudes de onda de activación/fluorescencia estrechamente espaciados (normalmente con 50 nm de separación o menos). El grupo de lentes 14 en esta modalidad alternativa comprende solo un tipo de cristal y se omiten los dispositivos de corrección de desplazamiento cromático; en cambio, el rendimiento de desplazamiento cromático se logra empleando una cantidad muy pequeña de cristal, para negar a la luz transmitida el tiempo suficiente en su vuelo para dispersarse lo suficiente como para contrarrestar el logro del objetivo del producto de relación Strehl que se describe a continuación.

La superficie delantera asférica 34 de la lente asférica 18 es nominalmente axisimétrica (*es decir*, tiene simetría rotacional alrededor del eje óptico) y se especifica por la forma funcional estándar:

$$z = \frac{r_a}{r_a - \sqrt{r_a^2 - r^2}} + A_2 r^2 + A_4 r^4 + A_6 r^6 + A_8 r^8 \quad \text{Ecuación 3}$$

donde  $z$  (ver Figura 4) es la "holgura" de la superficie medida con relación al plano ortogonal y al eje óptico a través del vértice  $V$  (*a saber*, donde la superficie se encuentra con el eje óptico) en función de la distancia ortogonal  $r$  desde el eje óptico. En el ejemplo de la Figura 4,  $z$  es negativo. ( $z$  es positivo si la superficie en el punto en cuestión se encuentra a la derecha del vértice  $V$ ).

Los parámetros de diferentes formas de modalidad (que incluye la de las Figuras 2A a 3) se presentan en la Tabla 1. Estos ejemplos se diseñan para diferentes tareas y se prevén diferentes grados de dificultad para construirlos. Los ejemplos no son exhaustivos y son una muestra de lo que puede lograrse de manera realista con una lente asférica y un sustrato que se encuentran en una interfaz plana o esférica. En otras modalidades, pueden obtenerse mayores grados de corrección mediante el uso de varios sustratos de cristal diferente con interfaces esféricas o asféricas en combinación con una superficie distal asférica tal como la que se muestra en las Figuras 2A a 3, pero se espera que estas ganancias sean pequeñas.

Para calcular la apertura numérica principal de cada ejemplo se asume la fibra en modo simple disponible comercialmente a una longitud de onda de 488 nm. Esta fibra tiene un diámetro de campo de modo Petermann II de 3,4  $\mu\text{m}$  y una apertura numérica de salida Petermann II de 0,095 (aunque su apertura numérica multimodo, "material" se cita como 0,12).

Las lentes ilustrativas detalladas en la Tabla 1 se diseñan para adaptarse a fibras especializadas de mayor apertura numérica, si están disponibles y se desean. Así, por ejemplo, el primer sistema ("0,40/0,26 NA no corregido") alcanzará 0,26 NA con la fibra SM450 actual, pero se diseña para corregir un campo de entrada de hasta 0,15 NA, como se muestra en la fila "Diámetro de Campo de Modo Petermann II de Salida de Fibra en  $\lambda_D$ " por las dos figuras 0,095 (0,15). Si esta última apertura numérica se logra con una fibra especializada (*por ejemplo*, en tecnología de "fibra hueca"), puede preverse la apertura numérica entre corchetes de 0,4 NA con relaciones Strehl comparables a las enumeradas en la parte inferior de la columna para este diseño. Del mismo modo, el diseño "0,50/0,33 NA Universal" logra 0,50 NA con la fibra de modo simple actual, pero el diseño en sí puede acomodar una apertura numérica de entrada de hasta 0,15, cuando su apertura numérica de salida sería 0,50 mientras logra las mismas relaciones Strehl que se enumeran en la parte inferior de la columna para ese diseño.

Tabla 1: Parámetros de los Escáneres Refractivos y Rendimiento Óptico

<b>Nombre del parámetro</b>	<b>Símbolo (ver Figura 3)</b>	<b>No corregido</b>	<b>0,50/0,33 NA Universal</b>
Espesor del sustrato	$t_s$ (mm)	1,795882	1,611574
Material de sustrato	$M_s$	N-SF66	S-NPH2
Radio de la interfaz del sustrato (se muestra en negativo en la Figura 3)	$r_i$ (mm)	$\infty$ (plano)	$\infty$ (plano)
Espesor de la lente asférica	$t_a$ (mm)	0,7	0,688937
Material de la lente asférica	$M_A$	L-LAM60	L-LAM60
Radio de la lente asférica	$r_a$ (mm)	-8,720051	-0,259212
Coeficiente cuadrático asférico	$A_2$ (mm <sup>-1</sup> )	-1,856099	-0,425953
Coeficiente cuártico de la lente ASFÉRICA	$A_4$ (mm <sup>-3</sup> )	+6,188813	+21,317379
Coeficiente séxtico de la lente ASFÉRICA	$A_6$ (mm <sup>-5</sup> )	-37,742987	-162,135748
Coeficiente óptico de lente ASFÉRICA	$A_8$ (mm <sup>-7</sup> )	0	+3157,445438
Espacio de descanso de la ventana-lente	$t_{cl}$ (mm)	0,2	0,2
Espesor de ventana	$t_c$ (mm)	0,3	0,2
Profundidad de imagen nominal	$d$ (mm)	0,099	0,05
Radios de curvatura principales de ventana elipsoidal	$r1, r2$ (mm)	2,83, 8,44	2,76, 8,19
			2,69, 9,08

(continuación)

	<b>Nombre del parámetro</b>	<b>Símbolo (ver Figura 3)</b>	<b>No corregido</b>	<b>0,50/0,33 NA Universal</b>
5	Longitud de onda de la unidad del sistema	$\lambda_D$ (nm)	488	488 > 450
10	Longitud de onda fluorescente del sistema	$\lambda_F$ (nm)	532	532 < 850
15	Diámetro de Campo de Modo Petermann II de Salida de Fibra a $\lambda_D$	$d_{P2}$ ( $\mu\text{m}$ )	3,4 (2,2)	3,4 (2,2)
20	Apertura numérica Petermann II de salida de fibra en $\lambda_D$	$\eta_{P2}$	0,095 (0,15)	0,095 (0,15)
25	Diámetro de la lente escaneada	$D$ (mm)	0,5	0,5
30	Apertura numérica de salida del sistema (Petermann II)	$\eta_{salida}$	0,26 (0,40)	0,30 (0,47) 0,33 (0,50)
35	Resolución lateral del sistema Petermann II	$\Delta X_{FWHM}$ ( $\mu\text{m}$ )	0,76	0,66
40	Resolución axial del sistema (FWHM)	$\Delta Z_{FWHM}$ ( $\mu\text{m}$ )	9,6	7,25
45	Relación Strehl en $\lambda_D$	$S_D$	0,98 (0,93)	0,97 (0,89)
50	Relación Strehl en $\lambda_F$	$S_F$	0,96 (0,92)	0,97 (0,84)
55	Pérdida de viñeteado (una pasada) <sup>1</sup>	$L_v$ (dB)	0,7	0,65
60	Pérdida de reflexión (una pasada) <sup>2</sup>	$L_R$ (dB)	0,4	0,35
65	Número de fotón (microscopía confocal de fluorescencia) <sup>3</sup>	$N$	1400	2350
	<sup>1</sup> A una longitud de onda de 488 nm; la pérdida total de ida y vuelta en la microscopía de un fotón de fluorescencia, por ejemplo, con FITC (fluoresceína) es aproximadamente el doble de este valor.			
	<sup>2</sup> A una longitud de onda de 488 nm; la pérdida total de ida y vuelta en la microscopía de un fotón de fluorescencia, por ejemplo, con FITC (fluoresceína) es aproximadamente el doble de este valor.			
	<sup>3</sup> Número total de fotones devueltos recogidos por la formación de imágenes de microscopía de fluorescencia de un fotón de fluoróforo subresoluble que contiene $10^5$ iones de fluoresceína con 100 $\mu\text{W}$ de luz de activación de 488 nm en la fibra óptica SM450 de 0,095 NA y tiempo de permanencia de 300 ns (es decir, recolección de fotones)			

El rendimiento del escáner se evalúa mediante los parámetros de rendimiento teóricos de la Tabla 1. Cabe señalar que las relaciones Strehl no son las relaciones Strehl máximas en la longitud de onda, sino las que se definen a continuación, es decir, las relaciones Strehl en un foco definido como el punto que maximiza el producto de las dos relaciones Strehl en las longitudes de onda activación y fluorescencia.

La Tabla 2 presenta los parámetros de rendimiento mecánico para los escáneres de la Tabla 1. El rendimiento mecánico de los escáneres se ha establecido ajustando la longitud  $f_c$  (véanse las Figuras 2A y 2B) de la fibra entre el cojinete en voladizo y el borde más cercano del imán de escaneo de modo que el imán de escaneo sufra una traslación pura de lado a lado y no gire en la primera resonancia armónica. Los parámetros de rendimiento correspondientes para un sistema 50 de "referencia" ilustrado esquemáticamente en la Figura 5 se dan en la última columna: estos parámetros se refieren a una fibra desnuda sin una lente escaneada, para dar una guía aproximada de la dificultad de lograr los parámetros para los otros escáneres de la Tabla 1. Por ejemplo, la fila "Amplitud de fuerza impulsora para dirección de escaneo lenta" muestra que el sistema que escanea el grupo de lentes "0,50/0,33 NA Universal" necesitará una fuerza de activación de escaneo lento que es  $485/200 = 2,4$  veces más fuerte que la del sistema de referencia. Aparte de la omisión de un grupo de lentes distales, el sistema de referencia 50 es similar al sistema óptico 10 de las Figuras 2A y 2B, y tiene una fibra óptica 52 en forma de fibra óptica de silice en modo simple de 450 nm con un diámetro de 125  $\mu\text{m}$ , un soporte 54 en forma de cojinete en voladizo en el que se sujetó la fibra óptica 52, y un imán 56 para su uso en la fibra óptica de activación 52, que se montó en la fibra óptica 52 entre el soporte 22. El imán 56 es un imán de cobalto de samario con una sección transversal cuadrada de 550  $\mu\text{m} \times 550 \mu\text{m}$ .

Tabla 2: Parámetros de Rendimiento Mecánico para sistemas escaneados con Escaneo de Amplitud de 1 mm

	<b>Parámetro de Rendimiento Mecánico</b>	<b>Símbolos (Figuras 2A, 2B y 3)</b>	<b>No corregido</b>	<b>0,50/0,33 NA Universal</b>	<b>Dato</b>
60	Ventana elipsoidal dentro de los radios de curvatura principales	$r_1, r_2$ (mm)	2,83, 8,44	2,76, 8,19	2,69, 9,08 N/A
65	Cojinete a intervalo de fibra magnética	$f_c$ (mm)	2,5	2,4	3,0 N/A

(continuación)

	<b>Parámetro de Rendimiento Mecánico</b>	<b>Símbolos (Figuras 2A, 2B y 3)</b>	<b>No corregido</b> 0,40/0,26 NA NA	<b>0,50/0,33 NA</b> Universal	<b>Dato</b>
5	Frecuencia de resonancia de escaneo rápido	$f_{res}$ (kHz)	1,617	1,753	1,267
10	Amplitud de la fuerza de activación para una dirección de escaneo rápido	$F_{rápido}$ ( $\mu$ N)	452	528	295
15	Amplitud de desplazamiento lateral del imán para una dirección de escaneo rápido	$\delta_{rápido}$ ( $\mu$ m)	290	270	400
20	Amplitud de la fuerza de activación para una dirección de escaneo lento	$F_{lento}$ (mN)	15,9	17,5	11,2
25	Amplitud de desplazamiento lateral del imán para una dirección de escaneo lento	$\delta_{lento}$ ( $\mu$ m)	485	495	485
30					200

Ejemplo 1: Sistema de 0,26 NA no corregido cromáticamente "0,40/0,26 NA no corregido"

La Figura 6 es una vista esquemática de un grupo de lentes 60 adecuado para su uso en un escáner tal como el sistema óptico 10, que se muestra con una ventana o cubreobjetos 68, una muestra de tejido 69 y rayos para una entrada de 0,095 NA desde una guía de luz. Este diseño asume que el foco es 50 o 99  $\mu$ m de profundidad en la muestra 69 (consulte "Profundidad de imagen nominal" en la Tabla 1). El grupo de lentes 60 constituye un sistema no corregido de 0,26 NA, y se adapta para formación de imágenes confocales de fluorescencia de un fotón FITC (isotiocianato de fluoresceína) con FITC como fluoróforo; por tanto, la longitud de onda de activación es 488 nm y la fluorescencia retorna en una banda que se extiende desde aproximadamente 520 nm hasta 550 nm con una longitud de onda de fluorescencia máxima de 532 nm. El rendimiento óptico se diseña para ser ligeramente mejor que el de un sistema óptico voluminoso del tipo que se muestra en la Figura 1. El grupo de lentes 60 tiene un sustrato 62 de Schott (marca comercial) N-SF66 y la lente asférica 64 de Ohara (marca comercial) L-LAM60, que se encuentran en una interfaz plana 66. La primera permite que la interfaz plana 66 sea parcialmente correctora cromática, la última (como se describe a continuación) está cerca de un cristal de dispersión mínima para la aplicación.

Ejemplo 2: Sistema de 0,30 NA no corregido cromáticamente "0,47/0,30 NA no corregido"

La Figura 7 es una vista esquemática de un grupo de lentes 70, que se muestra con una ventana o cubreobjetos 78 y una muestra de tejido 79. Este ejemplo también es adecuado para su uso en un escáner tal como el sistema óptico 10, que se adapta para la formación de imágenes confocales de fluorescencia de un fotón FITC pero con un rendimiento óptico significativamente mejor que el del sistema óptico voluminoso de la Figura 1. Su longitud más corta y mayor aumento lo hace un poco más sensible a las imperfecciones de fabricación (que se analizan a continuación). El grupo de lentes 70 comprende un sustrato 72 de Ohara S-NPH2 y una lente asférica 74 de Schott L-LAM60; el sustrato 72 de Ohara S-NPH2 produce una corrección cromática parcial ligeramente mejor en la apertura numérica más alta.

Esta apertura numérica es aproximadamente la más alta por la que vale la pena esforzarse con un sistema no corregido de este tipo, porque las respuestas axiales (es decir, la intensidad máxima de la luz de enfoque en un plano dado de posición axial constante en función de la posición axial de ese plano) en las longitudes de onda de excitación y fluorescencia tienen picos que se desplazan axialmente entre sí en aproximadamente 5  $\mu$ m para un grupo de lentes del tamaño aproximado de los dos sistemas no corregidos que se muestran. Este cambio es aproximadamente independiente del diseño (cuando se limita a las modalidades de acuerdo con la reivindicación ¡Error! Fuente de referencia no encontrada) y apertura numérica. Este diseño, en principio, no necesita corrección. El grupo de lentes 70 está en dos piezas (es decir, el sustrato 72 y la lente asférica 74) solo con fines de producción, ya que sería muy difícil mecanizar un elemento largo y delgado de manera integral sin romperlo. Por tanto, el grupo de lentes 70, en este ejemplo, se fabrica en dos piezas que luego se pegan entre sí. Sin embargo, dado que se van a usar dos piezas de cristal por conveniencia de fabricación, es posible emplear dos tipos de cristal similar para obtener una pequeña cantidad de corrección de la interfaz plana 76. Sin embargo, la diferencia de rendimiento entre este dispositivo y uno de un solo cristal (ya sea en dos piezas de uno) es muy pequeña, por lo que este ejemplo se describe como "no corregido": la pequeña corrección no es esencial y es menor en comparación con la de los denominados diseños "corregidos" que se describen a continuación (véase, por ejemplo, el Ejemplo 3).

En aperturas numéricas bajas, la amplia dispersión axial de las respuestas axiales significa que las respuestas de excitación y fluorescencia se superponen casi por completo, incluso a pesar del desplazamiento y, por lo tanto, el producto máximo de las relaciones Strehl de excitación y fluorescencia no es muy diferente del producto de las relaciones Strehl máximas. Sin embargo, a medida que aumenta la apertura numérica, también lo hace la relevancia del desplazamiento y los picos en las dos respuestas axiales se resuelven de manera más clara, por lo que el producto Strehl máximo es mucho menor que uno, aunque las relaciones Strehl máximas para cada longitud de onda son muy

altas. En resumen, la importancia del desplazamiento cromático axial aumenta con el aumento de la apertura numérica y, por lo tanto, se necesita una corrección cromática para aprovechar el beneficio de una mayor apertura numérica.

Ejemplo 3: Sistema de 0,33 NA completamente corregido cromáticamente "0,50/0,33 NA Universal"

5 La Figura 8 es una vista esquemática de un grupo de lentes 80, que se muestra con una ventana o cubreobjetos 88 y una muestra de tejido 89. Este ejemplo también es adecuado para su uso en un escáner tal como el sistema óptico 10, y comprende un sustrato 82 de Ohara S-NPH2 y una lente asférica 84 de Ohara L-LAM60, que se encuentran en una interfaz esférica 86. El grupo de lentes 80 se adapta para transmitir luz a longitudes de onda entre 450 nm y 850 nm esencialmente al mismo foco, dentro de una micra, debido a las variaciones de longitud de onda opuestas para las potencias ópticas de la interfaz esférica 86 por un lado y la interfaz asférica 87 entre el cristal Ohara L-LAM60 de la lente asférica 84 y el espacio libre en la punta distal del grupo de lentes 80.

10 Como resultado, el grupo de lentes 80 puede usarse para una variedad de sistemas de endoscopía confocal o de microscopía confocal de fluorescencia/reflexión de muchos canales de un fotón o dos fotones. Pueden usarse arbitrariamente muchas longitudes de onda de excitación en la banda de 450 nm a 850 nm; estos se llevan a un foco común, que es también el punto de mayor probabilidad de acoplamiento de vuelta a una fibra óptica (véase la fibra óptica 12 de las Figuras 2A a 3) a través del grupo de lentes 80 para cualquier fluorescencia/reflexión en la banda. Algunos análisis más detallados en §0 respaldan estas afirmaciones y muestran cuán ampliamente aplicable es el grupo de lentes de escaneo completamente corregido cromáticamente de la reivindicación ¡Error! No se encontró la fuente de referencia. Ningún sistema confocal o de dos fotones disponible en el momento de escribir este artículo (2012) tiene todas estas capacidades, especialmente en los campos de visión completos y muy amplios (hasta 1 mm × 1 mm) que se prevén para estos sistemas.

15 20 25 Más generalmente, los materiales preferidos para la lente asférica 14, para la mayoría de las aplicaciones, se encuentran en el medio del gráfico de Abbe. Los materiales de bajo índice de refracción y baja dispersión, los denominados "Cristales de Corona" (*por ejemplo*, N-FK51A), necesitan superficies asféricas muy severas para una potencia óptica determinada, por lo que la propia superficie se vuelve dispersiva, aunque el material no lo sea. En el otro extremo de la tabla de Abbe, los materiales altamente dispersivos de alto índice de refracción, los llamados "cristales acromáticos" (*por ejemplo*, N-SF66), son altamente dispersivos, pero solo se necesitan superficies asféricas relativamente suaves para alcanzar la misma potencia óptica. El medio de la tabla de Abbe, tal como L-LAM60, es el mejor compromiso: las superficies asféricas son suaves y el material en sí es menos dispersivo que los materiales de alto índice de refracción como N-SF66 o S-NPH2.

30 35 40 Una excepción a este principio es el diamante, que tiene una dispersión muy baja (aproximadamente la de N-BK7) y un índice de refracción de 2,4. Este puede ser el material óptimo para sistemas no corregido, siempre que se use un método de mecanizado adecuado para fabricar superficies asféricas de buena calidad. Se prevé que sea un material clave para su uso en modalidades de la presente invención en el futuro, cuando los métodos de mecanizado, *por ejemplo*, torneado por haz de electrones de lentes asféricas de diamante cultivadas por deposición de vapor químico (CVD), se vuelvan más viables.

45 50 En algunas modalidades, se proporciona un escáner con un grupo de lentes que comprende más de dos elementos ópticos (tales como, para uso en dispositivos de muy alta apertura numérica). Sin embargo, la configuración de dos elementos del grupo de lentes 14 de las Figuras 2A a 3 permite, para aperturas numéricas de hasta aproximadamente 0,6, el enfoque, con una corrección de la aberración del frente de onda alta, de la luz de excitación en la salida de la fibra óptica 12 a un punto de alta resolución (función de dispersión de punto estrecho) fuera de la ventana elipsoidal 26, y la transmisión, también con corrección de la aberración de frente de onda alta, de luz reflejada y/o de fluorescencia desde el mismo punto (y su vecindad definida por la función de dispersión de punto de longitud de onda de fluorescencia) de regreso a la salida de fibra óptica 12 en la longitud de onda de fluorescencia. Esta configuración también tiene las siguientes propiedades geométricas y de fabricación especiales:

- i) Una posible imperfección de fabricación es que la desalineación entre los dos elementos del grupo de lentes 14 se reduce a una rotación pura (digamos, en un ángulo  $\delta\theta$ ) del sustrato 30 con relación al elemento asférico 18, debido al hecho de que la interfaz entre el sustrato 30 con relación al elemento asférico 18 es esférica y, por lo tanto, puede cancelarse casi por completo en alineación activa desplazando el punto de unión de la fibra óptica 12 al sustrato 30 lateralmente por un desplazamiento de compensación;
- ii) Otra posible imperfección de fabricación es el descentramiento de la superficie esférica (que constituye la interfaz entre el sustrato 30 y el elemento asférico 18) pero su efecto también puede cancelarse por un desplazamiento lateral de compensación del punto de unión de la fibra óptica 12 al sustrato 30;
- iii) Los robots de construcción de lentes CNC (control numérico por computadora) no manipulan y mecanizan fácilmente las lentes largas y delgadas sin un alto riesgo de temblores, por lo que incluso un diseño de un elemento se hace mejor con dos secciones del mismo material, con una interfaz plana entre ellos. Puede aprovecharse la restricción de fabricación empleando diferentes materiales en cada lado de la interfaz para proporcionar una corrección cromática parcial.

Esta primera de estas propiedades se explica adicionalmente con referencia a la Figura 9, que es una vista esquemática de un grupo de lentes 90 (comparable al grupo de lentes 14 de las Figuras 2A a 3), pero con desalineación entre el sustrato 30 y la lente asférica 18. El efecto de la desalineación puede cancelarse casi por completo durante

- 5 la alineación activa desplazando el punto de unión de la fibra lateralmente mediante un desplazamiento  $\delta x$ . Con la  
fibra óptica 12 en su posición compensada como se muestra en la Figura 9, el cono de luz que emana de la fibra óptica  
12 se propaga a la lente asférica 18 a través de casi exactamente el mismo medio que lo haría en un sistema  
perfectamente alineado. La única diferencia óptica entre el sistema de la Figura 9 y un doblete perfectamente alineado  
10 es el pequeño cambio  $\delta z$  en el espesor efectivo del sustrato 30 que queda después de la compensación; en los  
símbolos de la Figura 3, este desplazamiento axial es:

$$\delta z = (t_s + r_i) \frac{\sin^2 \delta\theta}{\cos \delta\theta} \approx (t_s + r_i) \delta\theta^2 \quad \text{Ecuación 4}$$

- 15 Para un dispositivo largo con  $t_s + r_i = 10$  mm y una desalineación de incluso  $1^\circ$ , el error anterior es aproximadamente  
3  $\mu\text{m}$ . Por tanto, el error se transforma mediante la alineación activa en un pequeño error de espesor de elemento, al  
que los diseños de acuerdo con esta modalidad son en gran medida insensibles. Se estima que los errores de espesor  
deben ser del orden de 20  $\mu\text{m}$  estropear seriamente el rendimiento de dichos dispositivos. Si la interfaz es una interfaz  
20 plana (radio =  $\infty$ ), cualquier desalineación lateral entre los elementos del grupo de lentes puede compensarse  
corrigiendo el desplazamiento lateral de la fibra óptica.

- Otra imperfección de fabricación es el descentramiento de la superficie esférica. El descentramiento puede describirse  
25 como un desplazamiento lateral entre el centro de la superficie esférica y el eje óptico de la superficie asférica distal  
(*a saber, el eje de simetría rotacional*). Este descentramiento provoca el mismo tipo de aberración, *a saber, coma de*  
tercer orden, al igual que un desplazamiento lateral del eje óptico de la posición de la punta de la fibra. Por lo tanto,  
puede usarse un desplazamiento lateral deliberado de la punta de la fibra óptica para cancelar la aberración de tercer  
orden que surge del descentramiento de la superficie esférica. Se ha descubierto que este esquema de cancelación  
30 o "compensación" restaura el rendimiento óptico; es decir, un sistema con las imperfecciones discutidas anteriormente,  
pero compensado por la alineación activa de la posición de la punta de la fibra óptica tiene casi el mismo rendimiento  
óptico (dentro de unas pocas centésimas de decibelio) que un sistema ideal que está libre de tales imperfecciones.

- Por lo tanto, puede verse que los efectos de las principales imperfecciones de fabricación pueden cancelarse mediante  
la alineación activa en la configuración de dos elementos de las modalidades con dos elementos de lente de acuerdo  
35 con la presente invención, tales como las de las Figuras 2A y 2B.

Otras fuentes posibles de imperfección son los errores de espesor del elemento de lente, a los que las modalidades  
de la presente invención son sustancialmente menos sensibles.

#### 40 Tolerancia a las Imperfecciones de Fabricación

- La propagación del campo electromagnético a través de modalidades de la presente invención que tienen dos cristales  
diferentes en el grupo de lentes con una interfaz esférica entre ellos y un distal asférico, que se adapta para su uso  
45 con longitudes de onda de excitación/fluorescencia en el espectro de luz visible ampliado de 450 nm a 850 nm se ha  
simulado para determinar el rendimiento y la tolerancia probables a las fuentes previsibles de imperfecciones de  
fabricación. La Figura 10 es un gráfico de la luz de fluorescencia recogida por un microscopio confocal de un fotón  
que comprende el sistema óptico 10 (y variantes del mismo) como función del desplazamiento de la fibra  
(ortogonalmente al eje óptico) desde su posición central nominal que se diseña en la cara proximal del sustrato 30,  
expresado como Número de Fotones Máximo *contra* Desplazamiento de Fibra ( $\mu\text{m}$ ). El microscopio tiene las  
50 características dadas en la Tabla 1, cuando se forma la imagen de un objeto subresoluble que contiene 1000  
fluoróforos de fluoresceína sódica ubicados en el foco del sistema y el sistema se acciona por una fuente de luz de  
488 nm y 100  $\mu\text{W}$ , y tiene un tiempo de permanencia de píxeles de 300 ns.

- Todos los cálculos se realizaron con un método de simulación de campo electromagnético de ondas esféricas. (El  
55 sistema etiquetado como "080 057 Universal" se describe a continuación).

Las Figuras 11 y 12 son gráficos correspondientes de resolución lateral y resolución axial, respectivamente.

- Estas curvas de caída en el rendimiento, como la de la Figura 10, muestran que el método de alineación activa de  
60 acuerdo con la presente invención puede usarse para colocar la fibra con la suficiente precisión para compensar tales  
imperfecciones de fabricación, mediante el estudio de los efectos de desalineación tanto de la fibra como de la interfaz  
esférica juntos.

