

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 570**

51 Int. Cl.:

G03H 1/02 (2006.01)

G03H 1/18 (2006.01)

G01N 21/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2007** **E 07786964 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015** **EP 2054779**

54 Título: **Procedimiento holográfico**

30 Prioridad:

03.07.2006 GB 0613084

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.04.2015

73 Titular/es:

**DUBLIN INSTITUTE OF TECHNOLOGY (100.0%)
FITZWILLIAM HOUSE, 30 UPPER PEMBROKE
STREET
DUBLIN 2, IE**

72 Inventor/es:

**MARTIN, SUZANNE;
NAYDENOVA, IZABELA;
TOAL, VINCENT y
FARRELLY, VINCENT**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 534 570 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento holográfico

5 Campo de la solicitud

La presente solicitud se refiere de manera general al campo de la holografía. Más particularmente, la presente solicitud se refiere a un procedimiento de detección de la ubicación de un colorante.

10 Antecedentes de la solicitud

La holografía es bien conocida y ampliamente utilizada en muchas aplicaciones comerciales, entre ellas la holografía de imágenes, seguridad, publicidad y elementos ópticos y rejillas holográficas. Se produce una imagen holográfica cuando la luz difracta en una rejilla de difracción compleja espacialmente variable, la cual, en términos sencillos, redirige la luz hacia el observador de manera que proporciona la ilusión de que la luz procede de un objeto tridimensional sólido.

Dicha rejilla de difracción se produce mediante la exposición de un material fotosensible adecuado a un patrón de interferencia óptica que se produce cuando se reúnen dos haces de luz coherente (habitualmente producidos utilizando un láser). El material registra la variación de la intensidad de la luz (como variación del índice refractivo, la absorción y el grosor) y resulta una rejilla de difracción correspondiente. En el caso de que ambos haces de luz sean haces colimados simples, el resultado será una rejilla de difracción simple cuyo periodo espacial dependerá del ángulo entre los haces de registro.

En el caso de que la rejilla de difracción se ilumine con uno de los haces de registro (o un haz similar), difractará la luz reproduciendo el otro haz de registro. En el caso de que uno de los haces sea un frente de onda complejo procedente de un objeto tridimensional, la rejilla de difracción registrada presentará la propiedad de que puede reconstruir dicho frente de onda al ser iluminado por el otro haz.

Se dispone de una amplia diversidad de materiales fotosensibles, incluyendo fotopolímeros, haluros de plata, gelatina dicromada, fotorresistencias, termoplásticos, materiales fotocromicos y fotorrefractivos.

El procedimiento de registro en fotopolímeros se describe en detalle en secciones posteriores.

Las emulsiones de haluro de plata son ampliamente utilizados como materiales de registro holográfico debido a su sensibilidad y a su disponibilidad comercial. Además, estos materiales pueden sensibilizarse con colorante de manera que su sensibilidad espectral se corresponda con las longitudes de onda de láser más comúnmente utilizadas. Estas emulsiones resultan adecuadas para registrar hologramas de amplitud y fase y pueden utilizarse en modo de transmisión o de reflexión. Una desventaja de las emulsiones de haluro de plata es que requieren el procesamiento en húmedo y el secado.

La gelatina dicromada (GDC) consiste en una capa de gelatina impregnada con dicromato amónico. Dependiendo de las técnicas de revelado, puede registrarse el holograma como una variación del grosor o una modulación del índice refractivo. De manera similar a las emulsiones de haluro de plata, la GDC puede sensibilizarse con colorante. Entre sus ventajas se encuentran una elevada capacidad de modulación del índice refractivo, una elevada resolución espacial y una baja dispersión. Una desventaja importante es la necesidad de procesamiento posterior al registro.

Los resistivos fotosensibles con películas orgánicas sensibles a la luz que producen una imagen del relieve superficial tras la exposición y revelado. Los resistivos fotosensibles también pueden sensibilizarse con colorante. Las desventajas principales de estos materiales de registro holográfico son la baja sensibilidad y el procesamiento posterior al registro. Su ventaja principal es la baja dispersión, que resulta en una elevada resolución de frecuencia espacial.

Además de dichos materiales para el registro holográfico irreversible, existen algunos materiales que pueden utilizarse varias veces. Dichos materiales son termoplásticos, materiales fotocromicos sometidos a cambios reversibles de color al exponerlos a la luz, materiales fotorrefractivos que experimentan cambios del índice refractivo debido a la redistribución de cargas inducida por la luz que resulta en una carga de campo modulada en el espacio y materiales de registro holográfico fotoanisotrópicos para la holografía de polarización.

Convencionalmente, el material fotosensible se prepara en forma de una película o capa sólida sobre un sustrato. Debido a que los materiales generalmente son fotosensibles, tras prepararlos, típicamente se almacenan en la oscuridad hasta que se requieran para la utilización.

Se han utilizado hologramas en varias aplicaciones de detección diferentes. Por ejemplo, Smart Holograms Ltd., de Cambridge, Reino Unido, ha propuesto varios sensores holográficos para la detección de una diversidad de

condiciones, incluyendo la humedad, el alcohol y analitos. El principio general de la detección aplica un cambio en las características ópticas de un holograma ya existente. Generalmente, estos sensores utilizan un holograma preformado conformado con un medio de soporte. El medio de soporte es sensible a un analito. Durante la utilización, se altera una propiedad física del medio de soporte del holograma por la reacción del analito en forma líquida con una sustancia dispuesta en todo el sensor. Esto provoca, a su vez, una variación de una o más características ópticas del holograma, que es detectable. La propiedad física del elemento holográfico (principalmente formado utilizando películas basadas en haluro de plata) que se altera puede ser, por ejemplo, su volumen, forma, densidad, viscosidad, resistencia, dureza, carga, hidrofobicidad, hinchabilidad por solvente o integridad. La variación detectable que aparece por la alteración de la propiedad física es convenientemente un cambio de las características ópticas, incluyendo, por ejemplo, la polarizabilidad, reflectancia, refractancia o absorbancia del elemento holográfico. Entre los ejemplos de solicitudes de patente relacionadas con lo anterior se incluyen los documentos WO95/26499, WO2003/087899, WO2004/081546, WO99/63408, WO2006/008531 y WO2006/008524.

Sumario

La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar la ubicación de un colorante según se define en la reivindicación 1. En contraste con la técnica anterior en la que se prepara o se proporciona un material fotosensible como etapa estándar en el procedimiento primario referente a la producción de un holograma en material fotosensible y la posterior utilización del holograma, la presente solicitud aplica el principio de que un holograma no puede formarse si el material fotosensible requerido de hecho no es fotosensible.

En otras palabras, la presente solicitud aplica el principio de que, en el caso de un material fotosensible comprenda varios constituyentes esenciales que serán fotosensibles para fines de formación/registro holográfico, la ausencia de uno o más de estos constituyentes puede detectarse a partir de la ausencia de un holograma tras un procedimiento de registro holográfico.

Enunciado en positivo, la presencia de un constituyente esencial puede detectarse por la presencia de un holograma. Este principio puede aplicarse de diversas maneras, lo que resultará evidente a partir de la descripción detallada siguiente.

Descripción de los dibujos

La figura 1 representa un aparato simple para registrar un holograma en un medio de registro holográfico tal como podría utilizarse con la técnica anterior y con la tecnología de la presente solicitud.

La figura 2A es un diagrama de proceso ejemplificativo según una forma de realización de la presente solicitud.

La figura 2B representa los resultados de cada una de las etapas del diagrama de proceso de la figura 2A.

La figura 3 es una representación pictórica de otra forma de realización de la presente solicitud.

La figura 4 es una representación pictórica de una forma de realización adicional de la presente solicitud.

La figura 5 es una representación pictórica de todavía otra forma de realización de la presente solicitud.

La figura 6 es una representación pictórica de todavía otra forma de realización de la presente solicitud.

La figura 7 representa los resultados de un diagrama de proceso alternativo al de la figura 2A.

La figura 8 representa los resultados de un procedimiento no reivindicado alternativo al de la figura 2A.

La figura 9 demuestra una forma de realización ejemplificativa adicional en la que puede identificarse un ácido nucleico identificado por la presente solicitud.

La figura 10 representa una forma de realización por la que puede detectarse un analito utilizando un método directo de la presente invención, y

la figura 11 representa una forma de realización mediante la que puede detectarse un analito utilizando un método indirecto de la presente invención.

Descripción detallada de los dibujos

A continuación se describe de manera ejemplificativa la presente solicitud en referencia a un procedimiento de registro holográfico utilizando fotopolímeros. Se apreciará que la técnica también puede aplicarse a otros materiales de registro holográfico en los que puede omitirse un componente esencial de la manera sustancialmente descrita a

continuación. Por ejemplo, el método puede aplicarse a haluro de plata sensibilizado con colorante, GDC sensibilizada con colorante y resistivos fotosensibles sensibilizados con colorante. Sin embargo, un inconveniente de la utilización de dichos materiales de registro holográfico es la necesidad de procesamiento posterior.

En un procedimiento convencional de registro de holograma de fotopolímero, se produce un patrón de luz mediante la interferencia de dos o más haces de luz mutuamente coherentes que inciden en una capa fotosensible que contiene un colorante fotosensible. La capa fotosensible típicamente comprende varios componentes individuales, entre ellos: un colorante, un generador de radicales libres, un monómero y, opcionalmente, un ligante. Aunque se apreciará que existe más de un tipo de cada componente, en el material fotosensible pueden utilizarse, por ejemplo, varios monómeros diferentes o varios colorantes diferentes. La función y naturaleza de estos materiales y el procedimiento por el que se combinan para registrar un holograma se exponen brevemente a continuación, aunque se apreciará que estas técnicas son bien conocidas y entendidas por el experto en la materia.

La función del colorante fotosensible en la capa fotosensible es absorber luz e iniciar los procesos fotoquímicos que conducen a un registro holográfico. Entre los ejemplos de colorante fotosensible se incluyen la eritrosina B, la fluoresceína y otros colorantes xanteno.