- La Figura 13 es un gráfico de la caída en el rendimiento, que se mide por el número de fotones recogidos por el  
65 sistema corregido cromáticamente en función del descentramiento de la interfaz esférica en micras. Se verá que la  
caída del rendimiento es leve para descentramientos de hasta 5  $\mu\text{m}$ , equivalente a una especificación ISO10110-6 de

aproximadamente 4/40' (el radio de la interfaz es de aproximadamente 0,4 mm, por lo que 5  $\mu\text{m}$  de descentramiento equivale a una inclinación de la superficie de  $5 \mu\text{m}/0,4 \text{ mm} = 0,0125 \text{ rad} = 40$  minutos de arco). La Figura 14 reproduce las curvas de número de fotones de la Figura 10 (hacia la izquierda de esa Figura) junto con el número de fotones en función de la posición lateral de la fibra para sistemas "imperfectos" estropeados por un descentramiento de la interfaz esférica de 10  $\mu\text{m}$ . Se verá en la Figura 14 que, por ejemplo, se restaura un rendimiento casi perfecto al desplazar la fibra aproximadamente  $7,5 \mu\text{m} \pm 2,0 \mu\text{m}$  cuando el sistema sufre un descentramiento de la interfaz esférica de 10  $\mu\text{m}$  (equivalente a ISO10110-6 4/1°20').

Como indicación de la eficacia de la corrección cromática de acuerdo con esta modalidad, la corrección cromática lograda por una versión "perfecta" del sistema "050 033 Universal" se muestra en la Figura 15 y se resume en la Figura 16. La Figura 16 muestra el desplazamiento del punto focal para una versión ideal del sistema, así como las versiones que tienen una interfaz esférica con desplazamientos laterales de 5  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$  después de que estos sistemas se hayan compensados por el desplazamiento de posición apropiado de la fibra.

Cuando el sistema se ve afectado por un posicionamiento imperfecto de la interfaz esférica (entre el sustrato y la lente asférica), ya se ha demostrado que puede restaurarse un rendimiento óptico casi perfecto mediante un desplazamiento de compensación en la posición de la fibra cuando se realiza la formación de imágenes de un fotón con longitudes de onda de excitación y fluorescencia estrechamente espaciadas (*por ejemplo*, longitud de onda de activación de 488 nm y pico de fluorescencia de 532 nm). Sin embargo, un sistema así compensado ya no es axisimétrico (*es decir*, ya no tiene simetría de rotación alrededor del eje óptico) debido a la fibra desplazada de forma opuesta y la interfaz esférica con relación a la superficie asférica. Por lo tanto, tal sistema "compensado" también sufre un desplazamiento cromático lateral y axial.

La Figura 17 muestra el desplazamiento lateral (hacia los lados) del foco de fluorescencia en relación con el foco del campo de excitación en mm como función de la longitud de onda de fluorescencia para el sistema "050 033 Universal" cuando se compensa con el desplazamiento de posición de la fibra apropiado para los descentramientos de la interfaz esférica de 5  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$ , respectivamente (equivalente a ISO10110-6 4/40' y 4/1°20', respectivamente). El sistema ideal, siendo axisimétrico, no tiene desplazamiento cromático lateral. El mismo gráfico también muestra la resolución confocal lateral teórica:

$$\Delta x = \frac{2}{\pi NA} \frac{\lambda_d \lambda_f}{\sqrt{\lambda_d^2 + \lambda_f^2}} \quad \text{Ecuación 5}$$

donde  $\lambda_d$  es la longitud de onda de activación o excitación y  $\lambda_f$  la longitud de onda de fluorescencia máxima. La ecuación 5 es el análogo del sistema confocal de la fórmula de resolución lateral del disco de Airy para un sistema no apodizado de campo claro (aquí  $\omega_{1,1} \approx 3,83$  es el primer cero de la primera función de tipo Bessel de orden 1):

$$\Delta x = \frac{\omega_{1,1} \lambda}{2 \pi NA} \approx 0,61 \frac{\lambda}{NA} \quad \text{Ecuación 6}$$

La resolución media máxima de ancho completo es  $\sqrt{\log_e 2} \approx 0,833$  veces el valor dado por la Ecuación 5.

La Figura 18 es un gráfico de la pérdida de aberración para el sistema "050 033 Universal" en el rango de longitud de onda de 450 nm a 850 nm para sistemas ideales (*es decir*, sin descentramiento, desplazamientos u otras imperfecciones de fabricación) y sistemas compensados, y es indicativo de la efectividad de corrección cromática después de la compensación. La Figura 17 muestra que los desplazamientos cromáticos laterales para los sistemas compensados con 5  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$  de descentramiento de la interfaz esférica son mucho menores que la resolución confocal, de modo que la pérdida de aberración (como se grafica en la Figura 18) debido a la imperfección es sólo 0,22 dB más que en el caso "perfecto" para el sistema de 5  $\mu\text{m}$  de descentramiento y menos de 1 dB más para los sistemas de 10  $\mu\text{m}$ . Asimismo, las gráficas de resolución lateral en función de la longitud de onda para los sistemas descentrados son casi iguales al valor teórico; esto se muestra en la Figura 19, que es un gráfico de la resolución lateral del sistema "050 033 Universal" en el rango de longitud de onda de 450 nm a 850 nm para sistemas ideales y compensados.

Por lo tanto, puede verse que tales sistemas, con dos cristales diferentes en el grupo de lentes, una interfaz esférica entre ellos y una superficie distal asférica, pueden usarse para realizar la formación de imágenes confocales de un fotón con cualquier número de pares de longitudes de onda de activación y fluorescencia dentro de la banda extendida de 450 nm a 850 nm, pero aun así traer todas las longitudes de onda fotografiadas esencialmente al mismo foco. Esto permite una verdadera formación de imágenes confocales de un fotón multicanal para cualquier número de pares dentro de esa banda de longitud de onda.

Estos sistemas también pueden usarse para formación de imágenes de dos fotones y de múltiples fotones, con diferentes niveles de eficacia. El éxito de tales sistemas de formación de imágenes depende de la entrega de pulsos muy estrechos, de hasta 100 fs o menos de ancho. Los sistemas de lentes, si no se corrigen, pueden comprometer el ancho de pulso. Los sistemas de lentes introducen la propagación del pulso en dos componentes: el primero es la

inevitable dispersión del material, cuya dependencia de la frecuencia es suave y bien aproximada por una dependencia cuártica de la frecuencia. Su dependencia es, por tanto, muy similar a la dispersión que introducen las fibras de suministro y, por tanto, puede compensarse casi perfectamente, por ejemplo, mediante rejillas de compensación o fibra de compensación de la dispersión. El segundo componente es el componente de "rutas múltiples"; puede considerarse que surge de la diferencia entre el tiempo de vuelo de los rayos no centrales y el rayo principal que se propaga a lo largo del eje óptico a través del sistema de lentes. El mal enrutado múltiple conduce a una rápida variación de fase con la frecuencia y no puede compensarse con rejillas o fibras de compensación de dispersión. Para una lente no corregida, una estimación simple de la diferencia de tiempo de vuelo entre el rayo marginal y el rayo principal viene dada por:

$$|\Delta\tau| \approx \frac{NA^2 F \lambda}{2 c (\lambda_F - \lambda_C) V_d} \quad \text{Ecuación 7}$$

donde  $F$  es la distancia focal,  $\lambda$  la longitud de onda de trabajo central,  $c$  la velocidad de la luz del espacio libre,  $\lambda_F$  y  $\lambda_C$  las longitudes de onda de las líneas  $F$  y  $C$  de Fraunhofer y  $V_d$  el número de Abbe calculado a partir de estas líneas. Para los sistemas en este documento, con  $NA \approx 0,4$ , esta fórmula no corregida arroja una estimación de 122 fs. Sin embargo, si la respuesta de fase corregida real de estos tres sistemas se calcula para una banda ancha de 200 THz centrada en 384,3 THz (correspondiente a longitudes de onda entre 619 nm y 1054 nm y una longitud de onda central de 780 nm), el resultado es como se muestra en Figura 20, donde las respuestas de fase para todo el sistema y la fase del rayo central solo para cada sistema se muestran para los tres sistemas. Se considera que son casi iguales en todos los casos; la fase de diferencia, es decir, el segundo retardo de fase de "rutas múltiples" mencionado anteriormente, se muestra en la Figura 21. La fina estructura de la Figura 21 se debe a la interferencia entre los componentes de la luz que corren a lo largo de las diferentes rutas posibles a través del grupo de lentes y la ecualización ligeramente imperfecta de todas estas rutas por la corrección cromática.

Las correspondientes respuestas de salida en el dominio del tiempo cuando un pulso de luz de 10 fs de ancho con dependencia del tiempo (aquí  $T = 10$  fs y  $\lambda_c = 780$  nm):

$$f(t) = \text{Senc}\left(\frac{2\pi t}{T}\right) e^{-i\frac{2\pi c t}{\lambda_c}} m \quad \text{Ecuación 8}$$

en la entrada al sistema se muestra en las Figuras 22 y 23; la Figura 22 muestra la respuesta de todo el sistema de lentes antes de que la dispersión del material se haya compensado con los pulsos compensados superpuestos para mostrar el tamaño relativo, mientras que la Figura 23 muestra el ensanchamiento del pulso debido únicamente a rutas múltiples. Está claro que la corrección cromática para cada sistema mantiene el retardo de rutas múltiples a menos de 20 fs, mucho menos que el valor de 122 fs no corregido arriba. La compensación de retraso del grupo actual con rejillas chirriadas puede realizar un pulso de aproximadamente 50 fs de ancho; la Figura 23 deja en claro que estos sistemas están más que suficientemente corregidos para no obstaculizar este grado de compensación y solo comenzarán a mostrarse como contribuyentes significativos al ensanchamiento del pulso cuando los pulsos de 20 fs o menos puedan realizarse mediante sistemas compensados.

La formación de imágenes de dos fotones a menudo requiere potencias muy altas para una buena relación señal/ruido. Los cálculos para la fluoresceína muestran que se aceptan potencias de 10 mW a 5 W dependiendo de la aplicación. Sin embargo, la claridad muy alta (baja capacidad de absorción) de los cristales ópticos significa que la unión directa del grupo de lentes a la fibra de escaneo sin un espacio de aire intermedio no dañará la lente por la carga térmica a estas altas potencias. Schott indica una transmitancia de aproximadamente 0,995 a través de 25 mm de cristal N-SF66, correspondiente a un coeficiente de absorción de  $0,2 \text{ m}^{-1}$ .

Con este coeficiente de absorción, la Figura 24 muestra el aumento de temperatura en estado estacionario, con relación al exterior de la varilla, en una varilla Schott N-SF66 de 0,5 mm de diámetro y 5 μm de longitud cuando se introduce un haz de 1 vatio de 0,1 NA en el lado izquierdo de la varilla. Estas condiciones corresponden a la entrada de luz al sistema "050 033 Universal" discutido anteriormente. Aquí se supone que la varilla se enfria de forma muy eficaz por convección debido a que se escanea rápidamente en el aire, de modo que el borde de la varilla se mantiene cerca de la temperatura ambiente. Menos de 100 μW se absorbe por la propia varilla y el aumento de temperatura es inferior a un Kelvin. (El aumento máximo en la Figura 24 es 0,288 K.)

Los sistemas discutidos anteriormente tienen una simplicidad que facilita la construcción. Sin embargo, las modalidades prácticas de refracción parecen estar limitadas a aperturas numéricas de aproximadamente 0,5 y las logran solo con pérdidas de viñeteado significativas.

De acuerdo con un segundo grupo de modalidades de la presente invención, se proporcionan sistemas ópticos que comprenden un primer grupo de lentes de dos o más cristales diferentes y, además, un segundo grupo de lentes de uno o más elementos que se ubican delante del primer grupo de lentes; en algunas de estas modalidades existe un espacio entre el primer y el segundo grupo de lentes (que puede ser, por ejemplo, un espacio de aire o un espacio libre). Esta combinación de grupos de lentes proporciona una dispersión que se cancela mutuamente y se adapta para

un par de longitudes de onda de activación/fluorescencia (que incluye los casos en los que las longitudes de onda de fluorescencia y de activación son iguales) en el espectro de luz ampliado de 450 nm a 850 nm de longitud de onda. Esto permite mayores aperturas numéricas, aunque a expensas de una mayor complejidad y una mayor dificultad de fabricación.

- 5 La más práctica de tales modalidades incluye un espacio de aire o espacio libre. Un sistema óptico de acuerdo con tal modalidad se muestra esquemáticamente en 100 en la Figura 25. El sistema óptico 100 incluye (desde el extremo próximo al extremo distal) un primer grupo de lentes 102 que comprende un colimador doble 104a, 104b que colima la luz que emerge de una fibra óptica de suministro (no se muestra). El colimador doble 104a, 104b va seguido de un espacio 106 de espacio libre, y luego un segundo grupo 108 de lentes. El segundo grupo de lentes 108 comprende un elemento de contracción o colimación del haz 110a de un cristal de baja dispersión y bajo índice (tal como Schott N-FK51A) y una lente asférica 110b de un cristal de dispersión superior de índice más alto (tal como Schott N-LAK34). El elemento de contracción o colimación del haz 110a contrae ligeramente el haz colimado, funcionando como un telescopio galileano de bajo aumento. La lente asférica 110b convierte el rayo resultante en el foco de salida. El elemento de contracción o colimación del haz 110a añade potencia positiva o negativa al haz dependiendo de la longitud de onda para cancelar los efectos de dispersión del colimador doble 104a, 104b y la lente asférica 110b. El segundo elemento de colimador doble 104b y el segundo grupo de lentes 108 se ubican en un manguito de carcasa cilíndrica 112. Un cubreobjetos se muestra en 114.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Tabla 3: Características de los grupos de lentes de las Figuras 25 y 26

Número de Superficie	Radio (mm)	Coeficiente asférico cuadrático ( $\text{mm}^{-1}$ )	Coeficiente asférico cuartico ( $\text{mm}^{-3}$ )	Coeficiente asférico séxtico ( $\text{mm}^{-5}$ )	Espesor del centro de la superficie (mm)	Material	D (mm)	Descripción
1	$\infty$	0,000000	0,000000	0,000000	1,378065	N-SF66	0,7	Planar; fibra unida a su centro
2	0,337850	0,000000	0,000000	0,000000	0,804024	N-FK51A	0,5	Superficie interior del colimador de fibra
3	-3,588523	-0,857541	-5,923243	23,075341	0,120865	Espacio libre	0,5	Superficie asférica de salida del colimador de fibra
4	$\infty$	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	Espacio libre	0,5	Parada de apertura
5	1,069905	0,000000	0,000000	0,000000	0,782923	N-FK51A	0,5	Entrada del telescopio galileano (haz colimado)
6	-0,333333	0,000000	0,000000	0,000000	0,716058	N-LAK34	0,5	Salida del telescopio galileano (haz colimado)
7	-0,8333702	-2,181091	34,697849	-335,167203	0,198088	Espacio libre	0,4	Superficie de enfoque final
8	$\infty$	0,000000	0,000000	0,000000	0,100000	N-BK7	0,4	Entrada de cubreobjetos
9	$\infty$	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	Tejido acústico	0,4	Muestra de tejido ilustrativa

La colimación entre los grupos de lentes primero y segundo 102, 108 no es del todo perfecta, de modo que el ajuste de las posiciones relativas de los dos grupos de lentes 102, 108 introduce una aberración esférica en el haz. Por tanto, la aberración esférica que surge de la ubicación axial imperfecta de las superficies refractantes puede corregirse mediante un ajuste de compensación de la separación entre los dos grupos de lentes 102, 108. La aberración cromática que surge de las imperfecciones puede compensarse mediante un ajuste de la posición lateral de la fibra óptica de entrada. Sin embargo, debido a las muchas superficies del sistema óptico 100, también puede existir aberración astigmática en este sistema óptico; si es necesario, puede usarse un método de compensación activa para ajustar la posición lateral del segundo grupo de lentes 108 con relación al primer grupo de lentes 102. Tales métodos emplean:

- i) Un hueco de gran tamaño en el manguito de la carcasa 112 o de un diámetro exterior de tamaño inferior al segundo grupo de lentes 108; y
- ii) Puerto de acceso a través del manguito de la carcasa 112 para admitir varillas de empuje para ajustar la posición relativa y también para embadurnar con pegamento el segundo grupo de lentes 108 para cementar su posición óptima después de la alineación activa.

Tabla 4: Rendimiento Óptico del sistema óptico 100 de las Figuras 25 y 26

Nombre del Parámetro del Sistema	Símbolo	Valor
Longitud de Onda de Excitación del Sistema	$\lambda_D$ (nm)	>450
Longitud de Onda Fluorescente del Sistema	$\lambda_F$ (nm)	<850
Apertura Numérica de Salida del Sistema (Petermann II)	$\eta_{salida}$	0,57 (0,80)
Resolución Lateral del Sistema Petermann II	$\Delta X_{FWHM}$ ( $\mu\text{m}$ )	0,48
Resolución Axial del Sistema (FWHM)	$\Delta Z_{FWHM}$ ( $\mu\text{m}$ )	4,9
Relación Strehl en $\lambda_D$	$S_D$	0,91 (0,82)
Relación Strehl en $\lambda_F$	$S_F$	0,92 (0,88)
Pérdida Total (una pasada) <sup>1</sup>	$L_v$ (dB)	1,4
Número de Fotones (microscopía confocal de fluorescencia) <sup>2</sup>	$N$	7170

<sup>1</sup> A una longitud de onda de 488 nm; la pérdida total de ida y vuelta en la microscopía de un fotón de fluorescencia, por ejemplo con FITC, es aproximadamente el doble de este valor

<sup>2</sup> El número total de fotones devueltos recogidos por imágenes de microscopía de fluorescencia de un fotón de fluoróforo subresoluble que contiene 105 iones de fluoresceína con 100  $\mu\text{W}$  de luz de activación de 488 nm en la fibra óptica SM450 de 0,095 NA y tiempo de permanencia (es decir, de recolección de fotones) de 300 ns

Tabla 5: Parámetros de Rendimiento Mecánico para el Sistema Óptico 100 con Escaneo de Amplitud de 1 mm

Nombre del Parámetro de Rendimiento Mecánico	Símbolo en las Figuras 2 y 3	Universal NA	0,80/0,57	Dato
Ventana elipsoidal dentro de los radios de curvatura principales	$r_1, r_2$ (mm)	2,71, 10,5		N/A
Cojinete a intervalo de fibra magnética	$l_c$ (mm)	4,0		N/A
Frecuencia de resonancia de escaneo rápido	$f_{res}$ (kHz)	0,7939		0,8734
Amplitud de la fuerza de activación para una dirección de escaneo rápido	$F_{rapido}$ ( $\mu\text{m}$ )	452		161
Amplitud de desplazamiento lateral del imán para una dirección de escaneo rápido	$\delta_{rapido}$ ( $\mu\text{m}$ )	170		97
Amplitud de la fuerza de activación para una dirección de escaneo lento	$F_{lento}$ (mN)	6,10		5,85
Amplitud de desplazamiento lateral del imán para una dirección de escaneo lento	$\delta_{lenta}$ ( $\mu\text{m}$ )	465		200

Los sistemas ópticos de acuerdo con un tercer grupo de modalidades de la presente invención emplean una fibra óptica que tiene un núcleo secundario altamente multimodal que puede aceptar y guiar la fluorescencia de retorno. Esto simplifica el diseño de la ruta de retorno de fluorescencia y, por lo tanto, produce un ajuste de sistema simplificado para la formación de imágenes de muchos fotones, con una corrección de aberración modesta.

La Figura 27 es una vista esquemática de un sistema óptico 130 de muchos fotones de espectro amplio que comprende una fibra óptica 132 y un grupo de lentes 134, de acuerdo con este tercer grupo de modalidades. La fibra óptica 132 comprende un núcleo central de activación de un solo modo 136 que alimenta el sistema en la longitud de onda de activación de muchos fotones, rodeado por un núcleo multimodo de recolección de fluorescencia 138 que recolecta la luz de retorno fluorescente de muchos fotones y el mismo se rodea por un revestimiento de fibra 140. El

grupo de lentes 134 comprende un sustrato 142, una lente asférica 144 y una interfaz plana 146 entre ellos. El grupo de lentes 134 establece un foco intenso en la muestra (como tejido biológico). La luz fluorescente de muchos fotones se visualiza de retorno en el núcleo de recolección de fluorescencia de multimodo 138, cuya alta fluorescencia multimodal significa que acepta y guía la fluorescencia aunque su frente de onda pueda estar considerablemente aberrado. Por lo tanto, se evita la necesidad de corregir cromáticamente el grupo de lentes, y un microscopio de escaneo o endoscopio que incluye el sistema óptico 130 puede funcionar como un sistema de muchos fotones de espectro amplio.

Los sistemas ópticos de acuerdo con un cuarto grupo de modalidades de la presente invención emplean uno o más núcleos de guía de luz auxiliares que se ubican en la fibra óptica de escaneo (los cuales pueden denominarse núcleos de 'navegador'), de modo que la apertura numérica de formación de imágenes puede alternarse entre el valor principal de alta resolución (mediante el uso del núcleo central de formación de imágenes) y un valor bajo (digamos, 0,1 NA) mediante el uso de uno o más núcleos de navegador. Si hay una pluralidad de tales núcleos de navegador, es posible proporcionar una o más etapas intermedias de mayor resolución exitosamente. Este acercamiento permite al usuario colocar una imagen fácilmente, con una resolución axial gruesa y una alta tolerancia a los errores de ubicación y la inestabilidad de la mano, y luego cambiar a un modo de alta resolución (con una tolerancia más baja) una vez que se ha identificado o ubicado el tejido objetivo.

Las Figuras 28 y 29 son vistas esquemáticas de sistemas ópticos de múltiples núcleos 150, 160 de acuerdo con este cuarto grupo de modalidades. Cada una incluye un grupo de lentes comparable al grupo de lentes 134 de la Figura 27, y se han usado números de referencia similares para identificar características similares.

Con referencia a la Figura 28, el sistema óptico de múltiples núcleos 150 incluye una fibra óptica 152 y un grupo de lentes 134. La fibra óptica 152 incluye un núcleo central de modo simple 154, que proporciona el canal principal de formación de imágenes. La formación de imágenes que se realiza con el núcleo central 154 puede producir una resolución axial muy nítida, con el resultado de que puede ser difícil ubicar las características de interés en la muestra. Por lo tanto, la fibra óptica 152 también incluye uno o más núcleos desplazados 156 de modo 'navegador' o de modo simple de NA muy baja, que proporcionan un canal de navegación con resolución axial gruesa. Los núcleos 154, 156 se rodean por un revestimiento de fibra 158. Por lo tanto, la formación de imágenes a través del núcleo de navegador 156 puede facilitar la búsqueda de características de interés; una vez que el usuario encuentra estas características en la muestra, el sistema puede cambiar a la formación de imágenes a través del núcleo principal de formación de imágenes 154. Este cambio puede hacerse proporcionando el microscopio o endoscopio en el que el sistema óptico 150 se proporciona con fotodetectores separados para las salidas de los dos núcleos 154, 156, y cambiando entre estos fotodetectores como entradas, por ejemplo, de una pantalla en la que las imágenes resultantes de la muestra se muestran al usuario. Aunque el núcleo 156 del navegador se desplaza lateralmente desde el eje óptico 160, su baja apertura numérica significa que esta imperfección nociónal no disminuye seriamente el rendimiento confocal del sistema. El núcleo de navegador 156 se desplaza lateralmente:

- i) Lo suficientemente lejos del eje óptico 160 para que no cambie significativamente las propiedades de guiado del núcleo central 154, a través del acoplamiento de campo evanescente entre los dos núcleos 154, 156; pero
- ii) lo suficientemente cerca del eje óptico 160 para que la aberración cromática debida al desplazamiento lateral no afecte demasiado el rendimiento confocal del núcleo de navegador 156.

Con referencia a la Figura 29, el sistema óptico de múltiples núcleos 170 incluye una fibra óptica 172 y un grupo de lentes 134, e ilustra unas técnicas de acuerdo con esta modalidad mediante las cuales la profundidad de la formación de imágenes en la muestra puede cambiarse entre diferentes valores mediante el cambio del núcleo de la fibra de formación de imágenes y por lo tanto para efectuar un ajuste grueso de la profundidad de la formación de imágenes. La fibra óptica 172 incluye un núcleo central principal de modo simple 174 y uno o más núcleos 176 desplazados lateralmente. Los núcleos 174, 176 se rodean por un revestimiento de fibra 178.

En esta modalidad, cada uno de uno o más núcleos 176 desplazados lateralmente tiene una punta de salida que también se desplaza en la dirección z (es decir, la dirección paralela al eje óptico 160). Nuevamente, el desplazamiento lateral de los núcleos separados es lo suficientemente pequeño como para que la aberración cromática que surge del desplazamiento lateral no afecte excesivamente el rendimiento confocal de cada núcleo desplazado 176 pero lo suficientemente separados para impedir un acoplamiento evanescente. La profundidad de formación de imágenes del sistema en la muestra se cambia entre diferentes valores mediante el cambio de la formación de imágenes entre los núcleos 176 desplazados axialmente de forma diferente.

El grupo de lentes 134 se diseña para que los diferentes desplazamientos axiales puedan adaptarse sin una pérdida grave del rendimiento confocal. Por ejemplo, los diseños de NA inferior de la Tabla 1 (040 026 No corregido o 047 030 No corregido) tienen un rendimiento que es altamente insensible a la posición axial de la punta de la fibra, por lo que la profundidad de la formación de imágenes puede controlarse mediante el ajuste de la separación entre la punta del núcleo y el sustrato. Puede proporcionarse un control más profundo mediante el uso de sistemas de menor NA y menor aumento, ya que el desplazamiento axial en el foco es inversamente proporcional al cuadrado del aumento

lineal del sistema. Para sistemas de bajo aumento, se emplean núcleos de fibra de modo simple que generan correspondientemente campos de Petermann II de NA más altos para mantener un rendimiento óptico constante.

Un quinto grupo de modalidades de la presente invención emplea elementos de lentes difractivas en lugar de usar las lentes refractivas asféricas descritas anteriormente. En una de tales modalidades, un sustrato de cristal cilíndrico de dimensiones comparables a las de las lentes refractivas descritas anteriormente (por ejemplo, aproximadamente 0,5 mm de diámetro  $\times$  de 2 mm a 3 mm de longitud) se monta en el extremo de la fibra de escaneo. Se monta una rejilla de difracción en el otro extremo del sustrato cilíndrico de la fibra y se escanea todo el ensamblaje de la misma manera que la lente refractiva descrita anteriormente. La Figura 30A es una vista esquemática de un sistema óptico 180 tal, que comprende una fibra óptica de escaneo 182, un sustrato de cristal cilíndrico de escaneado 184 y una lente holográfica (rejilla de difracción) 186 que se ubica en el extremo distal 188 del sustrato cilíndrico 184.

El campo de salida de la fibra se difracta a través del sustrato cilíndrico 184 desde la punta de la fibra óptica 182 hasta la superficie proximal de la lente de rejilla de difracción 186 (tanto como lo hace al difractarse desde la punta de la fibra hasta la superficie asférica de las modalidades de las Figuras de la 2A a la 3), donde se enfoca en la muestra mediante una lente de rejilla de difracción 186 (en lugar de una superficie refractiva asférica).

La Figura 31 incluye una vista lateral esquemática del sistema óptico 180 (que se muestra en elevación, con las dimensiones, el plano de rejilla de difracción 190 y el plano focal 192 que se indican) y una vista de la lente de rejilla de difracción 186, que es una lente de rejilla de difracción del tipo que podría usarse más fácilmente lo mismo para la formación de imágenes en modo de reflexión (en donde las longitudes de onda de activación y fluorescencia son las mismas) que en los sistemas de espectro amplio y de fluorescencia de muchos fotones, donde se espera que una rejilla no compensada sea de bajo costo y altamente factible.