En regiones brillantes del patrón de interferencia producido, la energía de los fotones de la luz elevada las moléculas del colorante a estados de singlete excitado. Muchas de las moléculas en estado de singlete excitado a continuación se convierten en moléculas en estado de triplete excitado mediante cruce intersistema. En el estado de triplete, una molécula de colorante puede interactuar con un generador de radicales libres, por ejemplo trietanolamina. Esta interacción produce un radical libre activo. El radical libre activo puede, a su vez, interactuar con una molécula de monómero, tal como acrilamida, creando un radical monómero. La creación del radical monómero resulta en que se produce la polimerización del radical libre en el material de polímero.

La conversión del doble enlace carbono-carbono en un enlace sencillo modifica la polarizabilidad molecular de la acrilamida y, de esta manera, su índice refractivo. Además, la reducción de la concentración de monómero en las regiones iluminadas resulta en un gradiente espacial de concentraciones de monómero que induce la difusión del monómero de regiones oscuras a brillantes. Este proceso contribuye además a un cambio local en el índice refractivo. Mediante estos mecanismos se registra la variación espacial de la intensidad de la luz como variación del índice refractivo en la capa de fotopolímero, es decir, se produce un holograma.

El colorante, el generador de radicales libres y el monómero pueden considerarse como esenciales para el material fotosensible, o de manera más general, para el procedimiento de registro de un holograma, ya que, en caso de no hallarse, no puede tener lugar la fotopolimerización. Esta característica se utiliza en el procedimiento de detección de la presente solicitud.

En particular, el procedimiento comprende proporcionar un material de registro holográfico inactivo. En el contexto de la presente solicitud, un material de registro holográfico inactivo se refiere a un material capaz de registrar un holograma una vez activado. Se apreciará que la activación es la provisión de uno o más componentes esenciales sustancialmente ausentes del medio de registro inactivo, que resultan necesarios para transformar el material inactivo en un material activo capaz de registrar un holograma.

En particular, la presente solicitud aplica el principio de que únicamente tras introducir un componente ausente, es decir un colorante, en una capa inactiva que contiene todos los demás componentes esenciales, se hace posible la fotopolimerización. En el caso de que no se introduzca el componente ausente, fracasarán los intentos de crear un holograma utilizando la técnica de registro de la luz descrita anteriormente. En contraste, en caso de hallarse presente el componente ausente, resultará un holograma.

El procedimiento de fotopolimerización descrito anteriormente es por naturaleza un procedimiento de amplificación, en la medida que una molécula de colorante puede facilitar la polimerización de muchas moléculas de monómero. De acuerdo con lo anterior, resulta ventajoso seleccionar el colorante como el componente esencial que debe detectarse.

En el caso de que la presencia del componente esencial ausente sea dependiente de la presencia de un componente adicional, evidentemente la producción de un holograma indicará la presencia de no sólo el componente esencial ausente sino también del componente adicional.

A continuación se proporciona una explicación con mayor detalle haciendo referencia a una forma de realización ejemplificativa de un sistema de detección para detectar la presencia de colorante.

El sistema de detección ejemplificativo comprende: (1) una capa de polímero diseñada para poder registrar un holograma autodesarrollable únicamente en el caso de que se halle presente un colorante, y (2) un aparato simple para el registro *in situ* de hologramas.

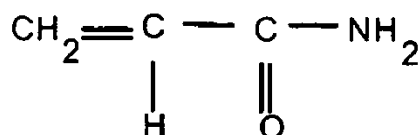
El material de registro holográfico de fotopolímero (expuesto a continuación con mayor detalle), que ha sido desarrollado en el Centre for Industrial and Engineering Optics, Dublin Institute of Technology, puede proporcionarse en forma de capa de material, posiblemente sobre un sustrato sólido, tal como un portaobjetos de vidrio, con la excepción de que se omite el colorante de la formulación de material de registro holográfico. La omisión del colorante de la formulación causa que la capa final sea inactiva, es decir sustancialmente incapaz de responder a la luz. Los esfuerzos por registrar un holograma mediante la exposición a un patrón de interferencia no tendrán éxito a menos que se introduzca el colorante.

Con mayor detalle, el medio de registro holográfico inactivo comprende convenientemente una composición de capa de fotopolímero que comprende lo siguiente: un ligante, que actúa como medio de soporte o matriz huésped para monómeros y un generador de radicales libres.

Con mayor detalle, la estructura de un medio de registro holográfico ejemplificativo, que se ha descubierto que proporciona buenos resultados, incluye lo siguiente:

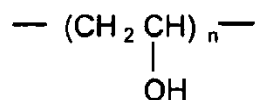
Monómero:

Un monómero ejemplificativo utilizado en la composición de fotopolímero es acrilamida. Se muestra a continuación la estructura de la molécula de acrilamida. Las moléculas contienen un doble enlace carbono-carbono (C=C). Este doble enlace se rompe durante la polimerización, resultando en dos enlaces sencillos. En particular, puede utilizarse la acrilamida en polvo de grado electroforético (por ejemplo disponible de Sigma-Aldrich de St. Louis, Missouri, USA).

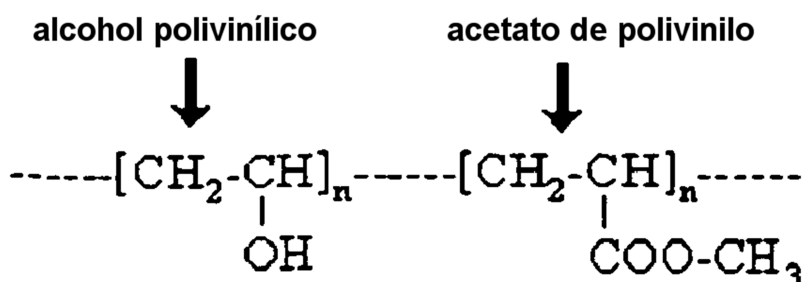


Ligante:

Un ligante adecuado utilizado en la capa de fotopolímero es el alcohol polivinílico (APV) (por ejemplo de Sigma-Aldrich o de Riedel De Haen). La fórmula química para el ligante de alcohol polivinílico puro (100% hidrolizado) se muestra a continuación.

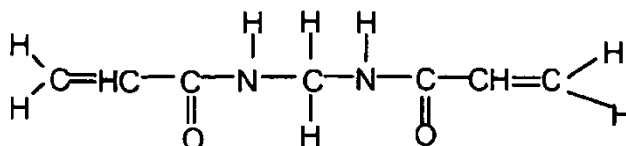


También puede utilizarse un ligante de bajo porcentaje de hidrólisis. La fórmula química de un alcohol polivinílico alternativo hidrolizado en un porcentaje más bajo en el que un segundo polímero (generalmente acetato de polivinilo, a partir del que se sintetiza el alcohol polivinílico) es la siguiente:



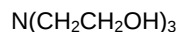
Monómero de entrecruzamiento

Un segundo monómero utilizado en la composición ejemplificativa de capa de fotopolímero actúa como un monómero de entrecruzamiento, por ejemplo N,N'-metilén-bis-acrilamida (disponible de Sigma-Aldrich). Se muestra a continuación la estructura de la molécula. Es una molécula simétrica de dos moléculas de acrilamida unidas con un grupo metilo en la parte intermedia.



Generador de radicales libres:

- 5 Un generador de radicales libres ejemplificativo comprende trietanolamina (TEA) (disponible a partir de Sigma-Aldrich Chemicals). Tal como se ha explicado anteriormente, el generador de radicales libres desempeña un papel significativo en la generación de radicales libres para iniciar una reacción de polimerización. Se muestra a continuación la fórmula química de TEA.



- 10 Un método de preparación de una capa de registro de polímero (inactivo) adecuado ejemplificativo comprende algunas o la totalidad de las etapas siguientes:

Solución madre de alcohol polivinílico (APV):

- 15 Se disuelven 10 gramos de APV de peso molecular e hidrólisis especificados en 100 ml de agua para preparar una solución de APV al 9,1% en peso o al 10% p/v.

Composición de medio fotosensible:

- 20 Se prepara una composición del medio fotosensible mediante la adición de 2 ml de trietanolamina a 0,2 gramos de N,N'-metilen-bis-acrilamida (monómero de entrecruzamiento) y 0,6 gramos de acrilamida (monómero). A esta mezcla se le añaden a continuación 17,5 ml de solución madre de alcohol polivinílico al 9,1% y la solución total se agita completamente, con el fin de garantizar que el monómero y el monómero de entrecruzamiento se disuelven por completo y se obtiene una solución homogénea.

- 25 Preparación de capa:
- Se extendieron uniformemente 1,5 ml de solución de fotopolímero sobre una placa de vidrio de 50x50 mm² colocada sobre una superficie nivelada y se dejó que se secasen para formar una película. El tiempo de secado habitualmente es de entre 36 y 48 horas. Los grosores de las películas de película de fotopolímero formadas de esta manera son de entre aproximadamente 120 μm y 140 μm. Aunque no reivindicada, la capa también puede utilizarse en forma líquida, en caso de puedan utilizarse concentraciones más altas.

- 35 Existen muchas variaciones de la concentración y volumen de la fórmula anteriormente indicada, las cuales también funcionan bien. Por ejemplo, en el caso de que se requiera más brillo en la imagen holográfica final, puede utilizarse más acrilamida, y en el caso de que resulte ventajosa una menor selectividad angular, se preparan capas mucho más delgadas. También pueden prepararse muestras mucho más gruesas y muestras de mayor superficie. También pueden prepararse muestras en cualquier forma deseada mediante moldeo.

- 40 Se apreciará que pueden utilizarse monómeros alternativos, generadores de radicales libres y ligantes según los requisitos particulares de la aplicación. De manera similar, pueden añadirse componentes adicionales, por ejemplo nanopartículas, para un rendimiento mejorado.