Sin embargo, uno de los principales problemas al usar una lente de rejilla es su alta sensibilidad a la longitud de onda; el punto focal en la longitud de onda de excitación estará normalmente muchas decenas de micrones más lejos de la rejilla que el punto focal en la longitud de onda fluorescente. Para aplicaciones de fluorescencia de un fotón o de muchos fotones de espectro estrecho, la dependencia de la longitud de onda de la rejilla es un problema importante. Por ejemplo, en una aplicación confocal de un fotón con una longitud de onda de activación  $\lambda_D = 488$  nm y una longitud de onda máxima de fluorescencia de  $\lambda_F = 532$  nm, y donde una lente holográfica enfoca la luz de activación a una distancia axial de 1 mm del plano de la lente de rejilla, puede esperarse que la longitud de onda de fluorescencia se enfoque a una distancia de 488/532 mm desde el plano de la lente, es decir, a una distancia de 83  $\mu$ m del foco de longitud de onda de excitación. Esta cantidad de desplazamiento cromático truncará todos los esquemas de formación de imágenes confocales.

Sin embargo, si la mitad de la lente holográfica se entrega a una rejilla que enfoca la luz de activación y la otra mitad a una que enfoca la luz de fluorescencia, entonces los dos focos del sistema pueden volver al mismo punto. La Figura 30B es una vista esquemática de un sistema óptico 200 que incluye una lente de rejilla de difracción 'compensada' 200 tal, pero que por lo demás es comparable al sistema óptico 180 de la Figura 30A. La Figura 32 es una vista de la lente de rejilla de difracción compensada 200, en la que la rejilla de difracción se divide en ocho sectores de 45°, con cada segundo sector (cada uno se etiqueta como "rejilla 1b") que comprende una rejilla que enfoca luz de 488 nm en un punto a una distancia axial de 1 mm del plano de la lente de rejilla, mientras que todos los demás sectores (cada uno se etiqueta como "rejilla 1f") se entregan a rejillas que hacen lo mismo para luz de 532 nm. Existen discontinuidades abruptas de la rejilla en los bordes del sector.

La Figura 33 incluye vistas de la función de dispersión de punto del plano focal para una rejilla sectorizada (tal como la rejilla 202) para una longitud de onda de activación de 488 nm (registro izquierdo) y una longitud de onda de fluorescencia de 532 nm (registro derecho). Ambas imágenes tienen una longitud lateral de 12,4  $\times$  12,4  $\mu$ m. La clave de color está en unidades arbitrarias. La Figura 34 incluye vistas de la respuesta confocal del plano focal para una rejilla sectorizada con longitudes de onda máximas de fluorescencia de 532 nm y de activación de 488 nm. El registro izquierdo muestra la respuesta confocal para el fluoróforo subresoluble, mientras que el registro derecho muestra la raíz cuadrada de la respuesta confocal. Ambas imágenes tienen una longitud lateral de 12,4  $\times$  12,4 micrones, y la clave de color está nuevamente en unidades arbitrarias. El ancho completo a la mitad de la resolución lateral máxima es 1,2  $\mu$ m.

Cuando los ángulos de sector son de 45°, como en el ejemplo de la Figura 32, la relación Strehl para las longitudes de onda tanto de activación como de fluorescencia es aproximadamente 0,25, ya que la mitad del área de la rejilla se entrega a cada longitud de onda y, por tanto, la amplitud máxima del campo de enfoque es aproximadamente la mitad de lo que sería si toda la rejilla estuviera perfectamente sintonizada en una sola longitud de onda. Por lo tanto, el sistema óptico 200 sufre aproximadamente una pérdida de sensibilidad de 12 dB con relación a los sistemas refractivos descritos anteriormente. Sin embargo, la solución difractiva puede ser una alternativa útil y de bajo costo en algunas aplicaciones. Además, puede cambiarse la fracción de la superficie de la rejilla dedicada a cada longitud de onda, de modo que la rejilla de fluorescencia sea de un área mayor que la rejilla de luz de activación, y la pérdida de intensidad focal de la longitud de onda de activación puede compensarse con una potencia de luz de activación más alta, o viceversa.

## Alineación Activa

De acuerdo con las modalidades de la presente invención descritas anteriormente, también se proporciona un método de alineación activa, mediante el cual pueden alinearse una fibra óptica y un grupo de lentes (tal como la fibra óptica 12 y el grupo de lentes 14 de las Figuras 2A y 2B). En términos generales, la fibra óptica se coloca en una plantilla de alineación que permite ajustar la posición relativa y la orientación de la fibra óptica y el grupo de lentes mientras la luz de excitación se introduce en la fibra óptica y la luz de salida del grupo de lentes se dirige hacia un detector de luz adecuado (tal como un sensor de frente de onda, un aparato de astrónomo para prueba de estrellas o un interferómetro). La posición y orientación relativas se ajustan luego hasta que se obtienen la posición y orientación relativas óptimas de menor aberración, en cuyo punto la fibra óptica se une al grupo de lentes.

La Figura 35 es una vista de un aparato de alineación activo 210 de acuerdo con una modalidad de la presente invención, que se adapta para alinear sistemas ópticos de las modalidades descritas anteriormente. El aparato de alineación 210 incluye un transportador general X, Y 212, un rotador general 214, un transportador general Z 216, un transportador relativo X, Y 218 y un transportador relativo Z 220. El aparato de alineación 210 también incluye una abrazadera de fibra 222 que se monta en el transportador relativo Z 220, una abrazadera de lente 224 que se monta en un brazo 226 que se extiende por el rotador general 214 (e incluye un resorte para sostener un cubreobjetos en su lugar), un poste vertical 228, un carril horizontal 230 (para soportar y permitir la traslación en la dirección z de varios componentes, y él mismo se soporta por el poste 228), un objetivo de alineación aproximada extraíble 232 en el carril 230, y un detector de luz 234 que se ubica en el extremo distal del carril 230. El aparato de alineación 210 incluye opcionalmente un Filtro ND 236 (en caso de que se necesite atenuación), que se ubica ópticamente en frente del detector de luz 234.

El detector de luz 234 puede ser de cualquier forma adecuada, tal como un sensor de frente de onda, un interferómetro autorreferencial (tal como un interferómetro de difracción de puntos) o una cámara CCD (con una resolución lo suficientemente alta para ver una función de dispersión de puntos casi colimada que se esparce en al menos un  $50 \times 50$  píxeles en la rejilla y la capacidad de medir linealmente intensidades relativas, es decir, sin ganancia automática, de modo que un brillo dado en la imagen corresponda de forma reproducible a la misma intensidad de luz). En esta modalidad, el detector de luz 234 tiene la forma de un Sensor Hartmann.

El rotador general 214 permite a un usuario rotar una fibra óptica que se sujetó en la abrazadera de fibra 222 y el grupo de lentes sujeto en la abrazadera de lentes 224 alrededor de un eje horizontal, mientras mantiene fijas las posiciones relativas de la fibra y del grupo de lentes. El transportador general X, Y 212 y el transportador general Z 216 permiten al usuario trasladar el grupo de lentes y fibras sujetadas rotativamente en cualquier dirección mientras se mantienen fijas las posiciones relativas del grupo de lentes y de las fibras. El transportador relativo X, Y 218 y el transportador relativo Z 220 permiten al usuario ajustar las posiciones relativas de la fibra de entrada y del grupo de lentes.

El aparato de alineación 210 incluye además un objetivo de colimación 238 de alta apertura numérica que se monta en el extremo proximal 240 del carril 230, y un telescopio Galileano variable 242 para hacer coincidir el ancho del haz de salida colimado del objetivo de colimación 238 con el área de medición del detector de luz 234.

El telescopio galileano 242 comprende una pluralidad de lentes individuales, que se ubican en los porta lentes deslizantes 244a, 244b, 244c que se montan en el carril 230. La calibración del aparato de alineación 210 se realiza eligiendo las potencias de las lentes de estas lentes que harán coincidir el ancho del haz de salida colimado desde el objetivo de colimación 238 con el área de medición del detector de luz 234, luego cargando las lentes así identificadas en el telescopio Galileano 242, y configurando la separación axial teórica entre estas lentes mediante la colocación de la porta lentes 24. La más distal de estas lentes es una lente biconvexa (en el soporte de la lente 244c), cuya potencia y posición axial en el carril 230 se seleccionan para proporcionar el zoom deseado del telescopio Galileano 242.

El flujo de trabajo de alineación activa es el siguiente:

- i) La fibra óptica y el grupo de lentes se cargan en la abrazadera de fibra 222 y la abrazadera de lentes 224, respectivamente;
- ii) La punta de la fibra óptica se lleva dentro de 10 µm de la superficie proximal del grupo de lentes mediante el uso del traductor Z relativo 220;
- iii) Se establece una posición lateral (X, Y) aproximadamente correcta de la fibra óptica con la ayuda de un microscopio de visión en planta (no se muestra) mediante el ajuste de la posición X con el transportador relativo X, Y 218 para una posición X centrada a vista de la lente, luego girando el ensamblaje del grupo de lentes de fibra a 90°, luego ajustando la posición Y con el traductor relativo X, Y 218 para una posición Y centrada a vista, luego girando hacia atrás;
- iv) Las etapas ii y iii se repiten si es necesario hasta que el usuario considere que la fibra está centrada a simple vista y dentro de 10 µm de la superficie proximal del grupo de lentes;

- v) La fibra óptica se alimenta con aproximadamente 1 mW de luz de longitud de onda de activación;
- 5 vi) Las posiciones X, Y y Z se ajustan con el transportador general X, Y y Z 212 para iluminar el detector de luz 234 a sus anchos de haz operativos nominales (si se usa un sensor de frente de onda o interferómetro) o para la máxima intensidad en la función de dispersión de puntos (si se usa una cámara CCD);
- 10 vii) Las posiciones X e Y se ajustan ligeramente con el traductor relativo X, Y 218 para corregir la aberración medida, luego se repite la etapa vi;
- 10 viii) Las etapas vi y vii se repiten hasta que se logra la mínima aberración general de todo el sistema (que corresponde al brillo máximo del punto si el detector de luz 234 tiene la forma de una cámara CCD);
- 15 ix) El ensamblaje de fibra de la lente se pega luego con la ayuda del microscopio de observación en planta.

#### Evaluación de la Calidad de la Superficie de la Lente

De acuerdo con las modalidades de la presente invención descritas anteriormente, también se proporciona un método de evaluación de la calidad de la superficie de la lente. En términos generales, de acuerdo con este método, se coloca un orificio de diámetro conocido en el foco de un sistema óptico (de acuerdo con cualquiera de las modalidades descritas anteriormente), se mide la potencia que se transmite a través del orificio, se elimina el orificio de modo que la potencia total de salida también puede medirse y luego la relación entre la potencia a través del orificio y la potencia total puede relacionarse con la rugosidad media cuadrática de la superficie de la lente.

25 La superficie rugosa de una lente divide la luz transmitida en una parte no aberrada, pero atenuada, y una parte que se esparce aleatoriamente. El coeficiente de atenuación de potencia para la parte no aberrada es:

$$30 \quad \Gamma^2 = \frac{P_{\text{no aberrada}}}{P_{\text{entrada}}} = \exp \left( - \left( \frac{2 \pi \sigma}{\lambda} \right)^2 \right) \quad \text{Ecuación 9}$$

donde  $\sigma$  es el error de frente de onda RMS en ondas que se inducen por la rugosidad de la superficie y  $\lambda$  es la longitud de onda de la luz. Una fracción  $1 - \Gamma^2$  de la luz de entrada se convierte en la parte que se dispersa de forma aleatoria, que no converge en un foco estrecho. Por lo tanto, una prueba de garantía de la calidad de la rugosidad de la superficie que se basa en la medición de la fracción de luz que contribuye al foco estrecho es la siguiente.

35 La Figura 36 es una vista de un aparato de evaluación de la calidad de la superficie de la lente 250 de acuerdo con una modalidad de la presente invención (que se muestra, bajo prueba, con una lente o grupo de lentes 252), que se adapta para alinear sistemas ópticos de las modalidades descritas anteriormente. El aparato de evaluación 250 incluye una fuente láser 254, un acoplador direccional 256 de aproximadamente 50-50, un orificio removible 258, un primer cabezal de medición de potencia 260 y un segundo cabezal de medición de potencia 262.

40 La luz de la fuente láser 254 se divide mediante el acoplador 256 en una fibra de referencia 264 (que transmite la luz al primer cabezal de medición de potencia 260) y una fibra de activación 266 que transmite la luz a la lente 252. Parte de la luz que transmite la lente 252 pasa a través del orificio 258 y al segundo cabezal de medición de potencia 262.

45 Como se mencionó anteriormente, una superficie rugosa de la lente divide la luz transmitida en una parte enfocada (que no está aberrada, pero atenuada) 264 y una parte 266 dispersada al azar.

50 La relación de división precisa del acoplador 256 no es importante, y todo lo que se necesita son niveles de luz apreciables en las salidas de la fibra de referencia 264 y la fibra de activación 266. Alternativamente, puede usarse un divisor de haz para dividir la luz en un haz de referencia y un haz de activación. Todas las mediciones se toman como la relación entre la potencia P1 en el primer cabezal de medición 260 y la potencia P2 en el segundo cabezal de medición de potencia 262; P1 y P2 se miden simultáneamente. Es deseable que esto se haga con una señal de disparo para ambos cabezales de medición de potencia 260, 262 si son del tipo que puede activarse. En principio, con una fuente de láser 254 altamente estable, con una salida de potencia sustancialmente constante, se podría omitir el acoplador 256 y el primer cabezal 260 de medición de potencia, y simplemente medir la potencia absoluta en el segundo cabezal 262 de medición de potencia. Sin embargo, el uso de la relación P2/P1 obtenida de la medición simultánea activada permite el uso de una fuente láser de salida oscilante de menor calidad. El orificio 258 es extraíble y también se monta en una plataforma de translación XYZ (no se muestra). La etapa de translación se ajusta a la apertura del orificio 258 en el foco de la lente 252, es decir, en la posición que da la potencia máxima al segundo cabezal 262 de medición de potencia. Esta potencia máxima, como una relación de medición de la relación de P2 a P1, se registra y luego se retira el orificio 258. Se vuelve a medir la potencia en el segundo cabezal de medición de potencia 262, registrada como la relación de P2 a P1. La relación entre la medición con el orificio 258 instalado y la sin orificio 258 es el resultado experimental final que se usa como medida de la calidad de la lente.

Para un orificio de diámetro dado y una apertura numérica de la lente, la rugosidad de la superficie RMS puede calcularse a partir de la métrica QA final. La Figura 37 es un gráfico, para rugosidades superficiales de 0 a 200 nm RMS en etapas de 10 nm, de la fracción calculada de la potencia total que fluye a través del plano focal que se rodea por un agujero circular en el plano focal centrado en el foco mismo como una función del radio circundante en nm. En caso de que la correspondencia entre la rugosidad superficial RMS y la curva no esté clara en la Figura, debe tenerse en cuenta que las curvas corresponden en secuencia vertical a la secuencia de valores de rugosidad superficial indicados a la derecha del gráfico.

Las curvas se calcularon mediante la integración numérica de las ecuaciones de Maxwell completas que describen la propagación de la luz a través de una lente de 0,3 NA con rugosidad superficial. Cada curva de energía rodeada es la curva promedio de las obtenidas para cinco simulaciones de Monte Carlo. También se muestran barras de error de confianza de dos caras del 98 % para las curvas de rugosidad superficial RMS de 50 nm, 60 nm y 70 nm. Para un radio circundante dado en la Figura 37, una gráfica del valor de cada curva en la Figura 37 en ese radio como una función de la rugosidad superficial RMS produce una curva de calibración para el aparato de evaluación 250 de la Figura 36 cuando un pequeño orificio 258 con este radio dado se usa y cuando la salida del objetivo es un campo de 0,3 NA.

La Figura 38 es un gráfico de este tipo, es decir, de la fracción de la salida de potencia total de la lente que puede pasar a través del orificio, cuando la posición del orificio se ajusta para el rendimiento máximo de potencia, en función de la rugosidad superficial RMS en nm, para orificios de 5 µm, 10 µm y 15 µm y para una lente de 0,3 NA y una lente de 0,266 NA.

Puede observarse que las fracciones representadas en la Figura 38 no son muy sensibles ni al diámetro exacto del orificio ni a la apertura numérica del campo, especialmente a un diámetro de orificio de 5 µm. Por tanto, a partir de estos resultados parecería que el aparato de evaluación 250 de la Figura 36 debería producir una medición creíble de la rugosidad de la superficie. Una curva de Gauss de mejor ajuste de mínimos cuadrados para los resultados del orificio de 5 µm también se muestran en la Figura 38. Por lo tanto, puede verse que una buena estimación de trabajo de la rugosidad de la superficie RMS de la lente viene dada por:

$$\sigma = 128,0 \sqrt{-\log_e(1,070 f)} \quad \text{Ecuación 10}$$

donde  $f$  es la fracción medida en la prueba y  $\sigma$  está en nanómetros, cuando se usa un orificio de 5 nm de diámetro. La relación de la Ecuación 10 es la inversa de la curva de mejor ajuste de mínimos cuadrados de Gauss:

$$f = 0,935 \exp\left(-\left(\frac{2\pi \times 0,608 \times \sigma}{\lambda}\right)^2\right) \quad \text{Ecuación 11}$$

se muestra en la Figura 38. La dispersión de la luz sobre el plano focal, como se muestra en la Figura 37, depende de alguna manera de las propiedades estadísticas de la rugosidad de la superficie (particularmente la longitud de correlación), pero la Ecuación 11 es casi la misma que la fracción de potencia de la Ecuación 9. De hecho, puede obtenerse una estimación justa de la rugosidad de la superficie simplemente mediante el uso de la fórmula inversa de la fracción de potencia en la Ecuación 9. Esto significa que, para un orificio de 5 µm de diámetro y una lente de 0,3 NA, la potencia a través del orificio es la fracción de potencia que enfoca la lente rugosa. El orificio de 5 µm de diámetro es un buen discriminador entre la luz enfocada 264 y la luz dispersada 266 y, por tanto, es probable que la Ecuación 10 dependa sólo muy débilmente de la distribución de la luz dispersada en el plano focal; todo lo que importa es que la luz 266 dispersada debe caer fuera de la abertura del orificio 258. Por lo tanto, la Ecuación 10 es una forma sólida de inferir las rugosidades de la superficie de la lente a partir de las pruebas realizadas con el aparato de evaluación 250 de la Figura 36.

Apéndice 1: Especificación combinada de la Relación Strehl/Aberración Cromática para sistemas de Formación de Imágenes *in vivo*

Una forma de combinar las especificaciones de Strehl y el desplazamiento cromático es a través del experimento mental representado esquemáticamente en las Figuras 39A y 39B, que compara las definiciones de aberración aceptables (Figura 39A) e inaceptables (Figura 39B). Una definición aceptable de aberración es aquella en la que las especificaciones de aberración se cumplen en el mismo punto focal nominal para las longitudes de onda de excitación y fluorescencia. EN las Figuras 39A y 39B, para  $\lambda = 488$  nm, el frente de onda y el error RMS < 0,05 se muestran en 270, y para  $\lambda = 532$  nm, el frente de onda y el error RMS < 0,05 se muestran en 272. En la Figura 39A, se elige el mismo punto focal nominal para medir la aberración en  $\lambda = 488$  nm y  $\lambda = 532$  nm (se indica en 274). En la Figura 39B, se eligen diferentes puntos focales nominales para medir la aberración en  $\lambda = 488$  nm y  $\lambda = 532$  nm (se indican en 276 y 278 respectivamente); el desplazamiento entre los puntos focales 276, 278 es una medida del desplazamiento cromático 280.

La especificación combinada puede usarse para visualizar claramente el efecto perjudicial de la aberración cromática en sistemas *in vivo*. El ejemplo de las Figuras 39A y 39B es para formación de imágenes confocales de fluorescencia de un fotón con una longitud de onda de excitación de 488 nm y un pico de fluorescencia de 532 nm, pero los principios se aplican a cualquier par de longitudes de onda de excitación y fluorescencia.

5 Con referencia a la Figura 39A, en este experimento mental, con el sistema de lentes en un interferómetro iluminado para obtener la NA de salida deseada y el punto de formación de imagen deseado, se encuentra el mejor foco para una de las longitudes de onda. Se mide la relación Strehl. Luego, sin ajustar el interferómetro de ninguna manera, la longitud de onda de la fuente se cambia a la otra longitud de onda y se vuelve a medir la relación Strehl. El producto de estas dos relaciones Strehl define la sensibilidad del instrumento.

10 En este experimento mental, el probador puede volver a enfocar el interferómetro a un foco nominal diferente y repetir la medición anterior para ver si puede obtenerse un mejor resultado. Cuando el foco se encuentra de manera que ninguno reenfoque dará una mayor reducción en el producto de relación Strehl, este resultado mínimo es la especificación combinada y, además, el foco nominal final define un punto en la superficie focal.

15 Cabe señalar que, debido a que no se realiza ningún ajuste del interferómetro entre la medición de las dos relaciones Strehl, las especificaciones de desplazamiento cromático admisibles, tanto axiales como laterales (registro de color), están implícitas en esta especificación. Por el contrario, el método de "medición inaceptable" ilustrado en la Figura 20 39B permite un ajuste entre las dos mediciones de la relación Strehl. Esta técnica daría una medida explícita del desplazamiento cromático. El desplazamiento cromático es igual al desplazamiento entre los dos focos en general diferentes que optimizan por separado las relaciones Strehl en las longitudes de onda de excitación y de fluorescencia máxima.

25 Por lo tanto, si  $S(r, \lambda)$  es la relación Strehl en el espacio objetivo en la posición con el vector de posición  $r$  cuando el sistema se acciona en la longitud de onda  $\lambda$ , la relación Strehl óptima a esa longitud de onda es

$$\max_{r \in \mathbb{R}^3} S(r, \lambda) \quad \text{Ecuación 12}$$

30 y el "foco" en esta longitud de onda es la posición  $r_{\max}$  que consigue. La especificación óptima del producto Strehl para el sistema de lentes es entonces:

$$\max_{r \in \mathbb{R}^3} (S(r, \lambda_D) \times S(r, \lambda_F)) \quad \text{Ecuación 13}$$

35 donde  $\lambda_D$  es la longitud de onda de excitación y  $\lambda_F$  la longitud de onda de fluorescencia máxima, es decir, es el producto que se maximiza y se usa como especificación, no el producto de las relaciones Strehl máximas para las longitudes de onda individuales. El foco del sistema confocal es la posición  $r$  que logra este producto Strehl máximo.

40 De hecho, puede definirse una pérdida total por aberración, siendo:

$$L_A = -10 \log_{10} \left[ \max_{r \in \mathbb{R}^3} (S(r, \lambda_D) \times S(r, \lambda_F)) \right] \text{dB} \quad \text{Ecuación 14}$$

45 y también una pérdida de aberración cromática:

$$L_C = -10 \log_{10} \left[ \frac{\max_{r \in \mathbb{R}^3} (S(r, \lambda_D) \times S(r, \lambda_F))}{\max_{r \in \mathbb{R}^3} (S(r, \lambda_D)) \times \max_{r \in \mathbb{R}^3} (S(r, \lambda_F))} \right] \text{dB} \quad \text{Ecuación 15}$$

que es la relación entre el producto Strehl óptimo y el producto óptimo de Strehl. La posible pérdida por aberración:

$$L_P = -10 \log_{10} \left[ \max_{r \in \mathbb{R}^3} (S(r, \lambda_D)) \times \max_{r \in \mathbb{R}^3} (S(r, \lambda_F)) \right] \text{dB} \quad \text{Ecuación 16}$$

55 60 es la pérdida de aberración que podría lograrse si no hubiera un desplazamiento cromático en el sistema. Si no hay desplazamiento cromático, el producto Strehls óptimo es el mismo que el producto óptimo de Strehl y el foco del sistema confocal, así como los focos en las dos longitudes de onda separadas, son el mismo punto. En general, la pérdida total es siempre mayor que la pérdida posible y:

65  $L_A = L_C + L_P \text{ con } L_C \geq 0 \quad \text{Ecuación 17}$

Cabe señalar que este experimento mental se usa para definir la superficie focal como el lugar de todos los puntos de producto de relación Strehl mínimos que corresponden a todas las posibles posiciones de formación de imágenes, que cambian a medida que se escanea el punto de iluminación en la superficie de formación de imágenes.

- 5 Para un sistema de muchos fotones, se usa la idea anterior, pero la relación Strehl se eleva a la potencia del orden del proceso de fluorescencia de fotones para la longitud de onda de excitación (*es decir, se eleva a la potencia N*). La relación Strehl de longitud de onda de fluorescencia se reemplaza por la unidad si el sistema es de espectro amplio (*es decir, si  $\alpha = 0$* ). Así, por ejemplo, para formación de imágenes de dos fotones de espectro estrecho:

$$10 \quad L_A = -10 \log_{10} \left[ \max_{\mathbf{r} \in \mathbb{R}^3} (\mathcal{S}(\mathbf{r}, \lambda_D)^2 \times \mathcal{S}(\mathbf{r}, \lambda_F)) \right] \text{dB}$$

$$15 \quad L_C = -10 \log_{10} \left[ \frac{\max_{\mathbf{r} \in \mathbb{R}^3} (\mathcal{S}(\mathbf{r}, \lambda_D)^2 \times \mathcal{S}(\mathbf{r}, \lambda_F))}{\max_{\mathbf{r} \in \mathbb{R}^3} (\mathcal{S}(\mathbf{r}, \lambda_D)^2) \times \max_{\mathbf{r} \in \mathbb{R}^3} (\mathcal{S}(\mathbf{r}, \lambda_F))} \right] \text{dB}$$

$$20 \quad L_P = -10 \log_{10} \left[ \max_{\mathbf{r} \in \mathbb{R}^3} (\mathcal{S}(\mathbf{r}, \lambda_D)^2) \times \max_{\mathbf{r} \in \mathbb{R}^3} (\mathcal{S}(\mathbf{r}, \lambda_F)) \right] \text{dB} \quad \text{Ecuación 18}$$

## Apéndice 2: Definición General de la Apertura Numérica de un Campo Electromagnético de Enfoque

25 En este documento, se ha usado la siguiente definición para la apertura numérica de un campo óptico de enfoque. Se basa en la idea de la definición de Petermann II del radio del punto del plano focal, que es un método probado para medir el radio de un campo propio de fibra de modo simple, solo mediante el uso de mediciones de intensidad de campo lejano.

30 La Figura 40 es una vista de un cono de luz irradiado desde un foco 290 con un eje óptico 292 y proyectando un patrón de intensidad de campo lejano en una capa esférica de radio  $R$  (lo suficientemente grande como para que el campo electromagnético haya alcanzado el comportamiento de campo lejano en este radio desde el foco) centrado en el foco. Las coordenadas de la capa de campo lejano son coordenadas polares esféricas modificadas: el ángulo longitudinal  $\phi$  y el radio óptico normalizado  $\rho$ , que, en el vacío, es el seno del ángulo latitudinal  $\theta$  que se realiza por un rayo que une el punto en cuestión con el foco y el eje óptico. Si el foco está en un material de índice de refracción  $n$ , entonces:

$$\rho = n \sin \theta \quad \text{Ecuación 19}$$

40 El radio físico en un sistema de coordenadas polares cilíndrico convencional diverge hasta el infinito cuando el radio normalizado se acerca al índice de refracción del medio (*es decir, se acerca a la unidad en el vacío*).

45 Dadas estas definiciones, la Apertura Numérica de Petermann II es:

$$NA_{\text{Petermann II}} = \sqrt{2} \sqrt{\frac{\int_0^n \int_0^{2\pi} I(\rho, \phi) d\phi \rho^3 d\rho}{\int_0^n \int_0^{2\pi} I(\rho, \phi) d\phi \rho d\rho}} \quad \text{Ecuación 20}$$

50 donde  $I(\rho, \phi)$  es la intensidad del campo lejano, *es decir, el flujo de potencia a través del área unitaria en cada punto de la capa esférica, en función de las coordenadas modificadas*.

55 Esta definición requiere que el centroide de la distribución de intensidad se encuentre sobre el eje óptico. Si no es así, se debe calcular el vector de posición del centroide y realinear los ejes de coordenadas para que el eje óptico pase a través del centroide.

Esta definición de apertura numérica tiene las siguientes propiedades:

- 60 i) Se reduce a la definición deseada de la apertura numérica, *es decir, el seno de la mitad del ángulo del cono de iluminación cuando los campos son no apodizados, es decir, cuando la capa esférica se ilumina uniformemente dentro de la apertura clara; y*
- ii) Cumple una desigualdad de Heisenberg, *es decir,*

$$r_2 \text{NA}_{\text{Petermann II}} \geq \frac{\lambda}{\sqrt{2}\pi}$$

Ecuación 21

- 5 En la desigualdad,  $r_2$  es el radio de giro alrededor del eje óptico de la función de dispersión de punto de intensidad, *es decir:*

$$r_2 = \sqrt{\frac{\int_F r^2 I dA}{\int_F I dA}}$$

Ecuación 22

10 donde  $I$  es la intensidad del plano focal,  $r$  la distancia desde el eje óptico 292 y la integral de la superficie se realiza sobre todo el plano focal  $F$ ). La igualdad se mantiene si y solo si:

- 15 i) La función de dispersión de punto (y por lo tanto la distribución de campo lejano) es gaussiana con fase cero (correspondiente a la aberración cero para un campo enfocado en el espacio libre); y
- 20 ii) El tamaño del punto gaussiano es independiente de la dirección, *es decir*, las distribuciones del campo son radialmente simétricas (independientes del ángulo azimutal).

Por tanto, el radio de Petermann II mide la resolución lateral *possible* de un campo pupilar de salida cuando no hay aberración. Las propiedades anteriores hacen una excelente caracterización del poder de resolución posible de un sistema apodizado y la nueva definición se reduce a la normal en condiciones no apodizadas y, por lo tanto, esta es la definición que se usa exclusivamente por Optiscan.

30 Para puntos focales gaussianos, *es decir*, aquellos en los que la amplitud del campo es proporcional a  $\exp(-r^2/(2\sigma^2))$  el radio de giro es  $\sigma$  y el diámetro del campo modal es  $2\sqrt{2}\sigma \approx 2,8\sigma$ . Si dos haces gaussianos del mismo tamaño de punto y potencia se espacian a distancias variables, la intensidad del haz en función del desplazamiento lateral  $x$  desde su punto medio a lo largo de la línea que une los dos focos puntuales es como se muestra en la Figura 41, que indica la resolubilidad de dos puntos gaussianos trazando la intensidad normalizada contra el desplazamiento lateral normalizado para diferentes separaciones de puntos en términos de un  $\times \sigma$ . Los valores de  $a$  se indican en la Figura y corresponden a las curvas de intensidad en secuencia de arriba a abajo (de manera que la curva más alta en la Figura corresponde a  $a = 2,82$  y la curva más baja a  $a = 2$ ).

35 El desplazamiento en el eje horizontal se normaliza de modo que  $\sigma = 1$ . El eje vertical se normaliza de modo que la intensidad en el punto medio entre los focos  $x = 0$  sea la unidad. Cuando los puntos son  $1\sigma$  de separación, no hay caída de intensidad entre los puntos y están no resueltos. Sin embargo, el contraste entre la caída mínima y la intensidad máxima aumenta rápidamente con distancias de separación superiores a  $1\sigma$  de separación. El criterio de Rayleigh para los campos no apodizados corresponde a un contraste del 26,3 % entre el brillo de caída y el brillo máximo. Para los campos Gaussianos, la Figura 41 muestra que este contraste se logra en aproximadamente  $2,5\sigma$ , o de la Ecuación 21, cuando la separación es  $0,56 \lambda/\text{NA}$ . Esto está notablemente cerca de la resolución de Rayleigh para campos no apodizados, siendo  $0,61 \lambda/\text{NA}$ . Por tanto, parecería razonable usar  $2\sqrt{2}\sigma \approx 2,82\sigma$  como la resolución Gaussiana, ya que este es el diámetro del campo del modo Petermann II y es ampliamente conocido. Por lo tanto, la resolución de campo claro para haces Gaussianos según esta definición es:

$$\Delta x \geq \frac{2\lambda}{\pi \text{NA}_{\text{Petermann II}}}$$

Ecuación 23

- 50 La función de dispersión de punto confocal de  $N$ -fotones es el producto de la función de dispersión de punto de longitud de onda de excitación en potencia de  $N$  y la función de dispersión de punto de fluorescencia. Por lo tanto, en el caso del haz de Gauss, la función de dispersión de punto confocal también es gaussiana, y el tamaño del punto es el recíproco de las sumas de todos los tamaños de punto recíprocos para los haces constituyentes (ya que los exponentes en las funciones de Gauss se suman). Por tanto, la resolución confocal de un sistema perfectamente corregido cromáticamente es:

$$\Delta x \geq \frac{2}{\pi \text{NA}_{\text{Petermann II}}} \frac{\lambda_D \lambda_f}{\sqrt{N \lambda_f^2 + \lambda_D^2}}$$

Ecuación 24

55 Los expertos en la técnica pueden realizar fácilmente modificaciones dentro del alcance de la invención. Por lo tanto, debe entenderse que esta invención no se limita a las modalidades particulares descritas a modo de ejemplo anteriormente.

- 60 65 En las reivindicaciones que siguen y en la descripción anterior de la invención, excepto cuando el contexto lo requiera

de otra manera debido al lenguaje expreso o implicación necesaria, las palabras "comprenden" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" se usan en un sentido inclusivo, es decir, para especificar la presencia de las características indicadas, pero no para descartar la presencia o adición de características adicionales en diferentes modalidades de la invención.

- 5 Además, cualquier referencia en la presente descripción a la técnica anterior no pretende implicar que dicha técnica anterior forme o forma parte del conocimiento general común en cualquier país.

## REIVINDICACIONES

1. Un grupo de lentes (14, 90) para un endoscopio o microscopio, que comprende:
  - 5 uno o más elementos de lente (18, 30; 62, 64; 72, 74; 82, 84; 102, 108; 142, 144), cada uno de índice de refracción uniforme, adaptado para:
    - i) enfocar, con corrección de la aberración de frente de onda alta, la luz de activación o excitación que se recibe desde una punta de salida de una guía de ondas óptica (12) ubicada sustancialmente contra una superficie proximal del grupo de lentes hasta un campo de observación puntual con función de dispersión de punto estrecho más allá de una superficie distal del grupo de lentes (14, 90); y
    - 10 ii) transmitir, con una corrección de la aberración de frente de onda alta, la fluorescencia o la luz de retorno reflejada que se recibe por la superficie distal desde el campo de observación puntual de vuelta a la punta de salida de la guía de ondas óptica (12) en la longitud de onda de fluorescencia,
  - 15 en donde el grupo de lentes (14, 90), cuando está en uso, se acopla a la punta distal (16) de la guía de ondas óptica (12).
2. Un grupo de lentes (14, 90) de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la luz de retorno de fluorescencia y la luz de activación o excitación tienen la misma longitud de onda.
3. Un grupo de lentes (14, 90) de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:
  - 25 i) un elemento óptico difractivo ubicado en la superficie distal y que constituye la misma; o
  - ii) un elemento óptico difractivo ubicado en la superficie distal y que constituye la misma, en donde el grupo de lentes (14, 90) comprende una varilla de cristal sin enfoque, en donde el elemento difractivo proporciona el enfoque.
4. Un grupo de lentes (14, 90) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el grupo de lentes (14, 90) tiene un desplazamiento cromático que está altamente corregido de manera que:
  - 30 i) el grupo de lentes (14, 90) enfoca la luz de fluorescencia que se recibe desde la punta de salida de la guía de ondas óptica (12) al campo de observación puntual dentro de un pequeño margen de error; y/o
  - ii) un paquete de ondas de luz de entrada con ancho de pulso de menos de un picosegundo y centrado en 35 una longitud de onda de la luz de activación solo se ensancha ligeramente en ancho de pulso cuando pasa a través del grupo de lentes (14, 90).
5. Un grupo de lentes (14, 90) de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el grupo de lentes (14, 90) tiene un desplazamiento cromático que está altamente corregido de manera que el grupo de lentes (14, 90) enfoca la luz fluorescente que se recibe de la punta de salida de la guía de ondas óptica (12) al campo de observación puntual dentro de un pequeño margen de error, el grupo de lentes (14, 90) que tiene criterios de corrección de resolución y aberración tales que:
  - 40 a) la apertura numérica de la luz enfocada por el grupo de lentes (14, 90) es (i) 0,15 o mayor cuando el grupo de lentes (14, 90) recibe luz de la guía de ondas óptica (12) a una longitud de onda de luz de activación nominal, y (ii) 0,15 o mayor que una longitud de onda de emisión de fluorescencia máxima; y
  - b) el producto de la primera y la segunda relación Strehl correspondiente medida en el campo de 45 observación puntual es mayor o igual a 0,5 o el producto de Strehl generalizado:
- 60 
$$\max_{\mathbf{r} \in \mathbb{R}^3} (\mathcal{S}(\mathbf{r}, \lambda_D)^N \times \mathcal{S}(\mathbf{r}, \lambda_F)^\alpha)$$
- 55 es mayor o igual a 0,5, la definición que sea aplicable a un modo de formación de imágenes de fluorescencia.
6. Un grupo de lentes (14, 90) de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:
  - 60 i) el grupo de lentes (14, 90) tiene un desplazamiento cromático que está altamente corregido, de manera que un paquete de onda de luz de entrada con ancho de pulso de menos de un picosegundo y centrado a una longitud de onda de la luz de activación solo se ensancha ligeramente en el ancho de pulso cuando pasa a través del grupo de lentes (14, 90), el grupo de lentes (14, 90) que tiene criterios de ensanchamiento de pulso definidos de manera que un paquete de ondas de luz de entrada centrado en una longitud de onda de activación nominal y de veinte femtosegundos de duración se ensanche a un paquete de ondas de igual longitud de onda central y de menos de cien

- femtosegundos de duración mediante una contribución de rutas múltiples del grupo de lentes (14, 90); o
- ii) el grupo de lentes (14, 90) comprende un tipo de cristal, en donde el grupo de lentes (14, 90) comprende una cantidad de cristal tal que los campos de ondas transmitidos tienen un tiempo de transmisión insuficiente para dispersarse en un grado que produciría una relación Strehl menor que 0,5, por lo que el grupo de lentes (14, 90) se adapta para pares de longitudes de onda de activación/fluorescencia estrechamente separadas.
7. Un grupo de lentes (14, 90) de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el grupo de lentes (14, 90) comprende:
- (i) dos cristales diferentes en el grupo de lentes (14, 90), una interfaz esférica entre los dos cristales diferentes, y una superficie distal que es asférica, por lo que el grupo de lentes (14, 90) se adapta para pares de longitudes de onda de activación/fluorescencia en un espectro de luz visible ampliado de longitud de onda de 450 nm a 850 nm; o
- (ii) una pluralidad de cristales de más de un tipo, en donde el grupo de lentes (14, 90) tiene una dispersión que se cancela mutuamente y el grupo de lentes (14, 90) se adapta para su uso con cualquier par de longitudes de onda de activación/fluorescencia en el rango de longitud de onda del espectro de luz visible ampliado de 450 nm a 850 nm.
8. Un grupo de lentes (14, 90) de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una varilla cilíndrica homogénea y una rejilla de difracción unida al extremo distal de la misma, en donde:
- i) la rejilla enfoca la luz de activación al campo de observación puntual y guía la luz de retorno desde el campo de observación puntual hacia la punta de salida de la guía de ondas óptica (12); o
- ii) la rejilla enfoca la luz de activación al campo de observación puntual, la rejilla guía la luz de retorno hacia la punta de salida de la guía de ondas óptica, una primera porción de la rejilla se configura para enfocar la luz de activación y una segunda porción se configura para recolectar la luz de retorno.
9. Un grupo de lentes (14, 90) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende una pluralidad de elementos de lentes (18, 30; 62, 64; 72, 74; 82, 84; 102, 108; 142, 144) pegados o unidos de otro modo después de la fabricación.
10. Un sistema óptico (10), que comprende un grupo de lentes (14, 90) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Un sistema óptico (10) de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende la guía de ondas óptica (12).
12. Un sistema óptico (10) de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende además un soporte en voladizo (22) que se configura para sujetar la guía de ondas óptica (12), un imán (24) que se monta en la guía de ondas óptica (12) y:
- i) un sistema de activación para hacer que el imán (24) vibre en dos planos de manera que la superficie distal del grupo de lentes (14, 90) se escanea a alta velocidad para crear una imagen de campo de visión amplio a partir de la luz de retorno; o
- ii) un sistema de activación para hacer vibrar el imán (24) en dos planos de manera que la superficie distal del grupo de lentes (14, 90) se escanea a alta velocidad para crear una imagen de campo de visión amplio a partir de la luz de retorno, el sistema de accionamiento se configura para escanear en una primera dirección con una frecuencia de al menos 500 Hz y escanear en una segunda dirección ortogonal a la primera dirección con una frecuencia de al menos 0,5 Hz, de manera que una imagen cuyo campo de visión sea de al menos 200 µm × 200 µm puede obtenerse a partir de la luz de retorno.
13. Un sistema óptico (10) de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende además una guía de ondas óptica (12) que tiene un núcleo principal y un núcleo secundario altamente multimodal; en donde una punta de salida de la guía de ondas óptica (12) se ubica sustancialmente contra una superficie proximal del grupo de lentes (14, 90); el núcleo principal se configura para transmitir luz de activación o excitación desde una fuente de luz al grupo de lentes (14, 90); el grupo de lentes (14, 90) se configura para
- i) enfocar, con una corrección de la aberración del frente de onda alta, la luz de activación o excitación que se recibe desde la punta de salida de la guía de ondas óptica (12) a un campo de observación puntual con función de dispersión de punto estrecho más allá de una superficie distal del grupo de lentes (14, 90); y

- ii) transmitir, con una modesta corrección de la aberración, la fluorescencia desde el campo de observación puntual de vuelta a la punta de salida de la guía de ondas óptica (12) en la longitud de onda de la fluorescencia; y

5 el núcleo secundario se configura para recibir la fluorescencia.

14. Un sistema óptico (10) de acuerdo con la reivindicación 13, que tiene criterios de corrección de resolución y aberración tales que:

- 10 a) la apertura numérica de la luz enfocada es mayor o igual a 0,15 cuando la guía de ondas óptica (12) se activa a una longitud de onda de activación nominal; y  
b) la potencia del producto Strehl:

$$\max_{\mathbf{r} \in \mathbb{R}^3} S(\mathbf{r}, \lambda_D)^N$$

15 es mayor o igual a 0,5 para formaciones de imágenes de N-fotones.

20 15. Un sistema óptico (10) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en donde:

- 25 i) la guía de ondas óptica (12) comprende además uno o más núcleos auxiliares de guía de luz, de modo que la apertura numérica de la formación de imágenes puede cambiarse entre el valor principal de alta resolución y un valor bajo, posiblemente con etapas intermedias para permitir al usuario colocar la imagen fácilmente, con resolución axial gruesa y alta tolerancia a errores de ubicación e inestabilidad de la mano y luego cambiar a un modo de alta resolución una vez que se ha identificado el tejido objetivo; y/o  
30 ii) la guía de ondas óptica (12) comprende además uno o más núcleos de guía de luz auxiliares desplazados axial y lateralmente para recibir selectivamente la luz de retorno desde diferentes profundidades de formación de imágenes; y/o  
35 iii) el sistema óptico (10) comprende una ventana óptica quasi-elipsoidal con una forma de superficie que se selecciona para ser paralela a una superficie de escaneo de un vértice del grupo de lentes (14, 90), por lo que una geometría relativa del grupo de lentes (14, 90), una región ópticamente activa instantánea de la ventana óptica y el campo de observación puntual en un lado distal de la ventana óptica permanece invariable a lo largo de una porción de adquisición de imágenes de un escaneo.

35 16. Un método de alineación activa, que comprende:

40 montar una guía de ondas óptica (12) y un grupo de lentes (14, 90) como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende una pluralidad de elementos de la lente (18, 30; 62, 64; 72, 74; 82, 84; 102, 108; 142, 144) en una plantilla de alineación con una punta de salida de la guía de ondas óptica (12) sustancialmente contra una superficie proximal del grupo de lentes (14, 90);  
45 activar ópticamente la guía de ondas óptica (12); dirigir la luz de salida del grupo de lentes (14, 90) hacia un detector óptico;

45 establecer una posición y orientación relativas óptimas de aberración mínima mediante el ajuste de la posición y orientación relativas del grupo de lentes (14, 90) y la guía de ondas óptica (12); unir los elementos de la lente (18, 30; 62, 64; 72, 74; 82, 84; 102, 108; 142, 144) o ensamblarlos de otro modo en una posición y orientación relativas fijas.

50 17. Un método de evaluación de la calidad de la superficie de la lente, que comprende:

55 colocar un orificio (258) de diámetro conocido en un foco de un sistema óptico (10) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15;

activar ópticamente la guía de ondas óptica (12);

medir una potencia que se transmite a través del orificio (258);

retirar el orificio (258) y medir una potencia total de salida; y

determinar una medida de la rugosidad media cuadrática de la superficie del grupo de lentes (14) a partir de una relación entre la potencia a través del orificio (258) y la potencia total.

60 18. Un sistema de formación de imágenes de fluorescencia de espectro estrecho de uno o muchos fotones, in vivo, que comprende el sistema óptico (10) de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15.

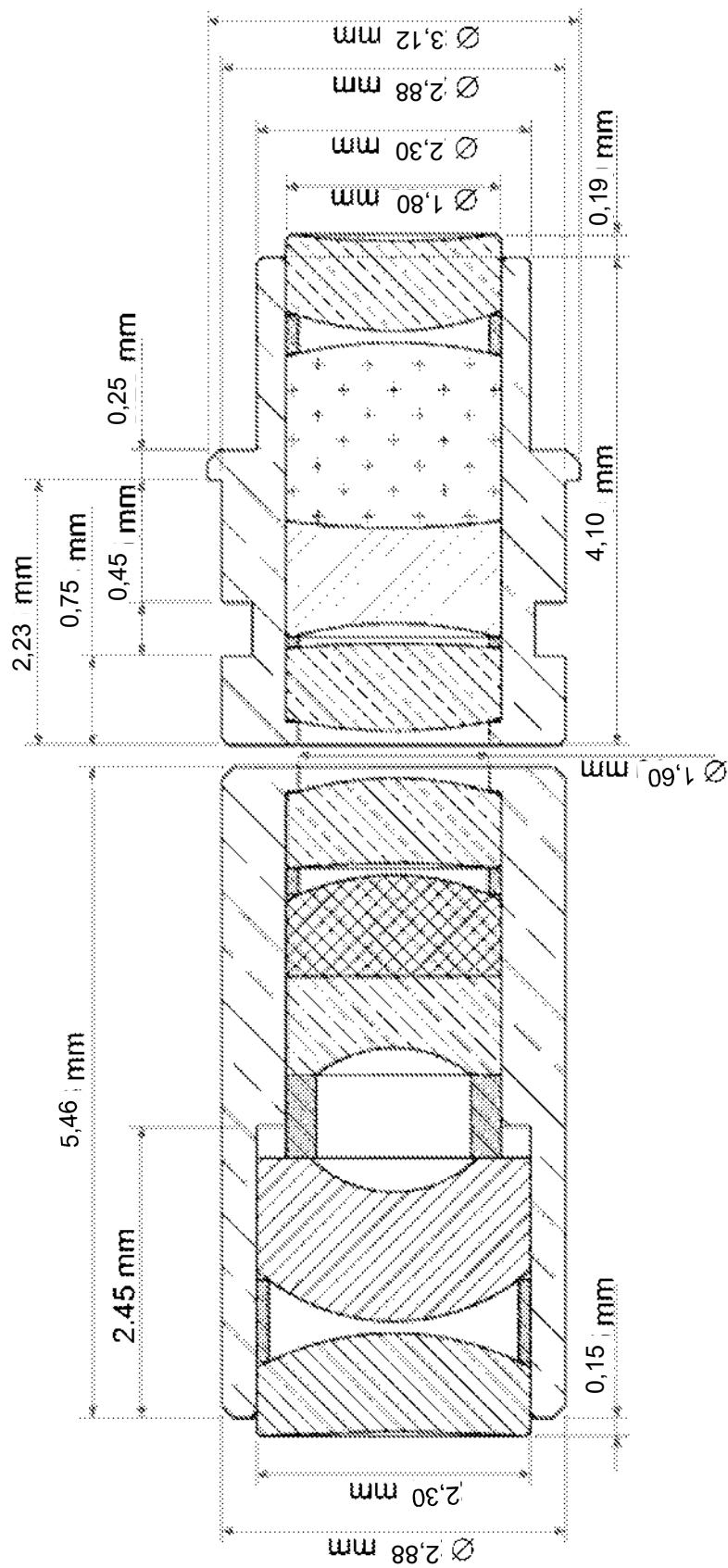


Figura 1  
(Técnica Anterior)