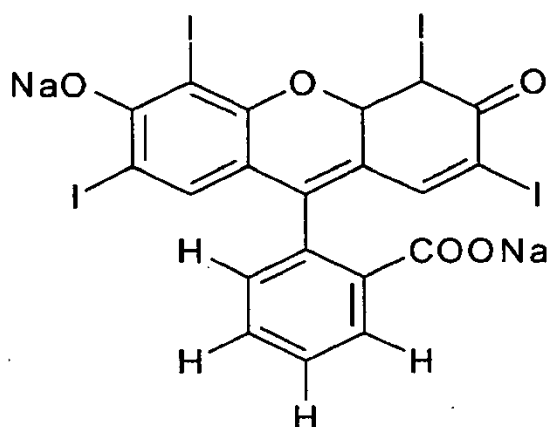
- 45 Entre los monómeros alternativos pueden incluirse cualesquiera monómeros adecuados, tales como acrilamidas, por ejemplo N,N-dietil-acrilamida, nombre comercial: DEAA; N,N-dimetil-acrilamida, nombre comercial: NNDMA; N-isopropil-acrilamida, nombre comercial: NIPAM; N-(2-hidroxietil-acrilamida), nombre comercial: HEAA; o metacrilato de 20-hidroxietilo, nombre comercial: HEMA. De manera similar, el monómero puede comprender un acrilato, tal como acrilato de N,N-dimetilaminoetilo o metacrilato de N,N-dimetilaminoetilo.

- 50 Entre los ligantes alternativos ejemplificativos podrían incluirse polivinilpirrolidona, un sol-gel, un hidrogel, un acrilato, óxido de polietileno, polietilenglicol y polietiloxazina.

- 55 Entre los generadores de radicales libres alternativos ejemplificativos se incluyen N-fenilglicina (NFG), que puede utilizarse en combinación con hexafluorofosfato de difenilyodonio (DFI).

- Tras secarse la capa de material de registro holográfico inactivo, puede exponerse a un procedimiento de registro holográfico. En caso de no hallarse presente el sensibilizador, no resultará ningún holograma. De manera similar, en el caso de hallarse presentes el sensibilizador en un área, resultará un holograma en ese área.

- 60 A este respecto, el sensibilizador (también denominado colorante o colorante sensibilizador) convenientemente es un colorante fotosensible, por ejemplo eritrosina-B (disponible de Sigma-Aldrich Chemicals). La eritrosina B es un colorante sensible a la luz verde que presenta una estructura compleja con cuatro anillos de benceno. Se muestra a continuación la estructura de la molécula:



Alternativamente, puede utilizarse una amplia diversidad de sensibilizadores, entre ellos, por ejemplo: eritrosina B, azul de metileno, eosina, eosina amarillenta, fluoresceína, cualquier colorante xaneno, o un colorante tionina. El colorante puede introducirse en la capa de polímero mediante deposición en forma de solución o sólido, mediante contacto con una capa seca impregnada de colorante o mediante un procedimiento de impresión o pulverización.

Esto también es cierto respecto a moléculas a las que se une el colorante y a sustancias en las que el colorante es un constituyente con independencia de si son sólidas o líquidas.

Para detectar si el colorante se encuentra presente puede utilizarse un aparato simple para el registro *in situ* de hologramas o rejillas.

Se muestra dicho aparato en la figura 1 y comprende una rejilla que se pone en contacto con la capa de registro indicada anteriormente. La luz de una fuente de luz coherente, tal como un diodo láser, se orienta de manera que ilumina la capa de polímero a través de la rejilla (puede utilizarse una fibra óptica en caso de que resulte conveniente para localizar la fuente de luz independientemente). La función de la rejilla es producir un segundo haz que interferirá con el primer haz procedente de la fuente de luz. Debido a que los dos haces son coherentes, ello producirá un patrón de interferencia en el área de solapamiento de los dos haces. Alternativamente, el segundo haz podría producirse con ayuda de un espejo o un prisma. Pueden proporcionarse medios adecuados de retención que comprenden pinzas o un dispositivo de soporte de ranura para garantizar que la rejilla, la fuente de luz y la capa de registro se encuentran fijas unas respecto a otras. La iluminación de la capa de fotopolímero a través de la rejilla registrará una rejilla holográfica en el caso de que la capa de fotopolímero haya sido adecuadamente sensibilizada (por la presencia de colorante). La cantidad de exposición de la capa de fotopolímero a través de la rejilla se selecciona de manera que se registre una rejilla holográfica en el caso de que la capa de fotopolímero haya sido adecuadamente sensibilizada. El presente aparato ejemplificativo puede escalarse al tamaño apropiado para una aplicación particular. Pueden utilizarse fuentes de luz modulables o múltiples o un sistema de filtros con fines de multiplexado, de manera que pueda detectarse más de un analito.

Por lo tanto, en el caso de que se ponga en contacto una sustancia con la capa de polímero inactivo mencionada anteriormente, y a continuación se exponga al sistema de registro anteriormente mencionado, se formará una rejilla holográfica únicamente en presencia del colorante. De esta manera, la presencia (o ausencia) de colorante se detecta en virtud del hecho de que se forma (o no se forma) una rejilla holográfica. La intensidad de la rejilla holográfica registrada dependerá de la concentración del colorante y de su actividad en términos de producción de estados de triplete excitado. Además, puede inferirse que las moléculas de interés se encuentran situadas donde se ha formado la rejilla holográfica. A este respecto, las moléculas de colorante pueden unirse a otros compuestos químicos o analitos bioquímicos (es decir, marcados). La utilización de marcaje permite el uso de una amplia diversidad de materiales, moléculas y compuestos que requieren ser detectados (se describen detalles adicionales de los mismos posteriormente). A continuación se describen algunas aplicaciones ejemplificativas de la tecnología.