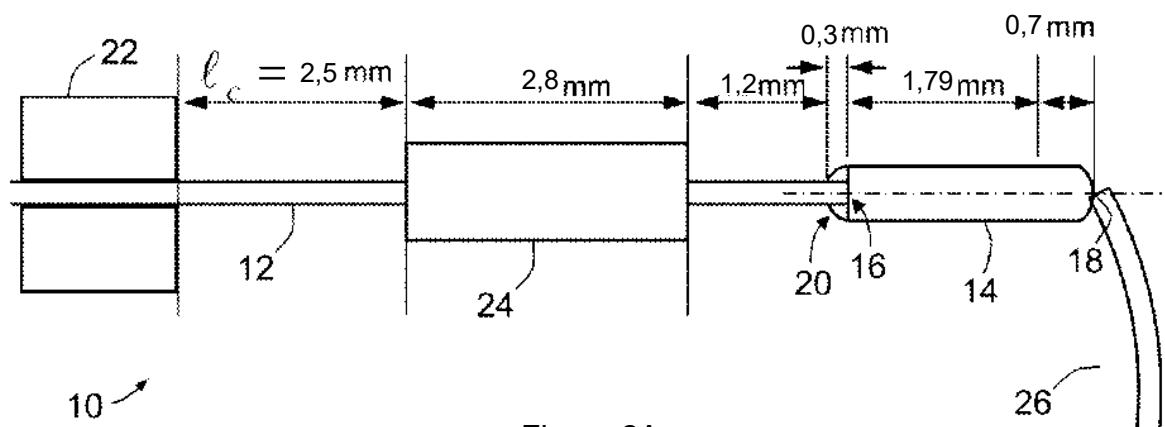


Figura 2A

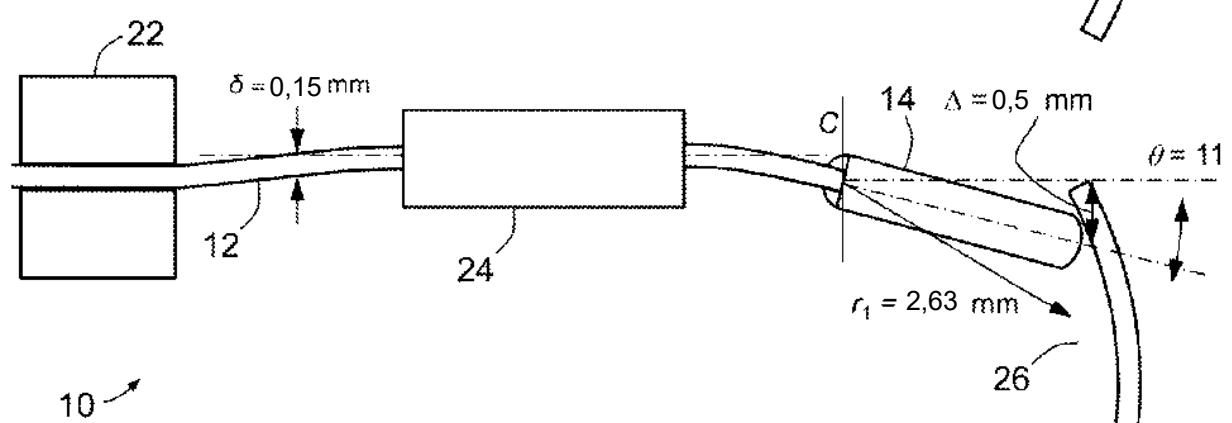


Figura 2B

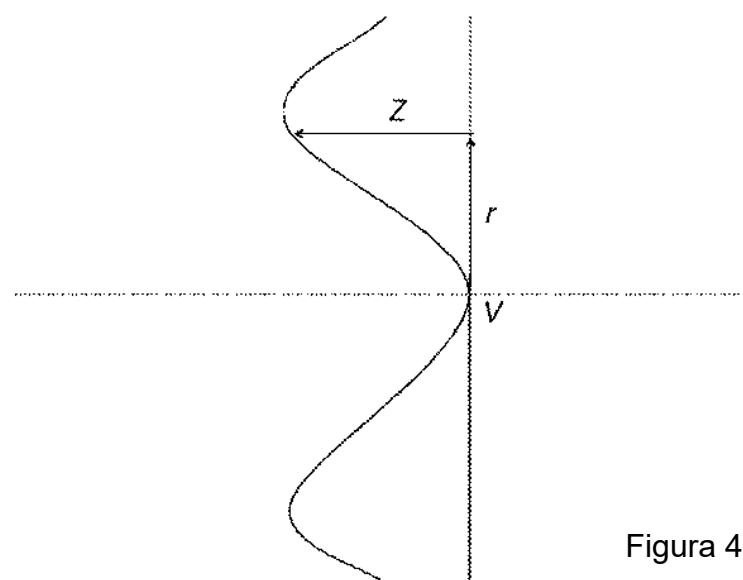


Figura 4

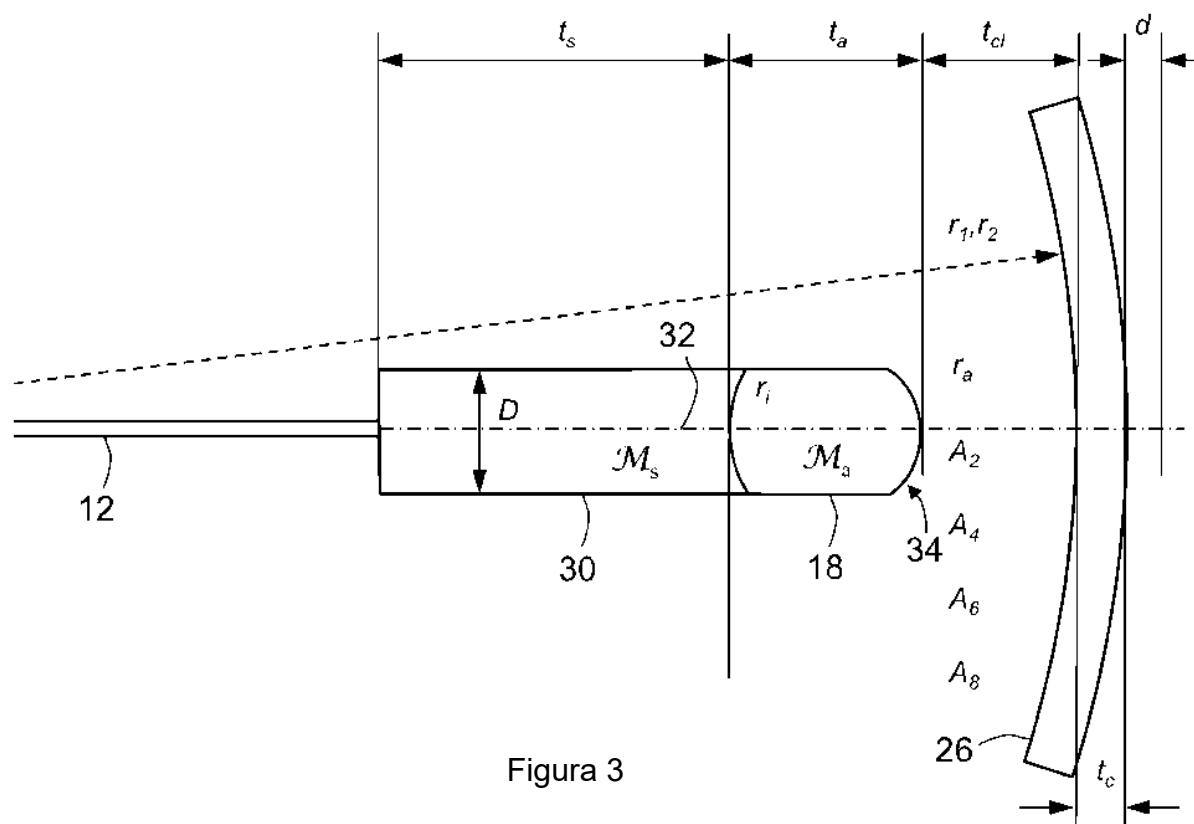


Figura 3

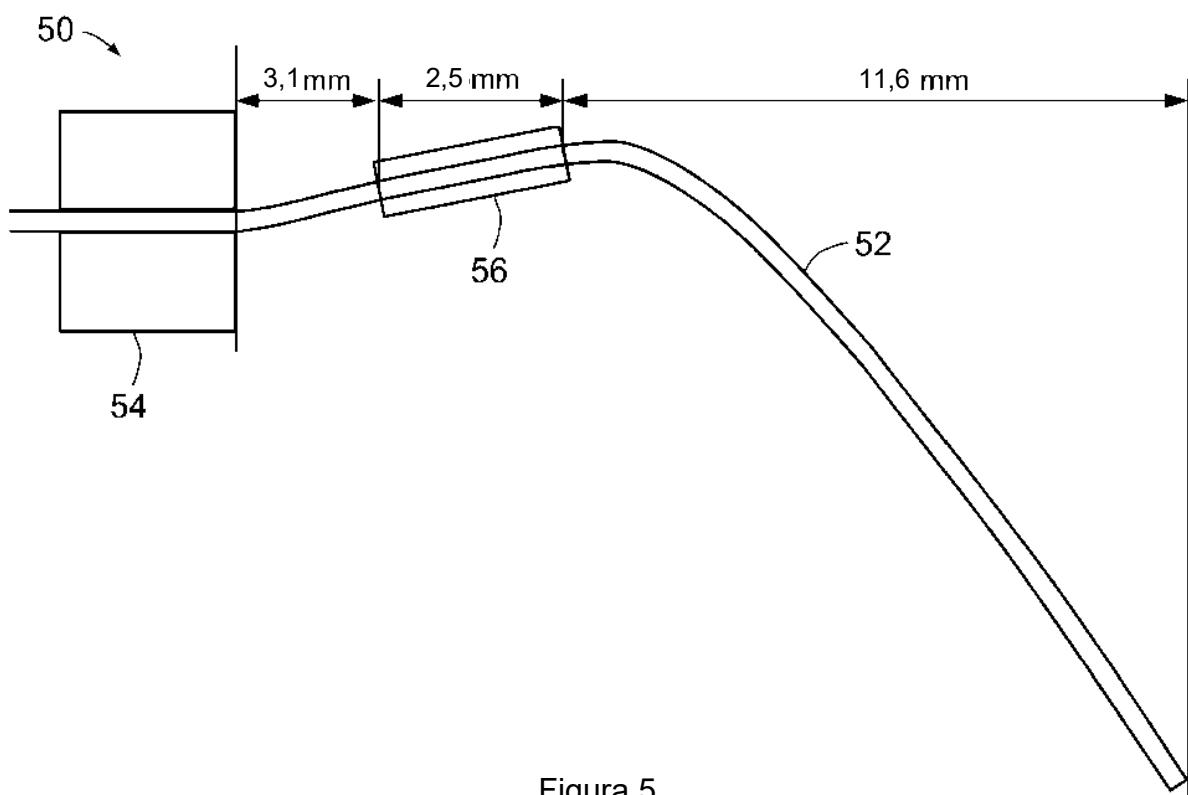


Figura 5

ES 2 829 627 T3

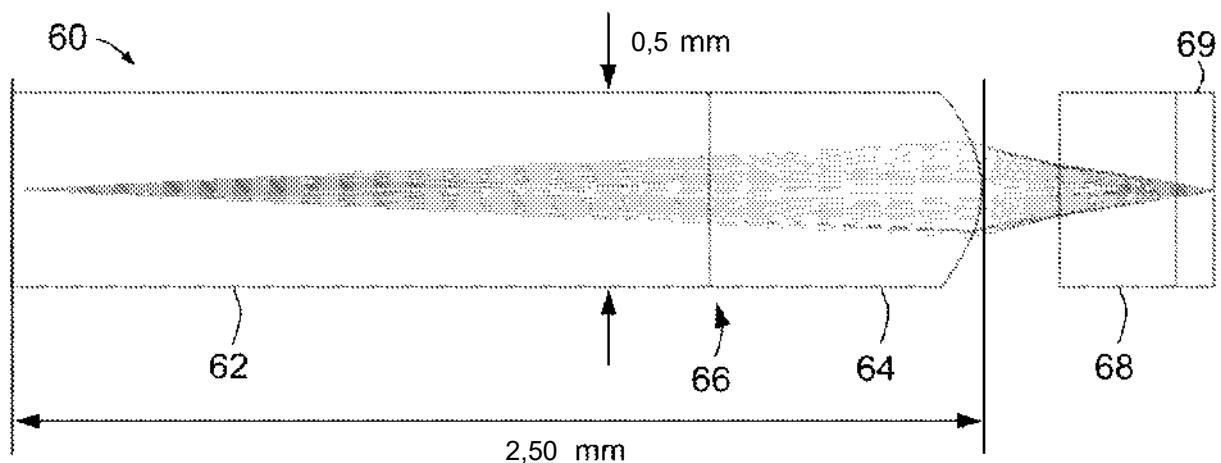


Figura 6

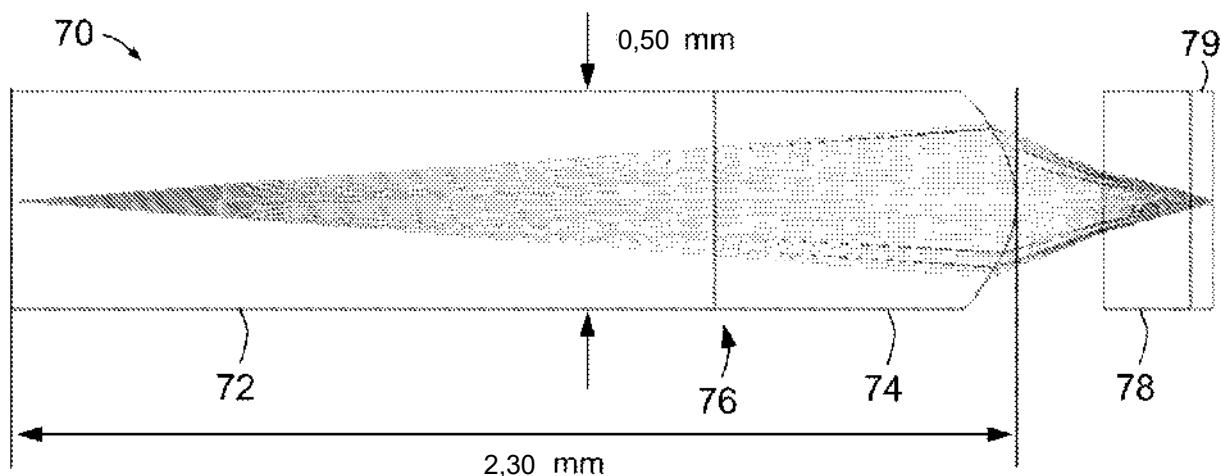


Figura 7

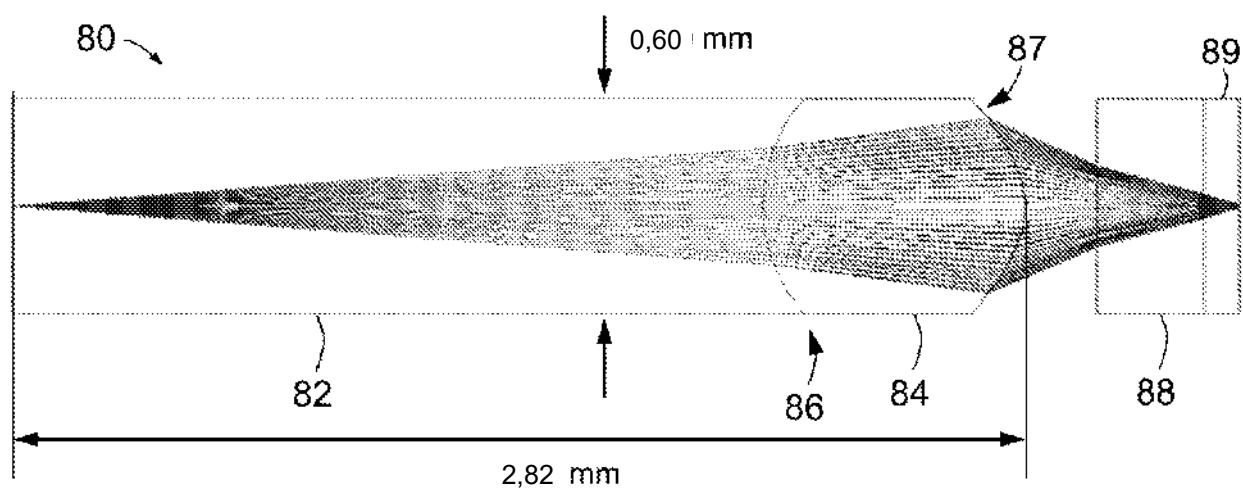


Figura 8

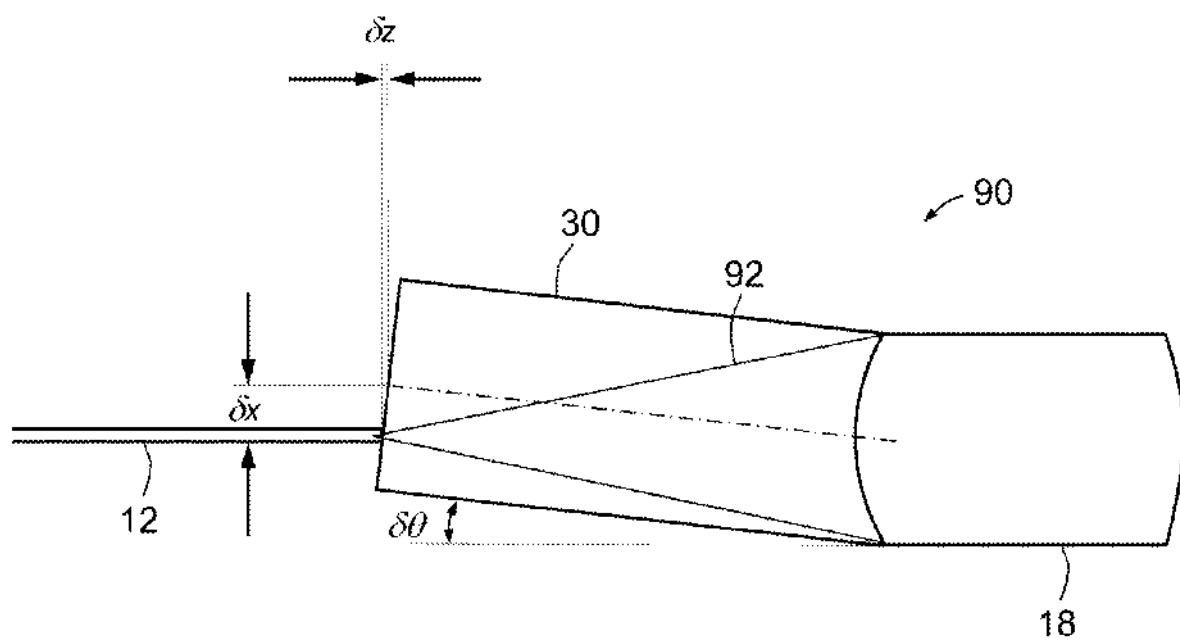


Figura 9

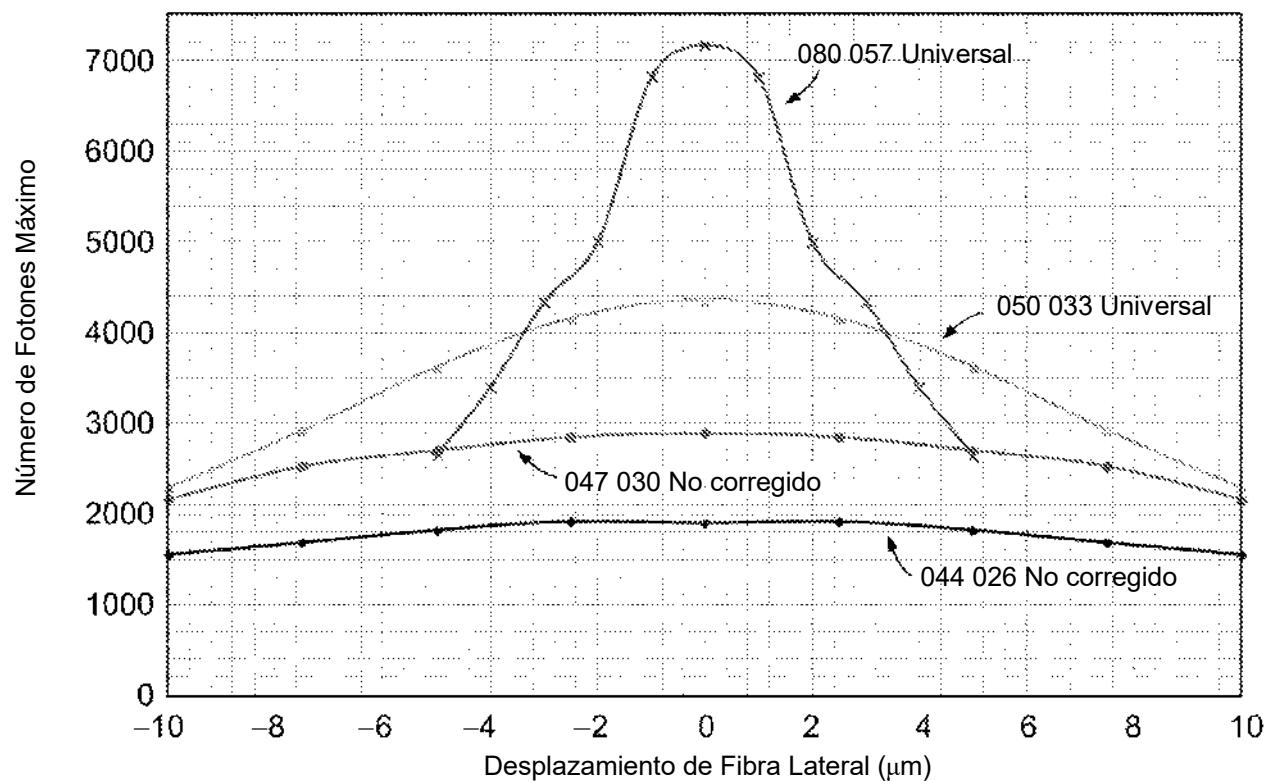


Figura 10

# ES 2 829 627 T3

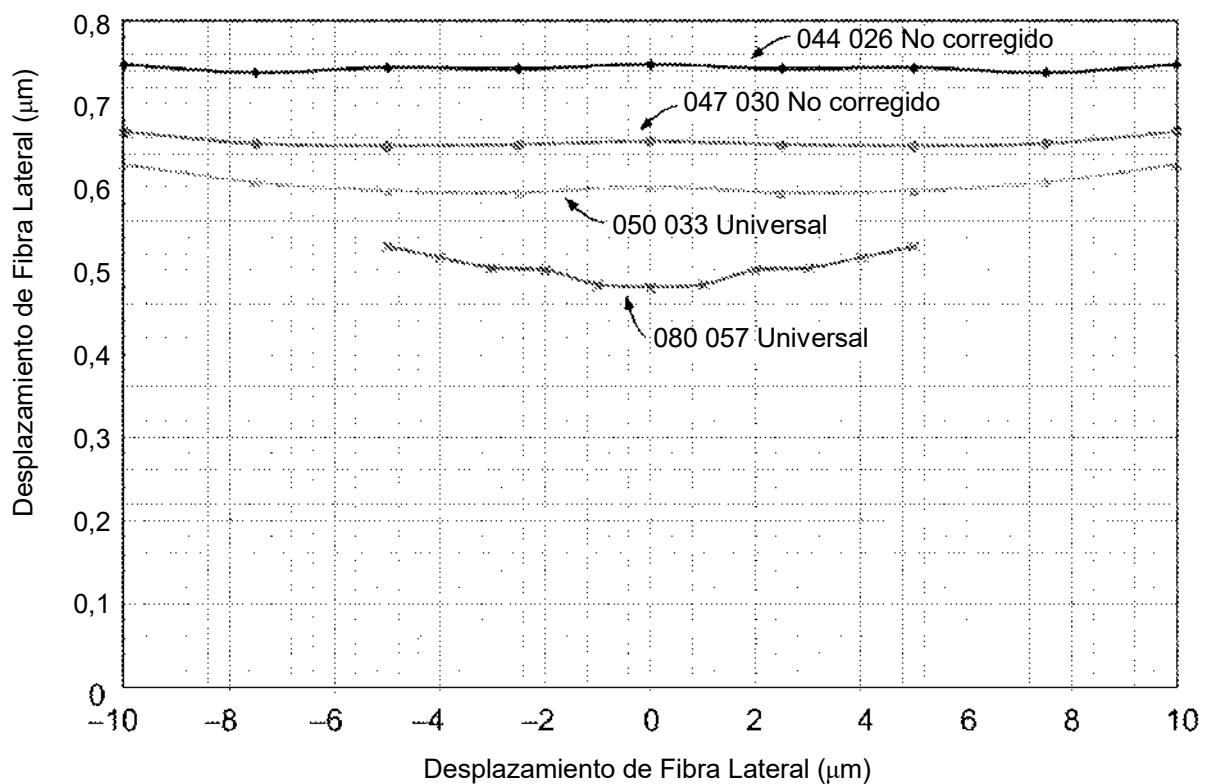


Figura 11

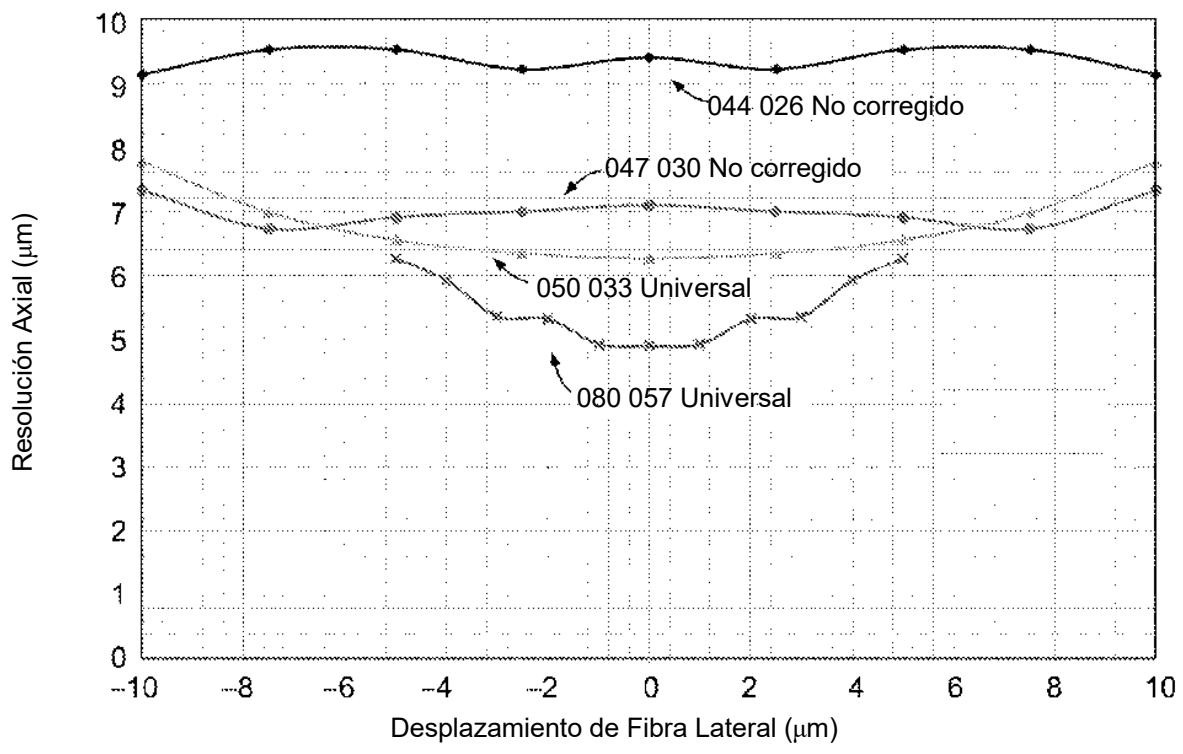


Figura 12

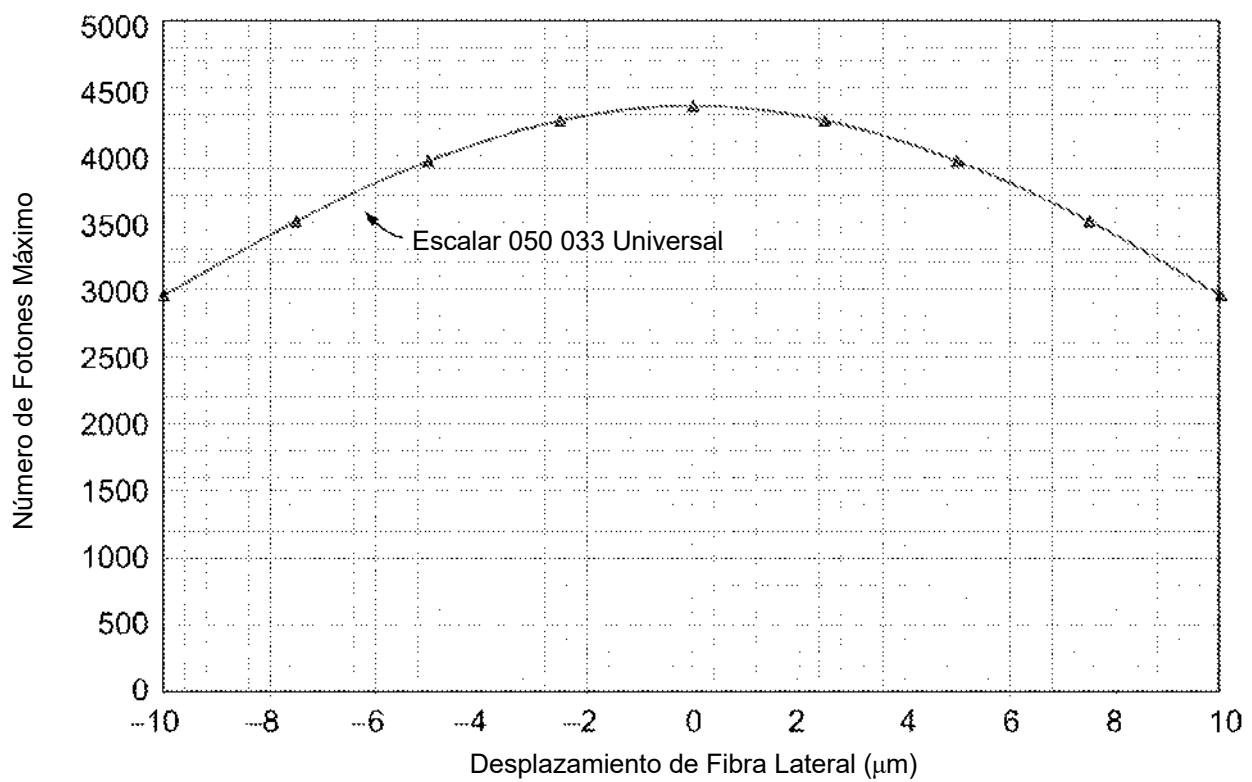


Figura 13

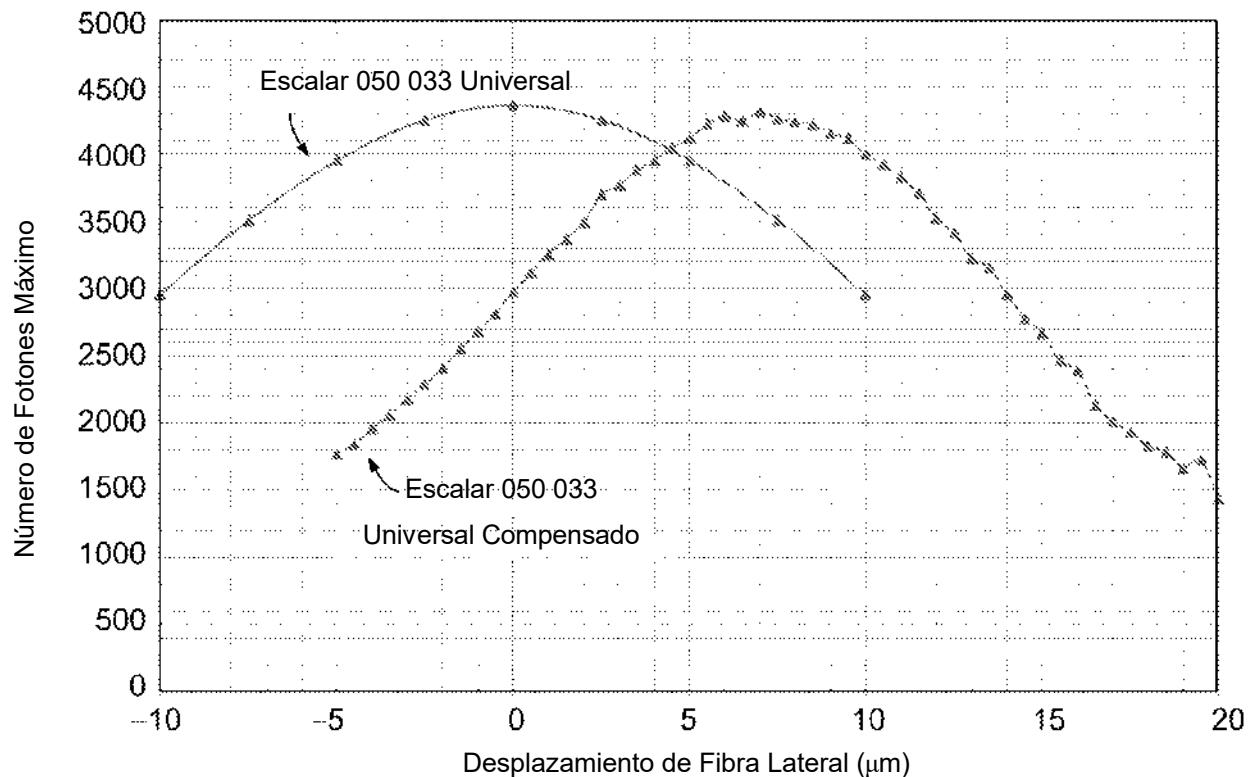


Figura 14

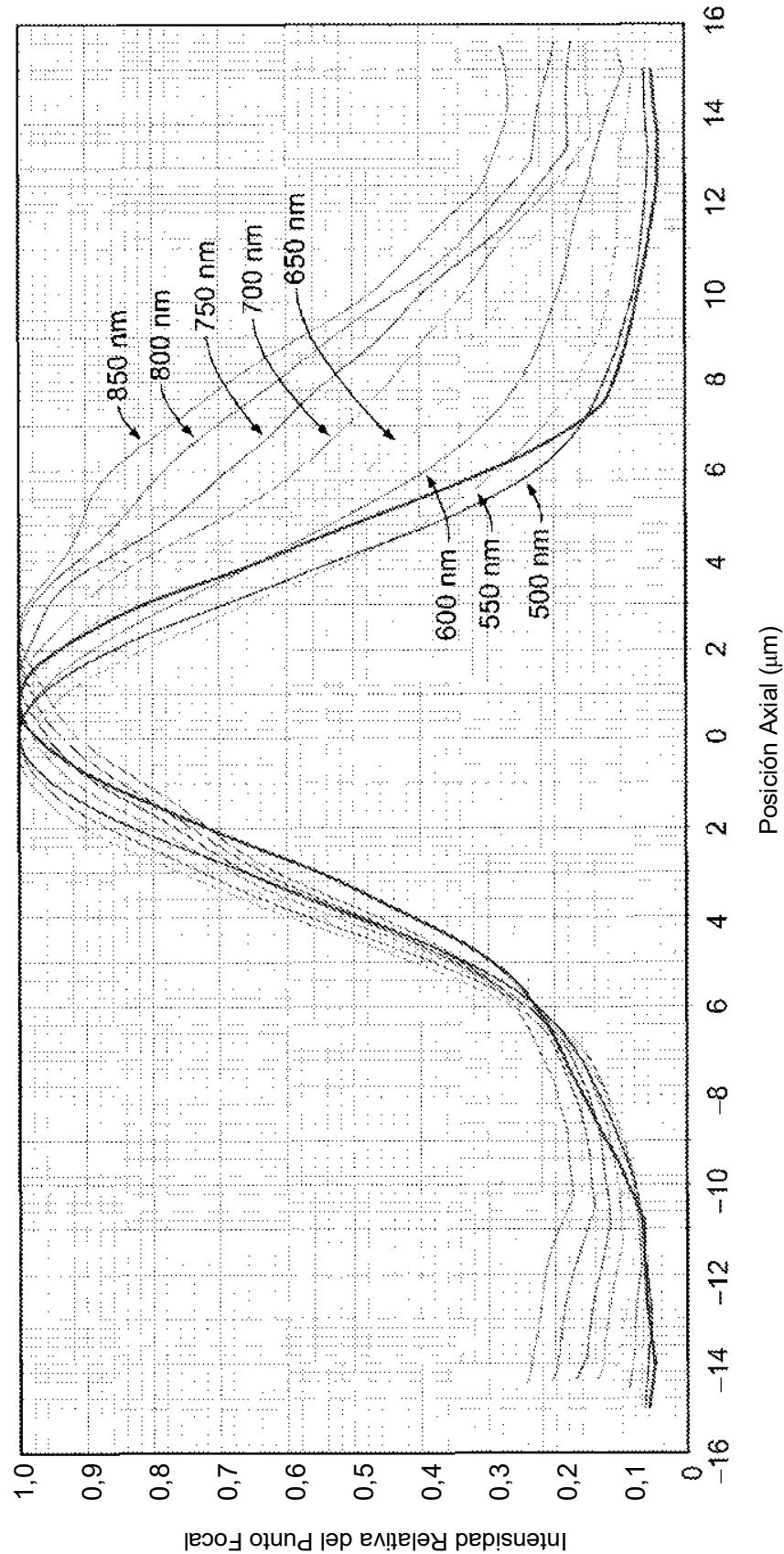


Figura 15

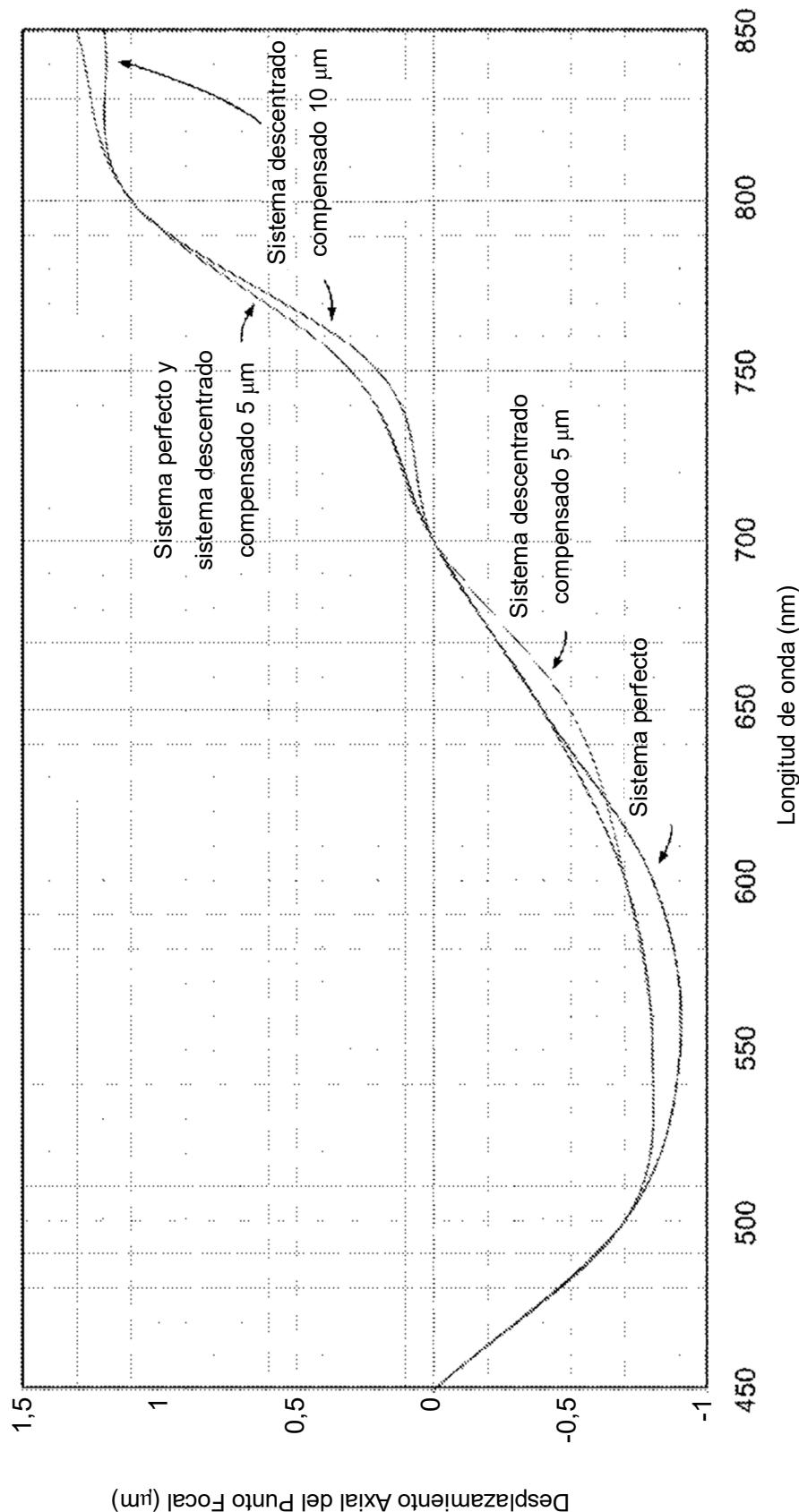


Figura 16

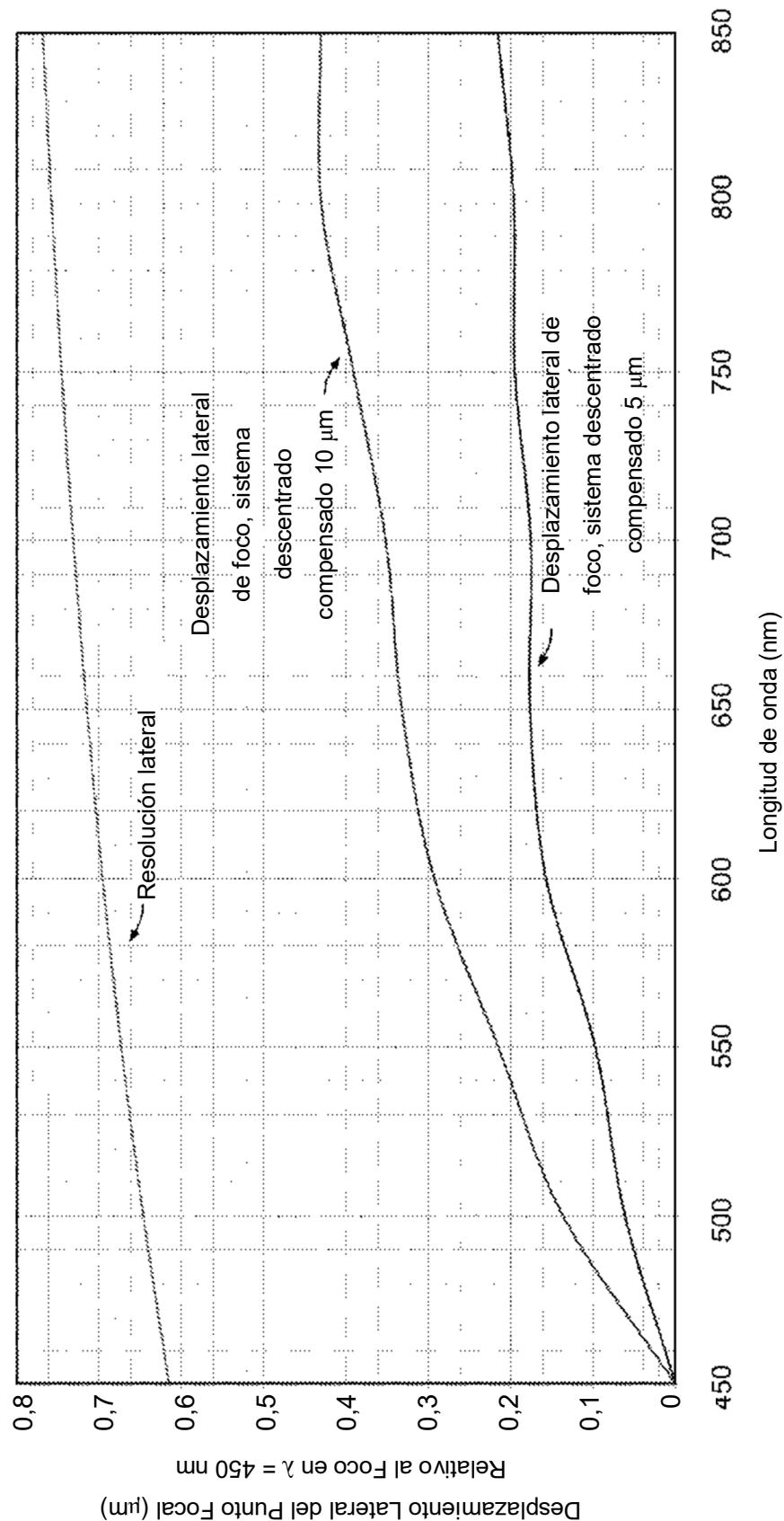


Figura 17

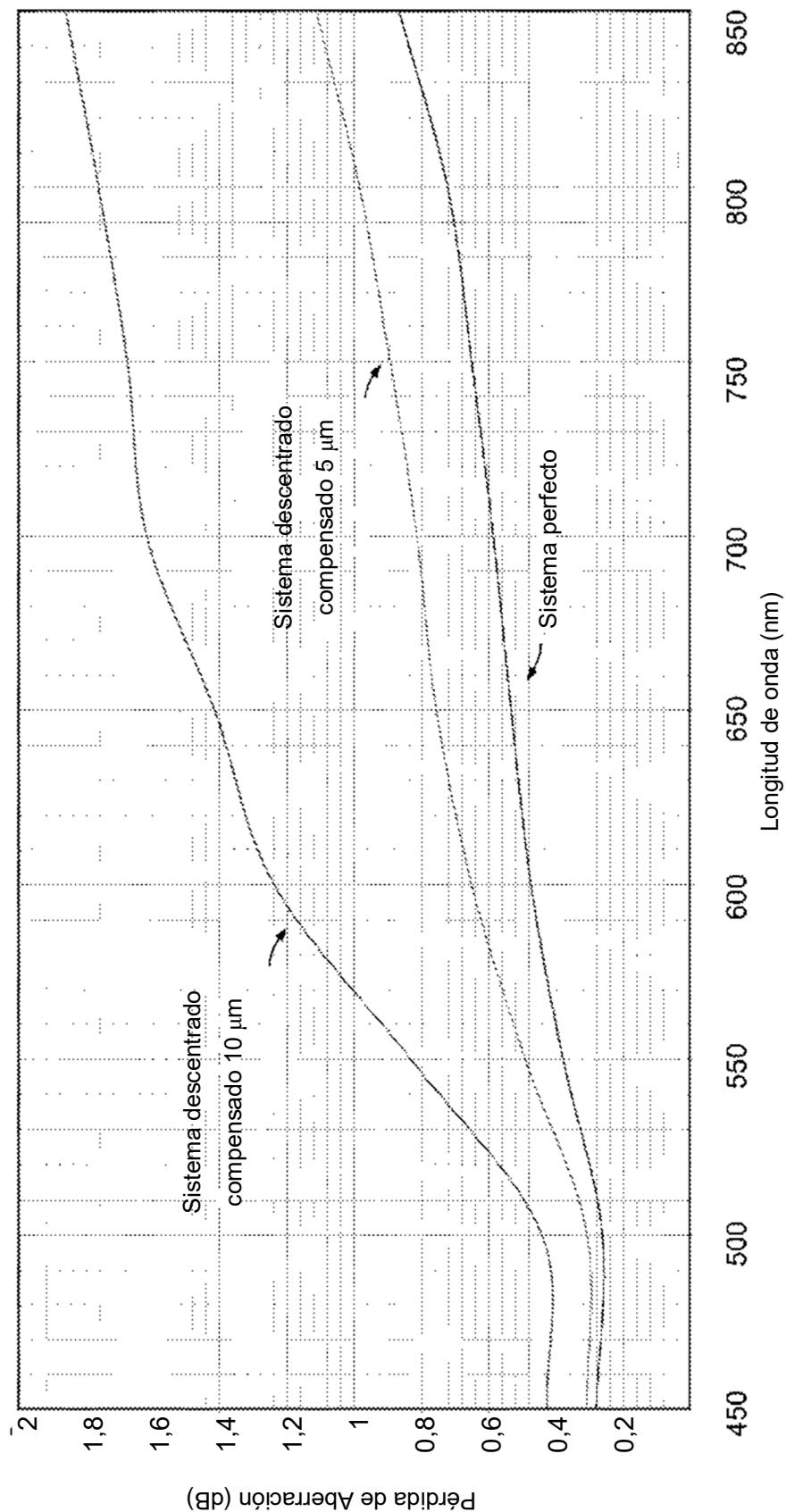


Figura 18

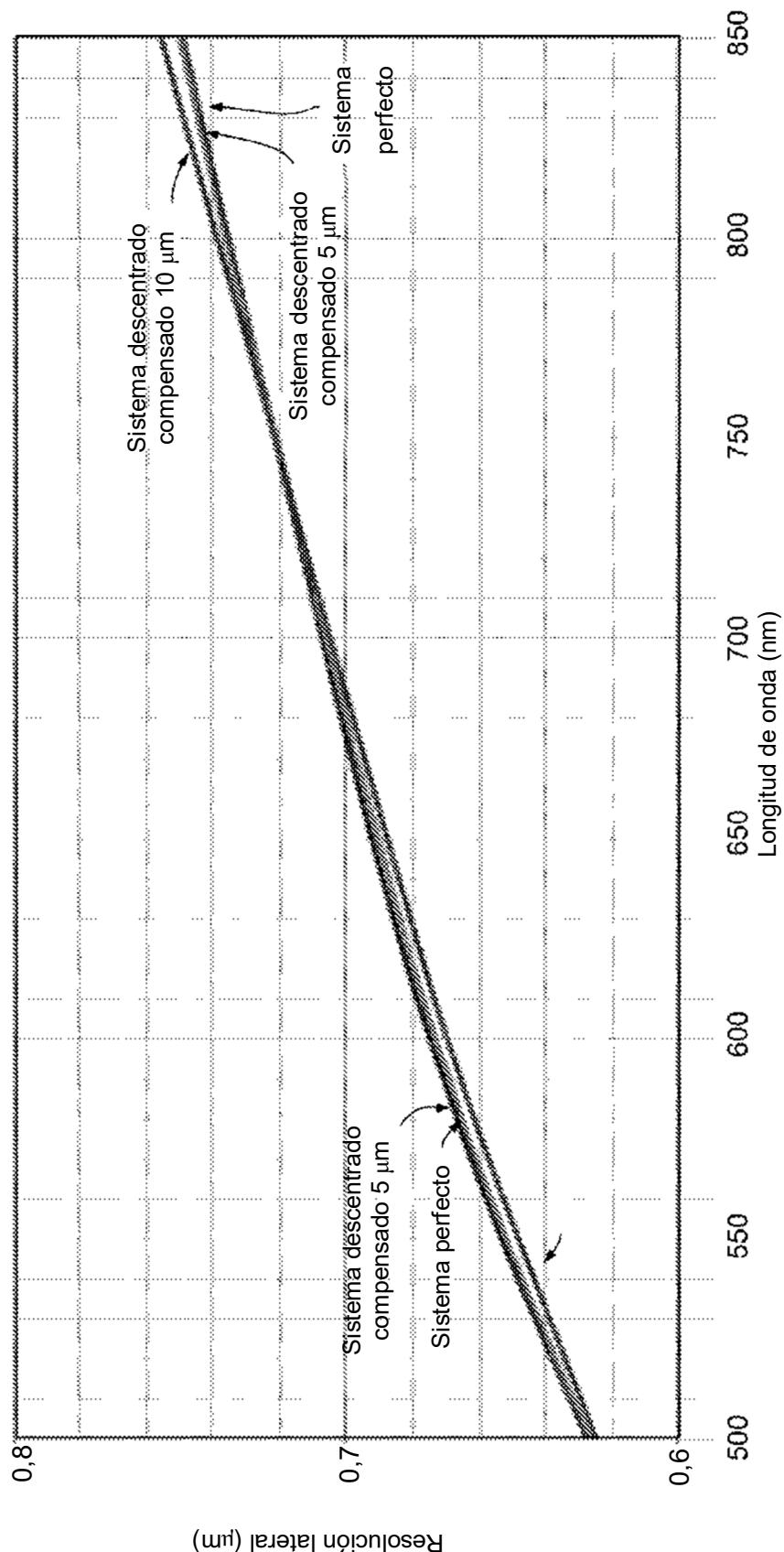


Figura 19

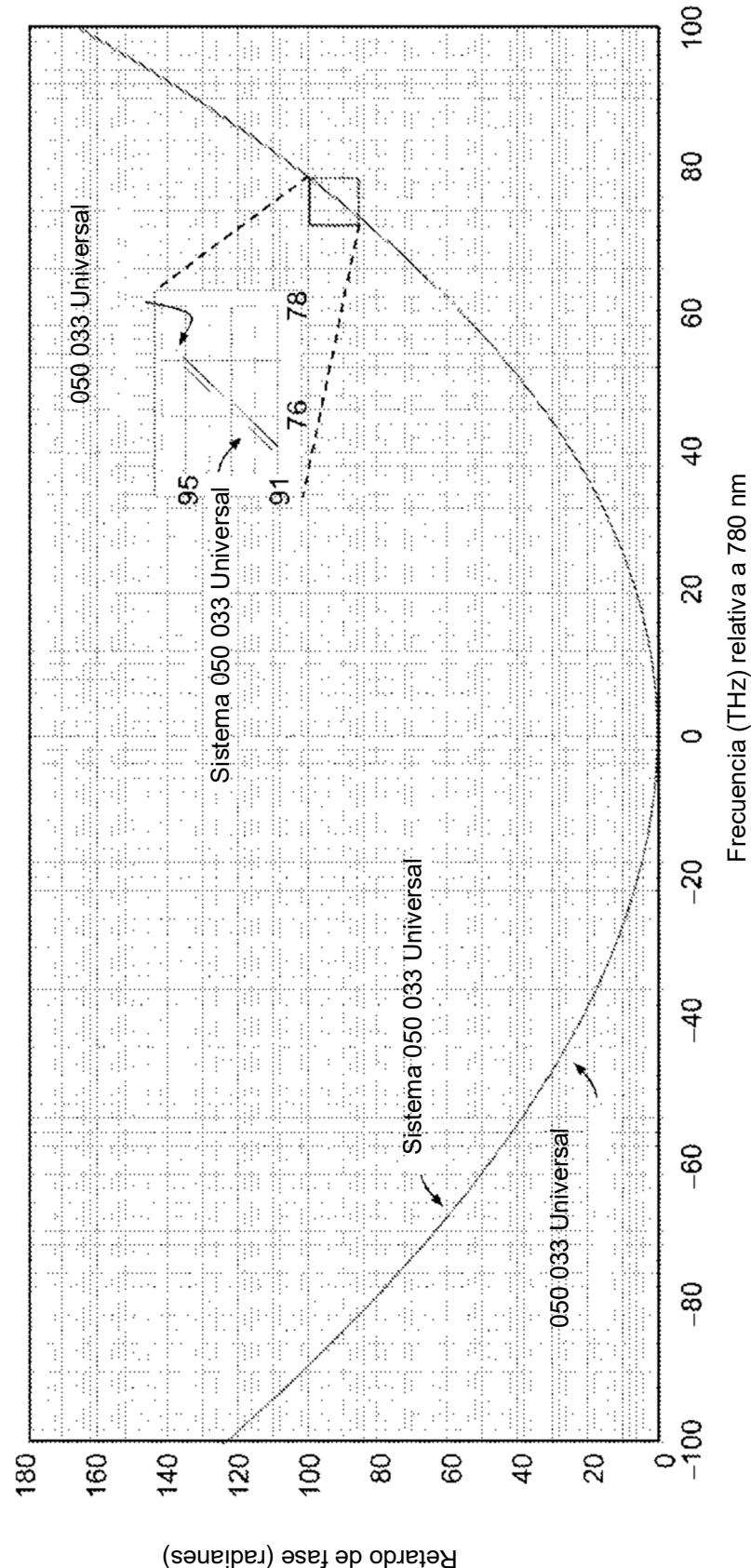


Figura 20