En un primer método ejemplificativo, representado en el diagrama de proceso de la figura 2A, una primera etapa proporciona un medio de registro holográfico inactivo, por ejemplo en forma de capa sobre un sustrato. El sustrato puede estar realizado, por ejemplo, en vidrio o plástico. A continuación se define un patrón sobre la capa de material inactivo mediante la aplicación selectiva de colorante, tal como se ilustra en la figura 2B. La aplicación del colorante activa las regiones de la capa inactiva en la que se ha definido el patrón. La posterior exposición de la superficie a un procedimiento de registro holográfico, por ejemplo utilizando el aparato indicado anteriormente, resulta en un patrón holográfico confinado a aquellas áreas definidas por la aplicación selectiva del colorante. Este método presenta una amplia diversidad de usos con fines de seguridad, autenticación y diseño gráfico e impresión.

Por ejemplo, en un primer método, puede proporcionarse el medio de registro holográfico inactivo, tal como se muestra en la figura 3, en un formato adecuado para escribir sobre el mismo. En un ejemplo, el medio de registro

holográfico inactivo puede proporcionarse como la tira para la firma en la parte posterior de una tarjeta de pago o como parte de un documento de identificación (por ejemplo pasaporte o carné de conducir) o incluso como sello corporativo u oficial sobre mercancía o papelería. Antes del uso general, el propietario de la tarjeta firma la tarjeta utilizando una tinta que comprende colorante. A continuación, la tarjeta puede someterse a exposición utilizando, por ejemplo, el aparato simple de registro holográfico descrito anteriormente. Una vez completada, la firma del propietario de la tarjeta se registra en forma de un holograma. Se apreciará que puede resultar más difícil interferir en dicha firma o alterarla que una firma basada en tinta convencional.

De manera similar, tal como se muestra en la figura 4, en lugar de una firma sobre una tarjeta de identificación, la tarjeta de identificación puede presentar una superficie mayor de material holográfico inactivo (correspondiente al tamaño de una huella digital). Durante la utilización, un usuario podría aplicar el dedo en una almohadilla de tinta que contiene colorante y después imprimir el dedo en el área de medio de registro holográfico inactivo. La exposición utilizando el aparato simple de registro holográfico descrito anteriormente resulta en el registro de la huella digital del usuario en forma de un holograma. El procedimiento también podría utilizarse para autenticar sellos y sellos.

Se apreciará que una diversidad de otros usos de dicho procedimiento pueden aplicarse a seguridad y autenticación. A este respecto, puede proporcionarse el colorante de manera muy similar a otras tintas. Por ejemplo, tal como se muestra en la figura 5, la tinta se proporciona en una impresora de inyección de tinta para la utilización en un procedimiento de impresión de inyección de tinta. En este tipo de dispositivo, puede proporcionarse un elemento holográfico en cualquier patrón impreso (por ejemplo un logotipo de empresa) que, al exponerlo a un procedimiento de registro holográfico, proporciona un nivel significativamente mejorado de autenticación y seguridad comparado con un documento más simple impreso con tinta.

Los hologramas resultantes pueden seleccionarse para ser abiertos (es decir, visibles a ojo desnudo) y/o ocultos (es decir, que requieren equipos especiales para ser vistos, por ejemplo operables únicamente la región infrarroja del espectro).

Dichos elementos de seguridad en efecto revelan la presencia del colorante en áreas en las que se ha depositado el colorante sobre el material de registro holográfico inactivo y en las que se ha utilizado un posterior registro holográfico para crear un patrón holográfico sobre el patrón resultante de material activado.

Se apreciará que resulta posible una amplia diversidad de otras aplicaciones mediante la aplicación selectiva de un componente esencial en un medio de registro holográfico de otro modo inactivo. Por ejemplo, un artista podría utilizar el colorante como pintura sobre una tela que comprende una capa de material de registro holográfico inactivo con la posterior exposición en un procedimiento de registro holográfico que resulta en una obra de arte única, tal como se muestra en la figura 6.

Se apreciará que un aspecto fundamental de la presente solicitud es que conjunta un material de registro holográfico inactivo con uno o más componentes ausentes necesarios para activar el material de registro holográfico y el posterior registro de un holograma. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, aunque las formas de realización ejemplificativas anteriormente indicadas describen la provisión del material de registro holográfico inactivo como primera etapa y la posterior provisión de los componentes ausentes, igualmente se apreciará que el componente ausente, es decir, el colorante, puede proporcionarse en forma de una capa seca, por ejemplo sobre un sustrato, tal como se muestra en 7, como primera etapa con el polímero inactivo proporcionado sobre un segundo sustrato que se pone en contacto con el primer sustrato.

De manera similar, en un ejemplo no reivindicado, se apreciará que el componente ausente, por ejemplo el colorante, puede proporcionarse en forma de una capa seca, por ejemplo sobre un sustrato, tal como se muestra en 8, poniendo en contacto con la misma el material de registro holográfico inactivo (por ejemplo vertiendo una mezcla líquida de monómero y generador de radicales sobre una superficie a la que se une el colorante).

La fotopolimerización y la creación de una rejilla de difracción holográfica en una localización particular sobre la capa, es evidencia de la presencia de la molécula de interés en esa localización. La rejilla holográfica se detecta a partir de su capacidad de difractar un haz de luz incidente en la dirección de un fotodetector o del observador.

Las aplicaciones de biodetección son bien conocidas en la técnica y se dispone de una amplia diversidad de técnicas para la detección de moléculas biológicas, tales como, por ejemplo, enzimas, proteínas y ácidos nucleicos. Una técnica utilizada comúnmente utiliza sistemas de detección de fluorescencia para identificar moléculas marcadas. Estas técnicas pueden aplicarse fácilmente al presente sistema ya que las técnicas de detección de fluorescencia existentes utilizan, por ejemplo, colorantes de xanteno y otros colorantes similares (para la detección mediante sistemas de detección de la fluorescencia). La presente solicitud puede adoptarse para dichos fines para determinar si una biomolécula marcada se encuentra presente en una solución aplicando la solución sobre una capa de polímero inactivo y exponiendo la capa a un procedimiento de registro holográfico tal como se ha indicado anteriormente. En el caso de que aparezca un holograma/rejilla, se encuentra presente la biomolécula. En caso de no aparecer, la biomolécula no se encuentra presente. En contraste con muchos sistemas de detección de la

fluorescencia, la presente solicitud proporciona un registro físico permanente, que puede conectarse con dispositivos de registro, procesamiento y almacenamiento de imágenes. Además, el resultado puede ser visible a ojo desnudo.

A continuación se proporciona un ejemplo de un sistema algo más complejo y versátil que también puede utilizarse para someter a ensayo un abanico de biomoléculas. En aras de la simplicidad, los presentes inventores restringen el ejemplo a la detección de ácidos nucleicos, aunque el experto en la materia apreciará que puede aplicarse a cualquier biomolécula para la que se disponga de un marcaje adecuado.

En particular, se considera el ejemplo de identificar un gen particular en una muestra de ADN. Tal como con la técnica anterior, la primera etapa es la extracción de ADN a partir de los núcleos de la muestra de células. Se conocen en la técnica varios métodos diferentes para llevar a cabo lo anterior, típicamente mediante la utilización de un compuesto químico apropiado. Tras la extracción, la muestra se purifica y se desnaturalizan (se separan) las cadenas sencillas, para lo que el método utilizado más comúnmente es el calentamiento de la muestra de ADN a 95°C. Tras purificar y desnaturalizar las cadenas del ADN, la etapa siguiente es la amplificación para garantizar una cantidad suficiente de muestra para la detección y medición. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica aplicada comúnmente para ello. Como parte del procedimiento de amplificación por PCR, las cadenas sencillas típicamente se etiquetan con una cadena diana complementaria que presenta un colorante fluorescente unido. La cadena diana complementaria sólo se unirá a la cadena que es la diana. La presencia de la cadena diana seguidamente puede detectarse mediante métodos de detección fluorescente.

Alternativamente a la detección fluorescente, puede aplicarse a la identificación génica el procedimiento de registro holográfico descrito anteriormente. El detector ejemplificativo comprende una capa de material de registro holográfico inactivo, tal como se ha indicado anteriormente. Además, en la presente forma de realización ejemplificativa, la capa comprende además cadenas de ADN complementarias a las que deben identificarse.

Utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, se extrae el ADN de la muestra que debe someterse a ensayo y se separa en cadenas. También pueden utilizarse otros procedimientos, tales como la purificación y la amplificación, los cuales son bien conocidos. En el caso de que la magnificación inherente al método de la presente solicitud resulte suficiente, puede no resultar necesaria la etapa de amplificación. A continuación se unen moléculas de colorante a las cadenas de ADN de la muestra a modo de marcajes.

Tras poner en contacto la muestra marcada con la capa de material holográfico inactivo, las cadenas complementarias en la muestra y sobre la capa inactiva se unirán y en efecto resultarán capturadas en localizaciones particulares. A continuación puede utilizarse una o más etapas de lavado para eliminar el ADN y marcajes no unidos. Esto deja las moléculas marcadas con colorante unidas en ubicaciones específicas sobre la capa inactiva.

La exposición a un procedimiento de registro holográfico, tal como se ha mencionado anteriormente, producirá un holograma en todo sitio en el que se encuentren presentes las cadenas complementarias (y, por lo tanto, colorante).