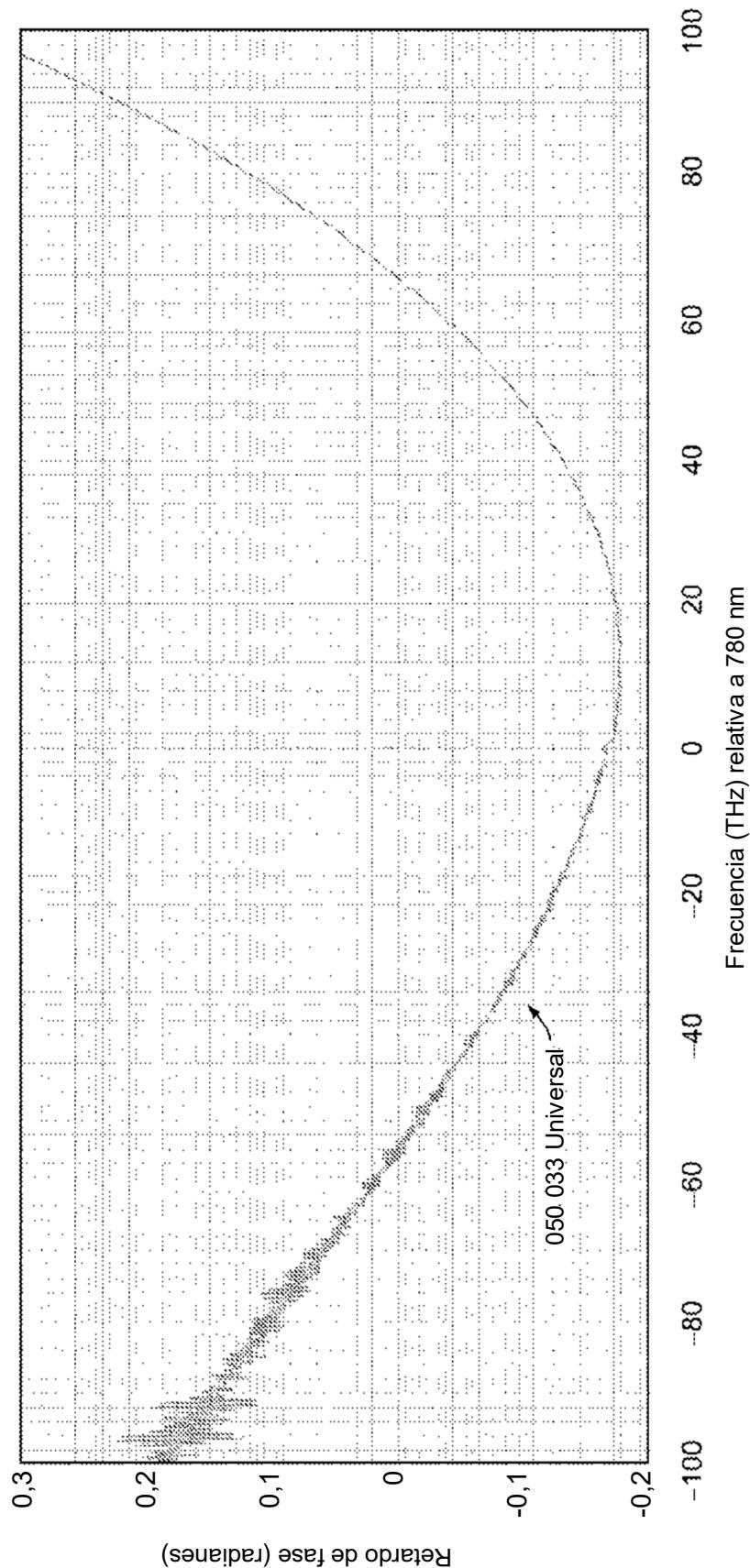


Figura 21

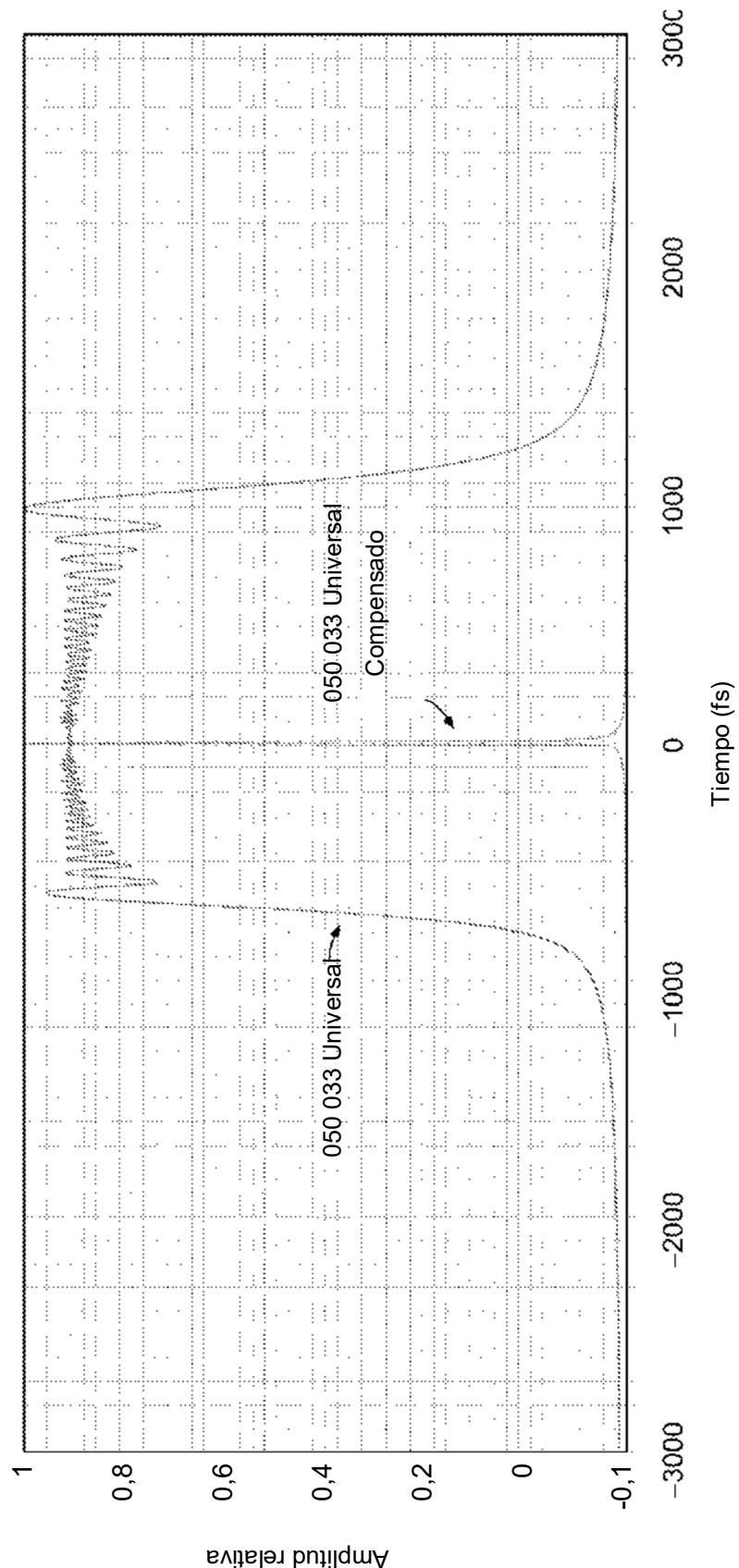


Figura 22

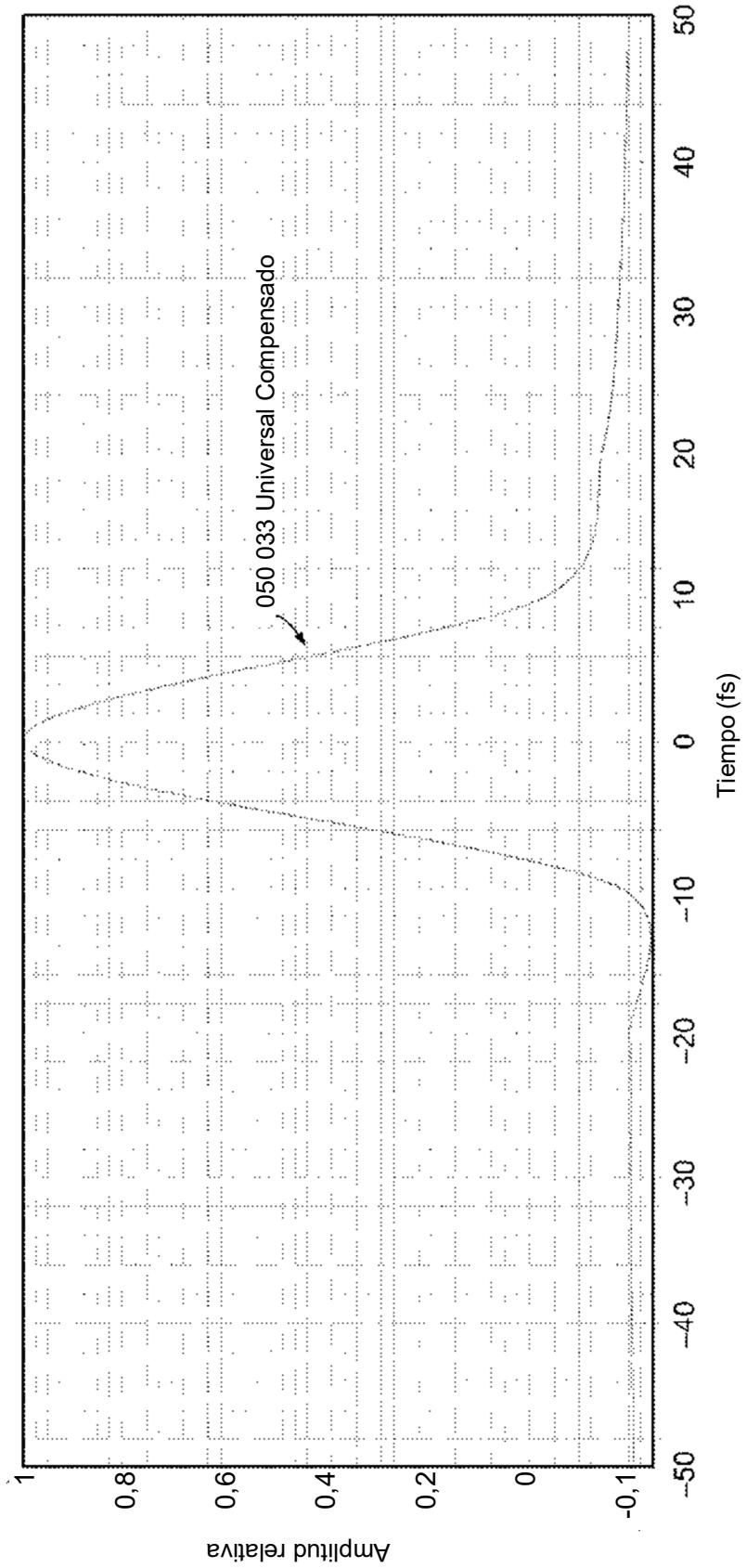


Figura 23

ES 2 829 627 T3

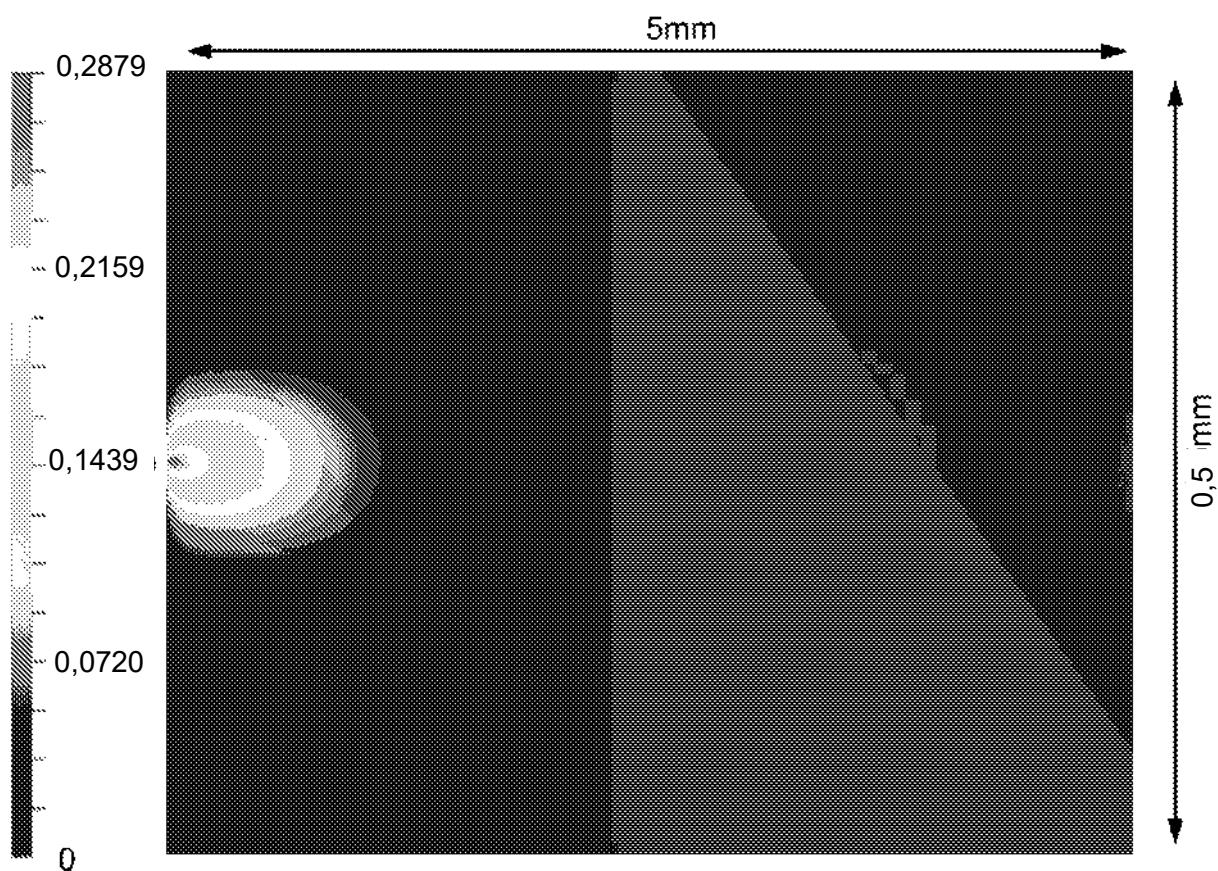


Figura 24

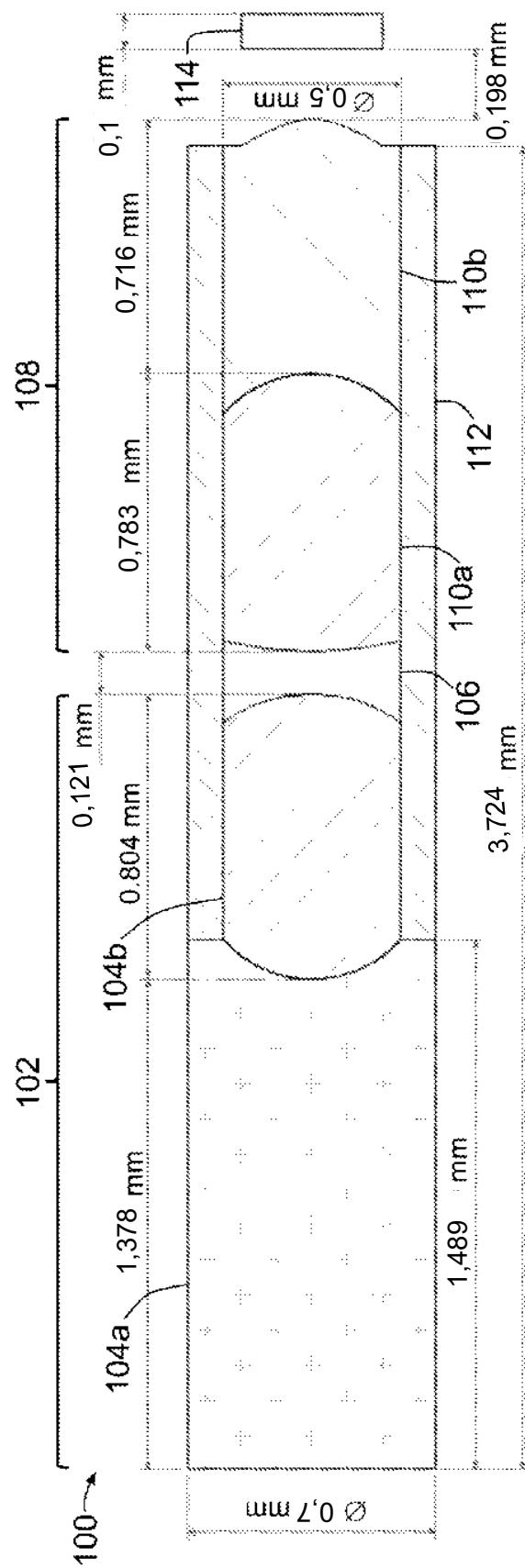


Figura 25

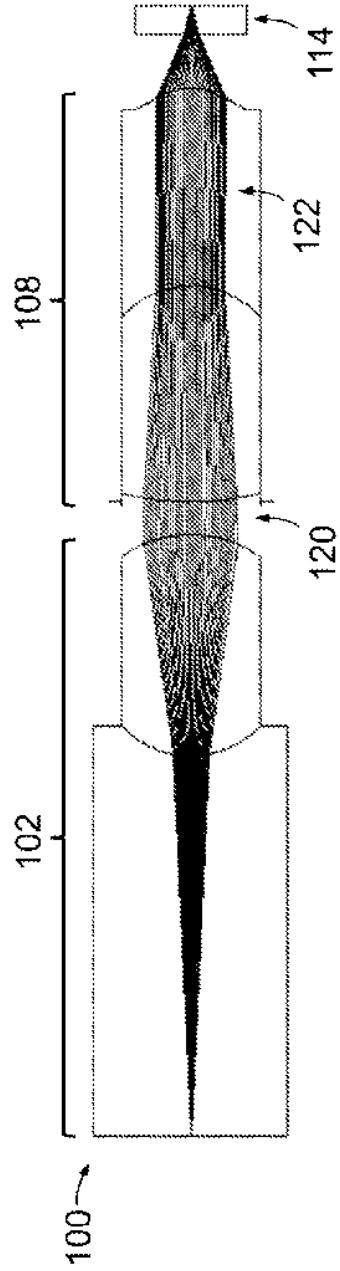


Figura 26

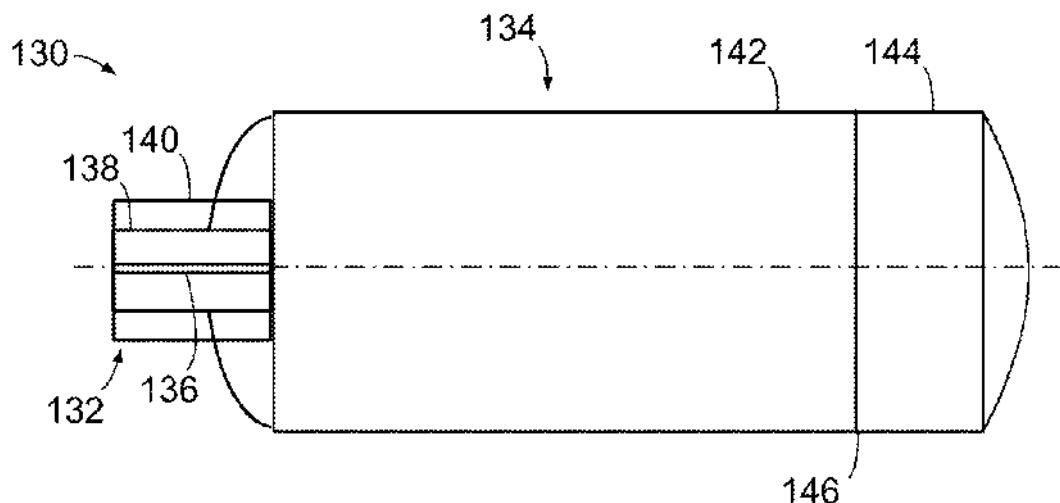


Figura 27

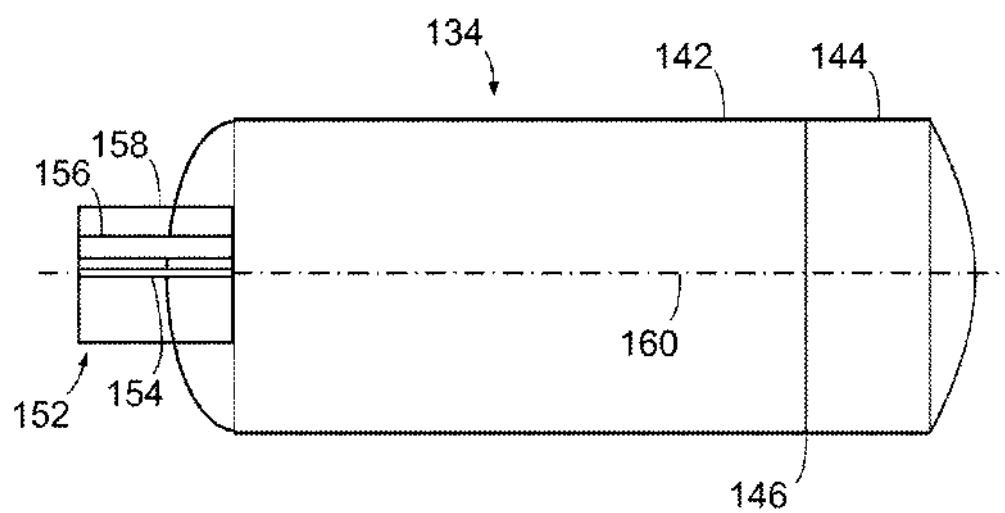


Figura 28

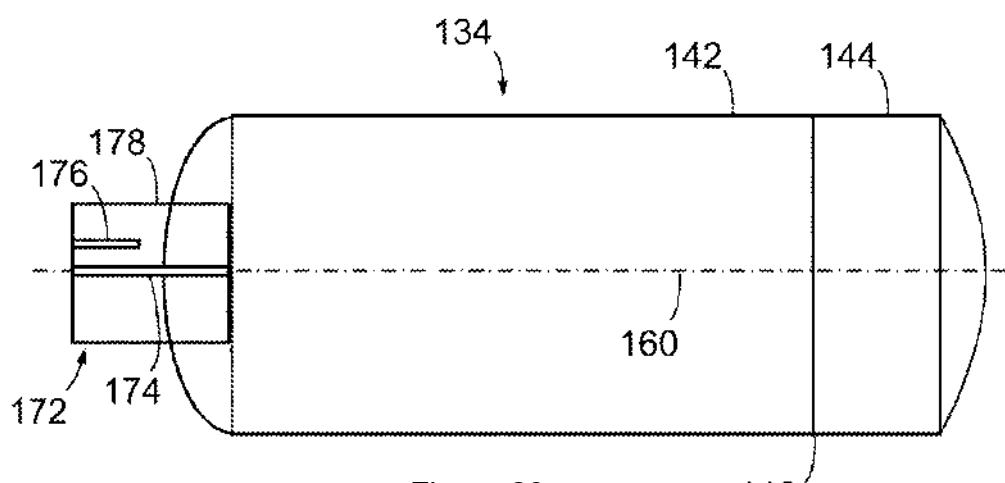
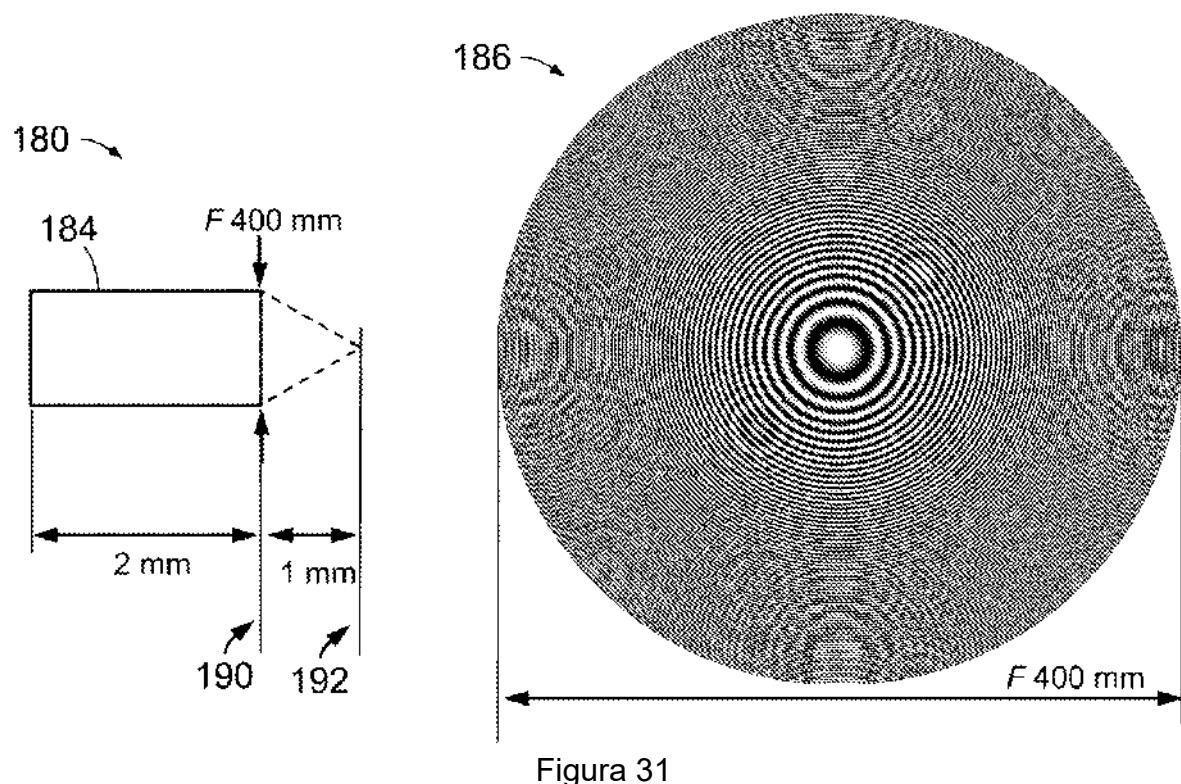
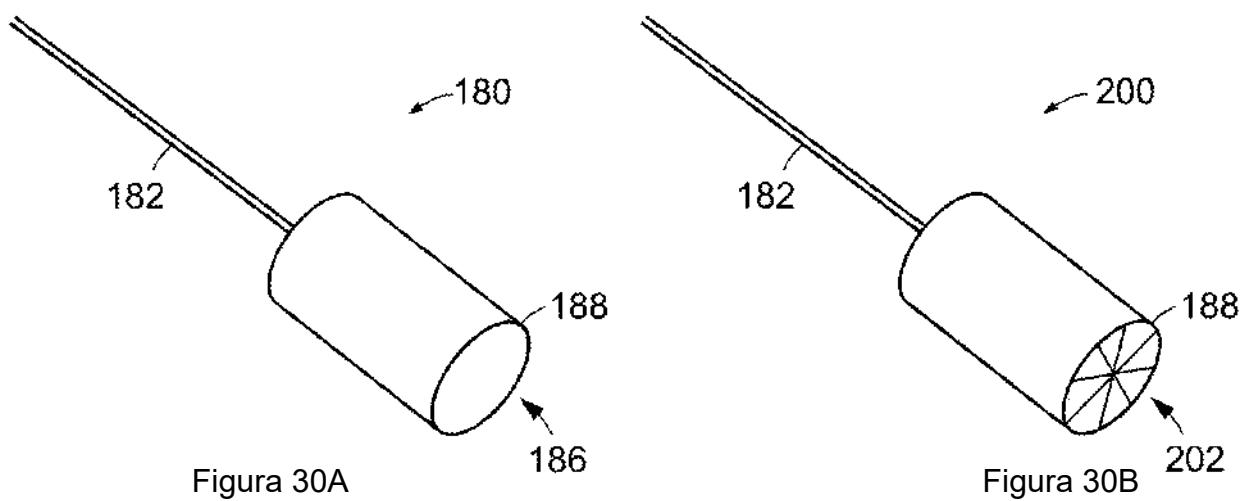


Figura 29

146



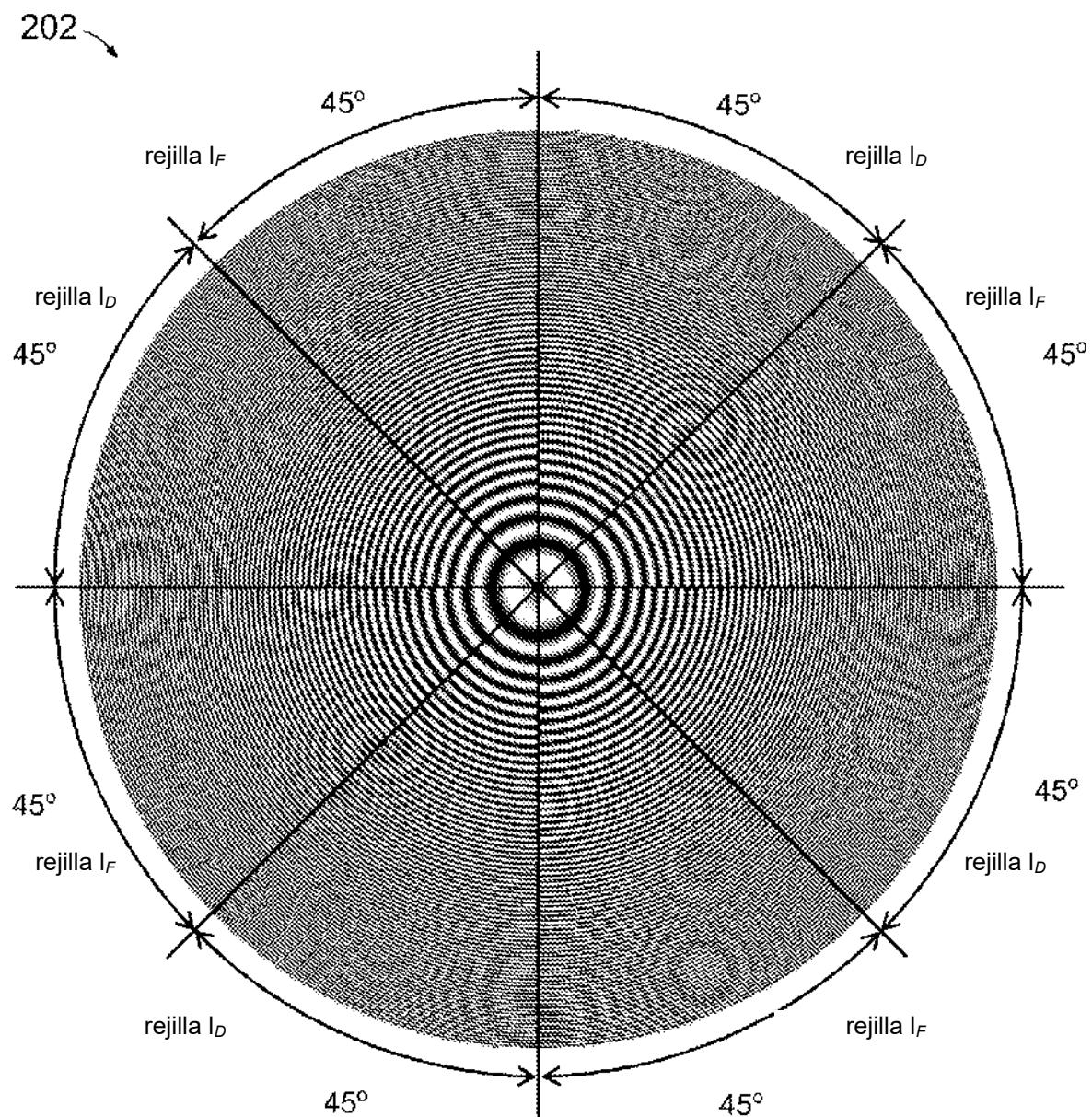


Figura 32

ES 2 829 627 T3

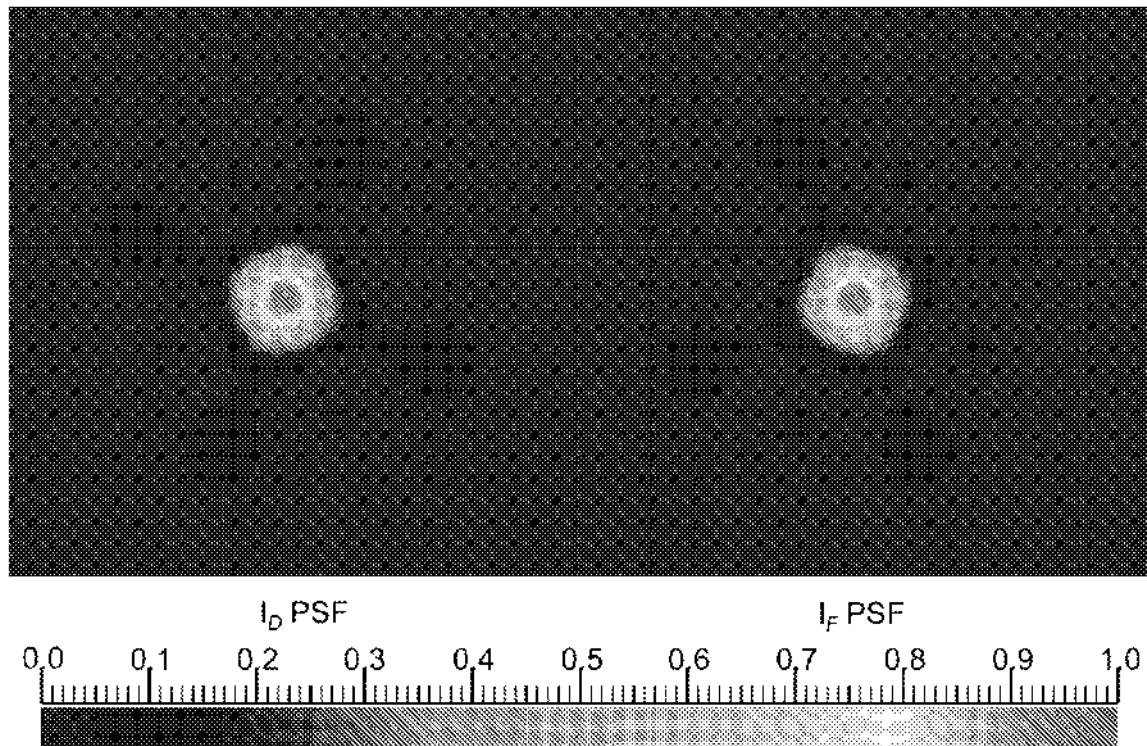


Figura 33

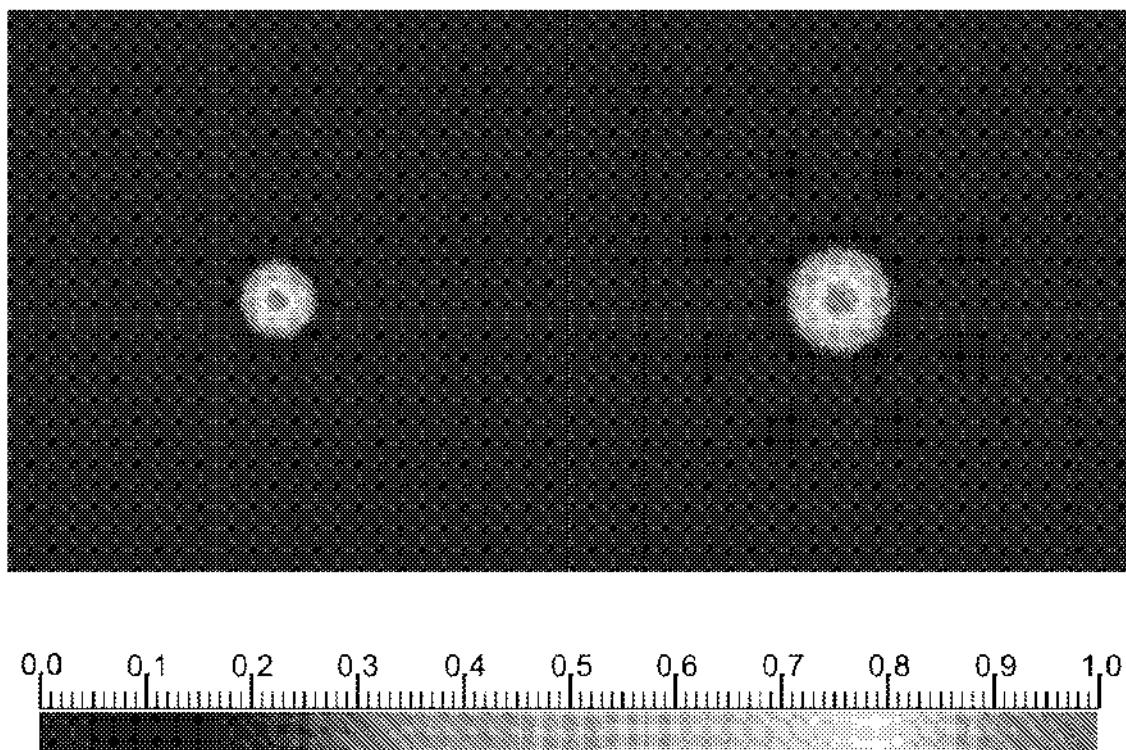


Figura 34

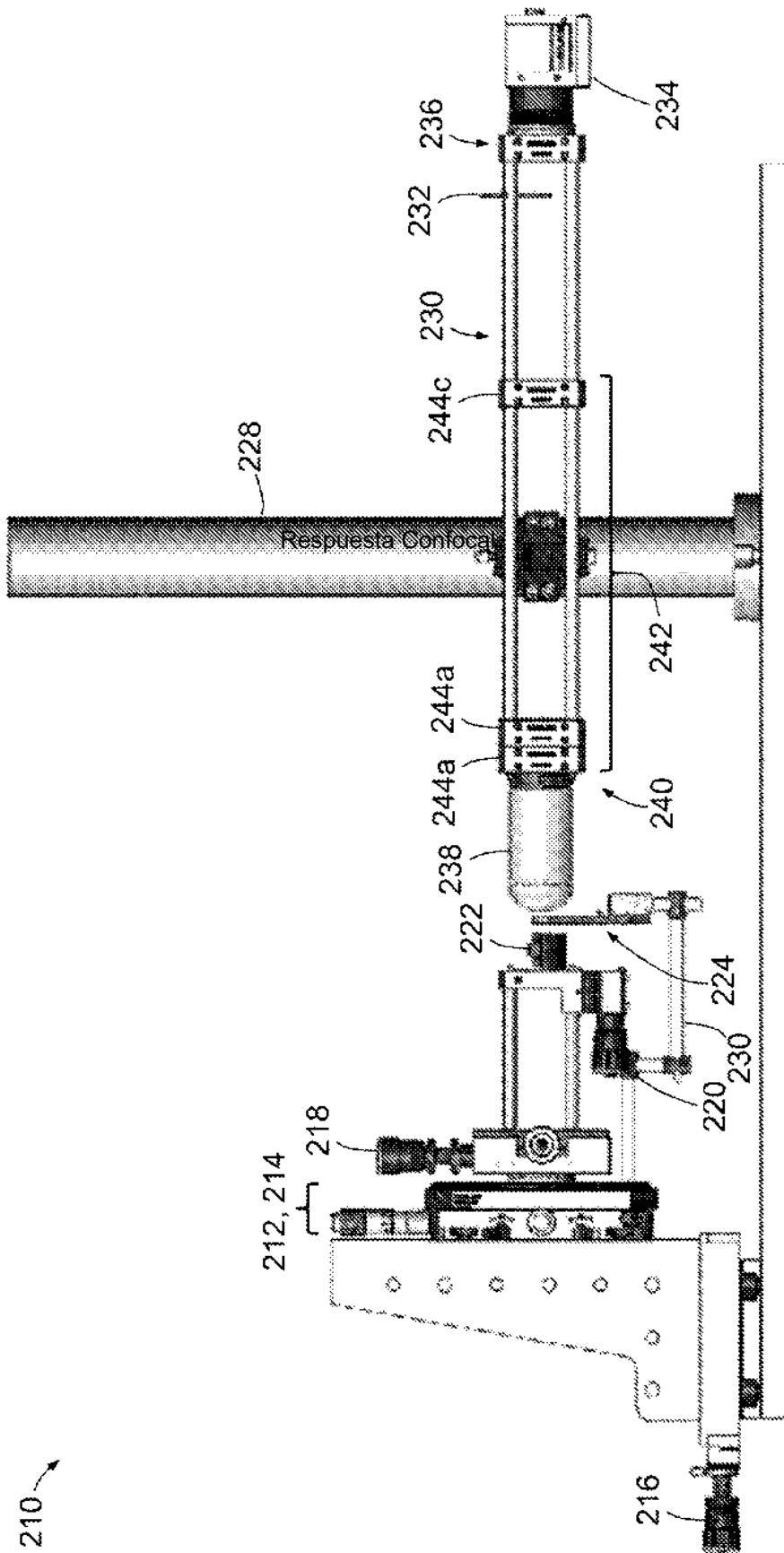


Figura 35

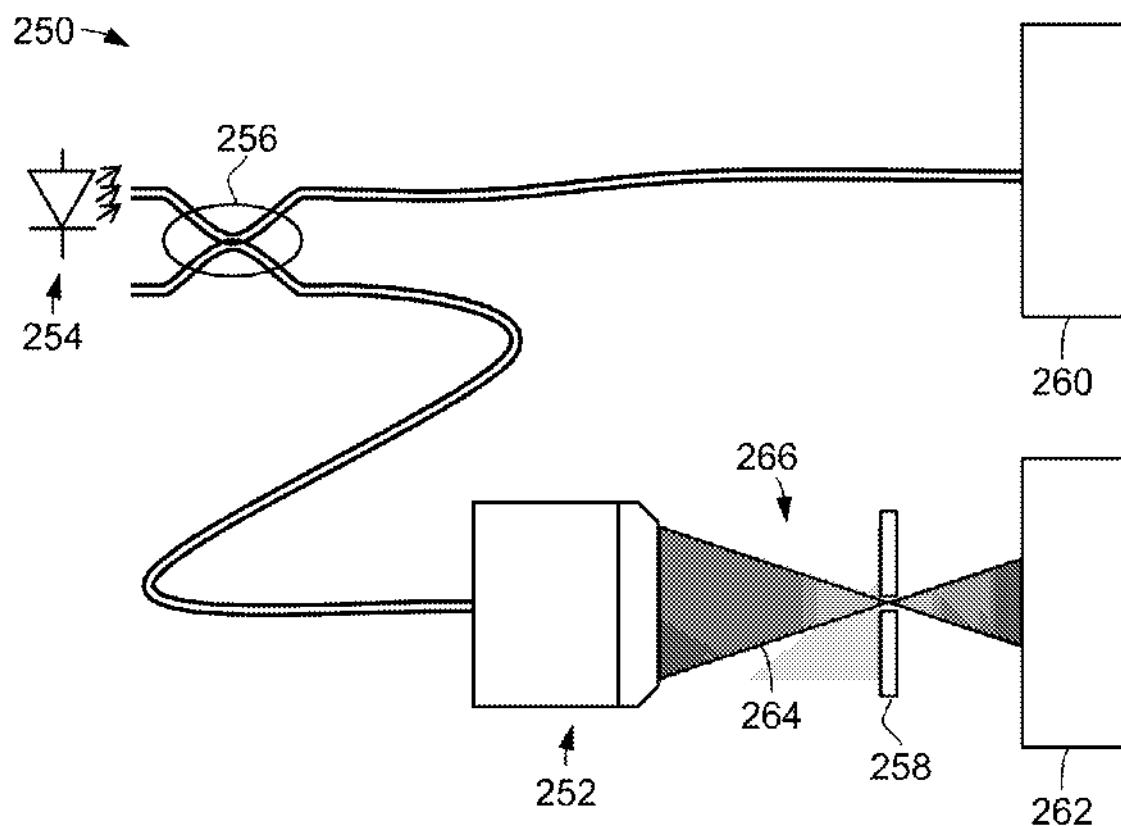


Figura 36

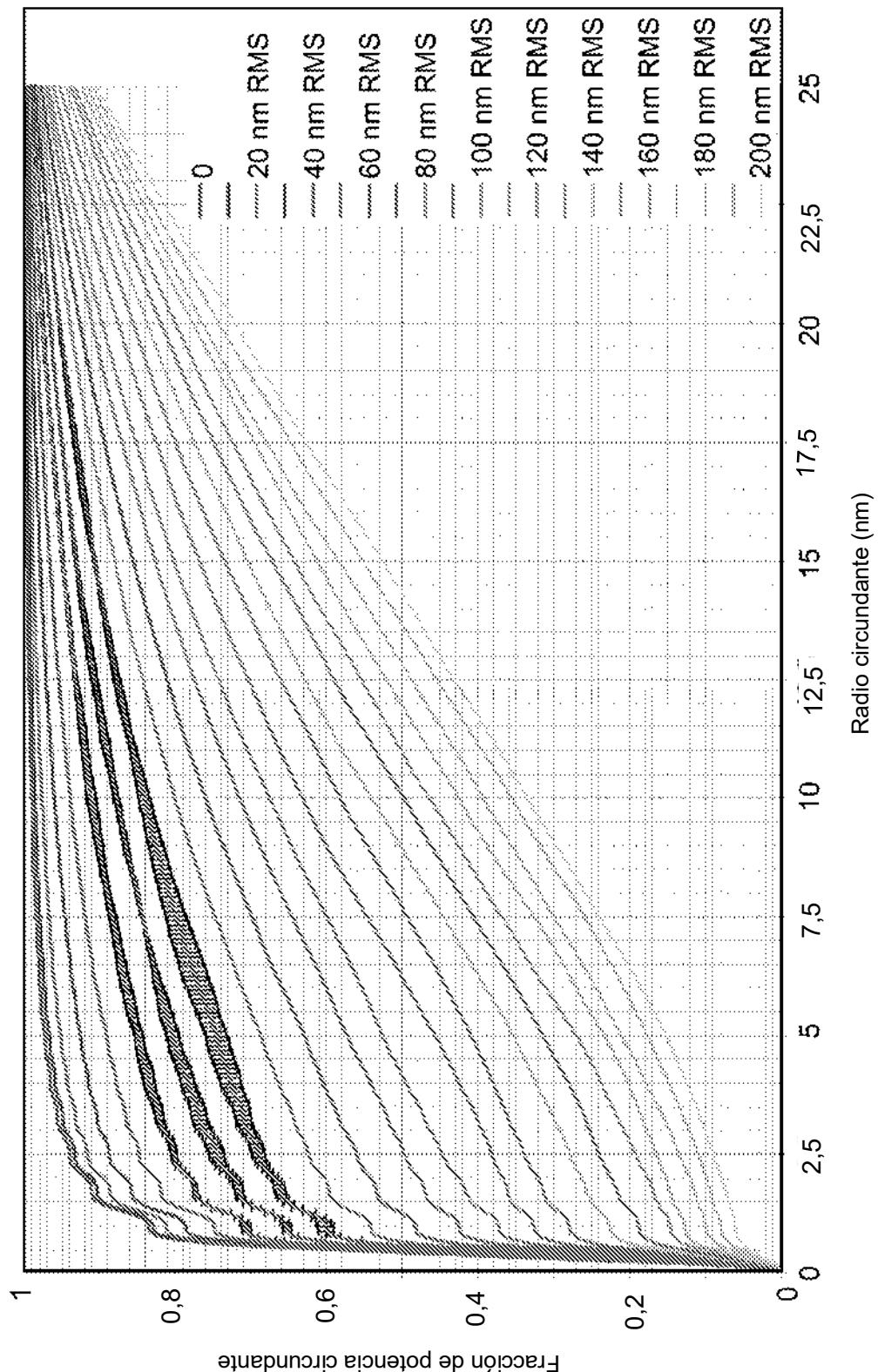


Figura 37

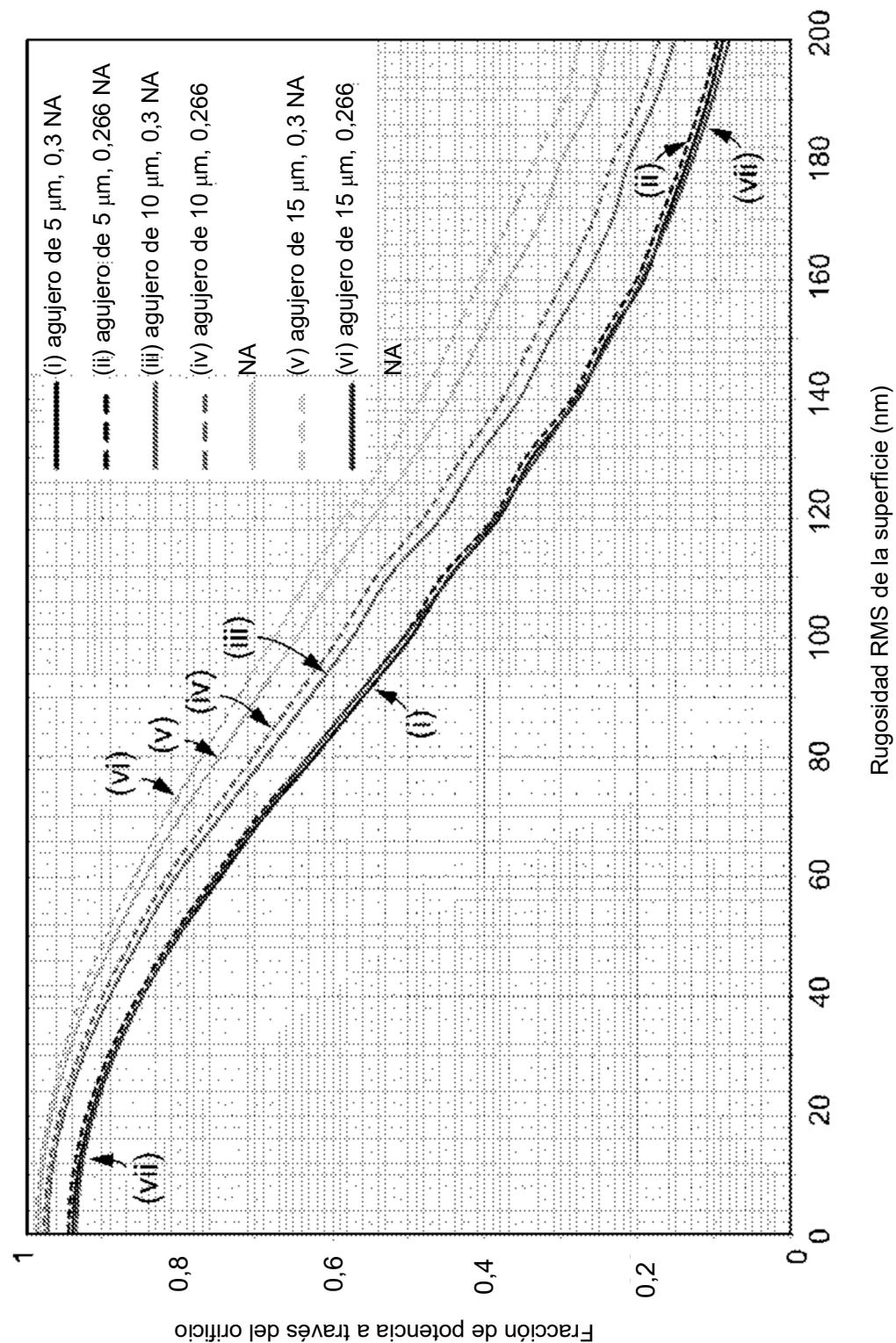


Figura 38

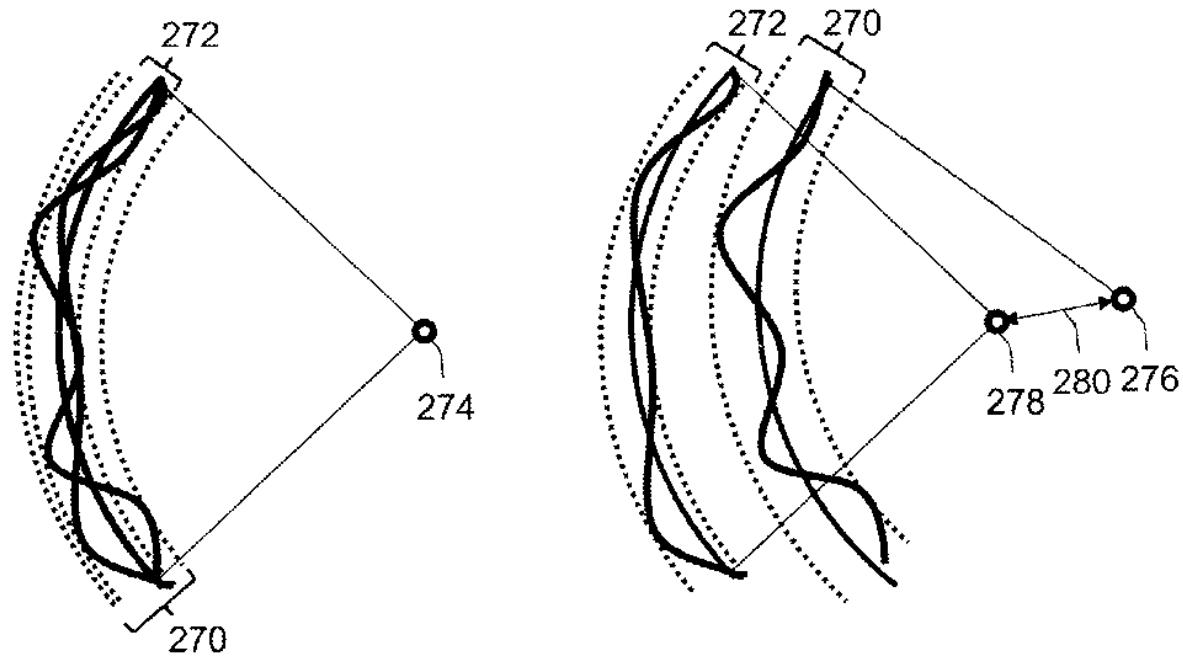


Figura 39A

Figura 39B

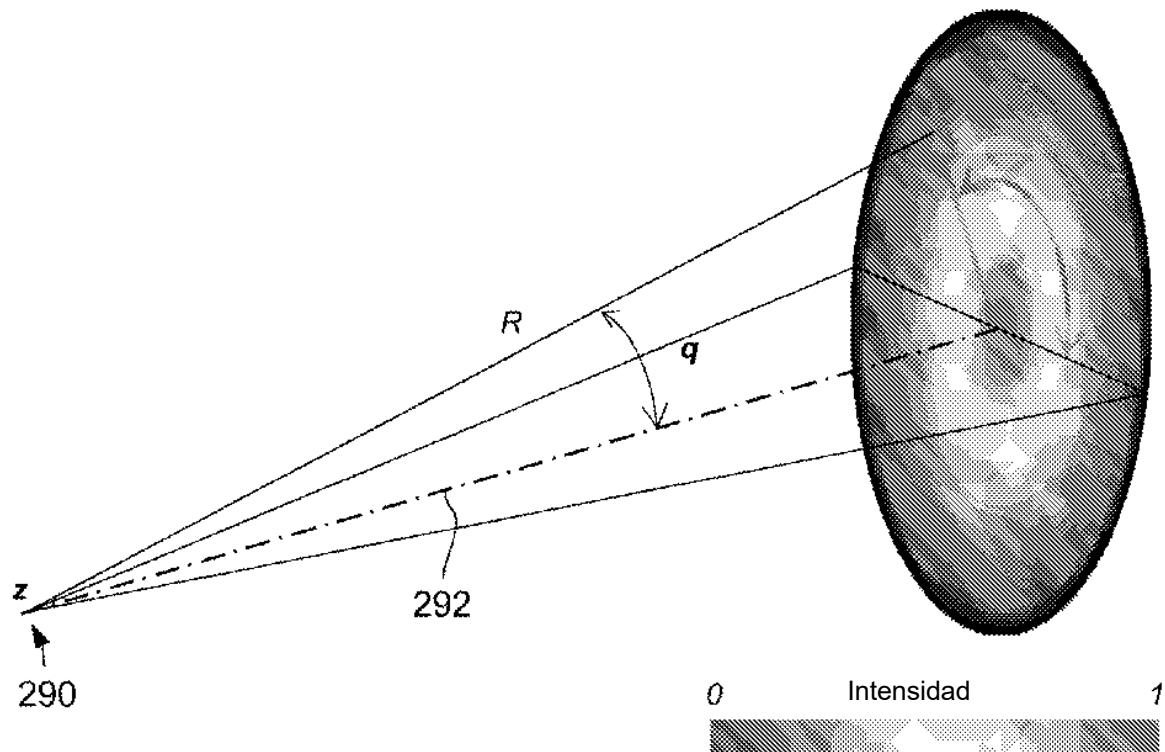


Figura 40

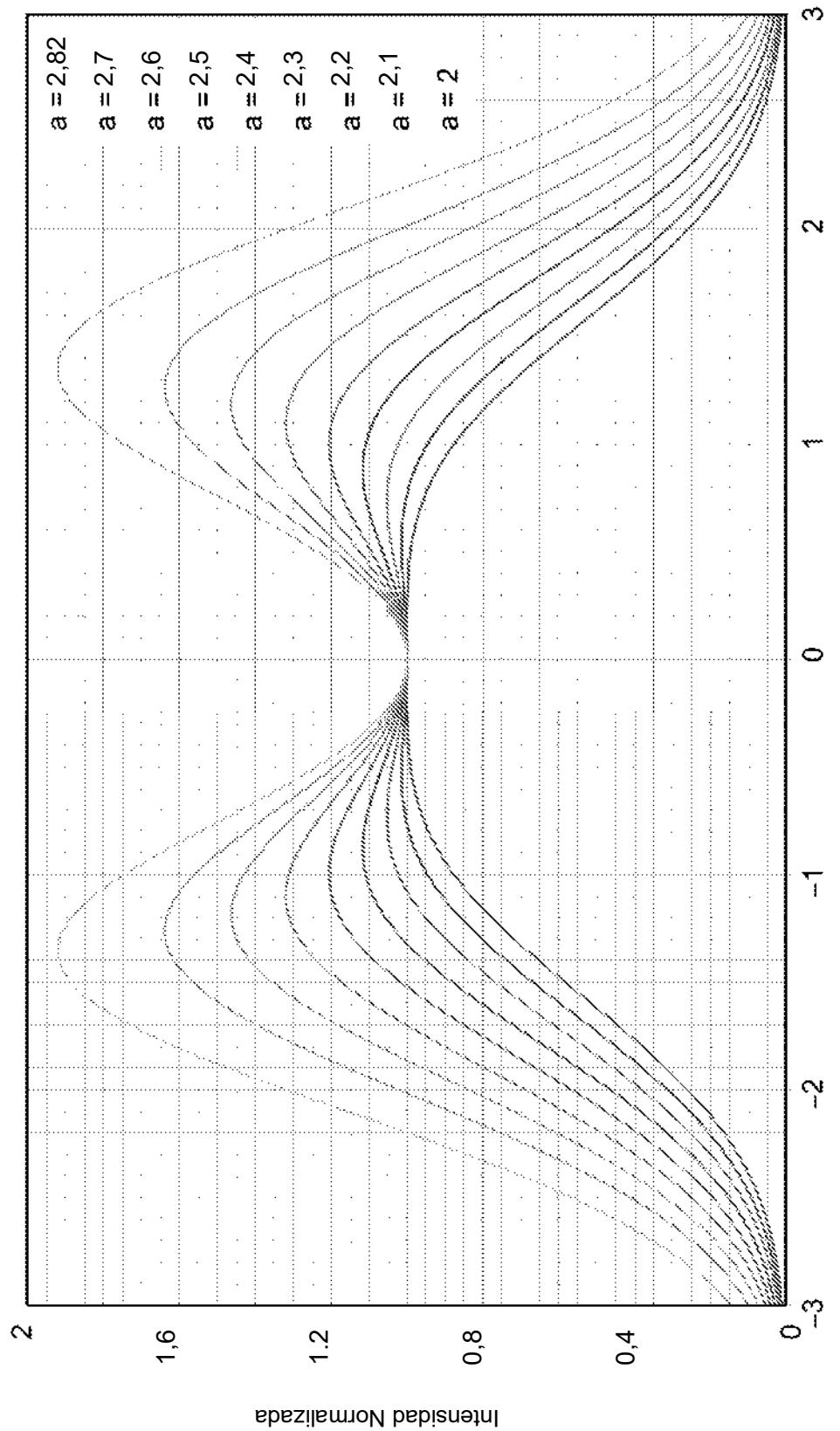


Figura 41

Desplazamiento Lateral Normalizado