De esta manera, por ejemplo resultaría posible proporcionar una micromatriz que presentase una diversidad de diferentes cadenas complementarias correspondientes a ADN que debe identificarse. Cada localización en la matriz se trata previamente para retener los marcajes unidos a diferentes cadenas de ADN que deben identificarse. De esta manera, podría utilizarse un único ensayo para identificar la presencia o ausencia de una pluralidad de genes diferentes en un único procedimiento. También podría resultar recomendable incluir un punto de referencia. Este punto de referencia se dota convenientemente de colorante de manera que pueda utilizarse para verificar que el procedimiento de registro holográfico ha funcionado correctamente. En algunas disposiciones pueden marcarse múltiples colorantes activos en diferentes sondas (multiplexado en el espacio, en dianas y en el tiempo), los colorantes activos individuales podrían activarse con la misma longitud de onda o con diferentes, y podrían comprobarse de manera cruzada su fluorescencia y fosforescencia con el desarrollo de un holograma, es decir podría proporcionarse un sistema de detección dual (fluorescente y holográfico).

Dicha tecnología podría utilizarse en un amplio abanico de bioensayos y biosensores que se basan principalmente en la fluorescencia o la fosforescencia, es decir, en los que el procedimiento holográfico sustituya o complementa la detección fluorescente o fosforescente.

Entre las aplicaciones podrían incluirse ensayos basados en ácidos nucleicos, anticuerpos, enzimas y ligandos, por ejemplo la hibridación de ácidos nucleicos, la PCR, las micromatrices de ADN y proteínas, los inmunoensayos, los ensayos de detección de oxígeno y los ensayos de viabilidad celular.

También se encuentra comprendida una aplicación en la que la fluorescencia o la fosforescencia es un componente de ensayo clave o un subproducto de, por ejemplo, la hibridación fluorescente *in situ*, la calidad e integridad de un alimento (producto alimentario), el análisis farmacocinético, el cribado de toxicidad y el análisis medioambiental. En cada caso, el principio de funcionamiento es el mismo, es decir, la utilización de un marcaje que comprende un componente esencial de un material de registro holográfico de otro modo inactivo y el intento de registrar un holograma en el mismo.

El método también puede utilizarse para detectar analitos particulares. A continuación se describe un método directo ejemplificativo para ello haciendo referencia a la figura 10, en la que una primera etapa proporciona la muestra que debe someterse a ensayo en un recipiente adecuado. En la segunda etapa se unen los analitos a la superficie del recipiente. A continuación, se introduce una sonda marcada de colorante activo (por ejemplo un anticuerpo o ligando con diana específicamente en el analito que debe detectarse). Esta sonda se une a los analitos. La posterior etapa de lavado elimina cualquier sonda no unida. Seguidamente puede introducirse el material de registro holográfico inactivo y someterse el recipiente a un procedimiento de registro holográfico tal como se ha descrito anteriormente (no representado). Alternativamente, la solución de ensayo puede verse sobre la capa del material de registro holográfico. La presencia de un holograma indica la presencia del analito. Se hace referencia al método como método directo, ya que el colorante se une directamente (mediante la sonda) al analito.

Un enfoque alternativo es utilizar un método indirecto. En el método indirecto, se utilizan dos sondas; la primera sonda se utiliza con diana el analito, mientras que la segunda sonda, que presenta un colorante unido, se utiliza con diana la primera sonda. Se muestra en la figura 11 un método ejemplificativo de detección indirecta. En el método indirecto, la sonda primaria podría ser un ácido nucleico, una sustancia, un anticuerpo, un ligando, etc. con diana en el analito deseado. Se utiliza una etapa de lavado para eliminar cualquiera de las primeras sondas no unidas. Tras el lavado, se introduce una segunda sonda. La segunda sonda puede ser un anticuerpo o ligando marcado con colorante activo, que, a su vez, presenta como diana la primera sonda. Una etapa de lavado adicional elimina cualquier segunda sonda no unida. A continuación, puede introducirse el material de registro holográfico inactivo. El material de registro holográfico seguidamente puede someterse a un procedimiento de registro holográfico tal como se ha descrito anteriormente (no representado). Alternativamente, la solución de ensayo puede verse sobre una capa de material de registro holográfico. La presencia de un holograma indica la presencia del analito. Se hace referencia al método como método indirecto porque el colorante se une indirectamente a la sonda secundaria, la cual se une a la sonda primaria, la cual se une al analito. Esto proporciona además el potencial de amplificación de la señal, ya que pueden existir múltiples sitios de unión en la sonda primaria a los que pueden unirse muchas sondas secundarias.

La presente solicitud puede utilizarse en lugar de los sistemas de detección actuales en cualquier contexto en el que un colorante activo pueda sustituir los compuestos fluorescentes o fosforescentes utilizados comúnmente. El fotopolímero puede sustituir o complementar la instrumentación de detección fluorescente utilizada comúnmente, por ejemplo espectrofluorímetros, microscopios de fluorescencia, escáners de fluorescencia, lectores de microplacas y citómetros de flujo.

La presente solicitud puede utilizarse además en la monitorización medioambiental. Convencionalmente se añaden colorantes fluorescentes a fuentes de agua de manera que pueda trazarse el camino que sigue un flujo de agua. La detección fluorescente (por ejemplo iluminando con una luz UV) en un punto que se sospecha que se encuentra en el camino de flujo confirma si éste es el caso o no. En lugar de muestrear el agua utilizando la fluorescencia, puede aplicarse una gota de la muestra de agua sobre un material holográfico inactivo tal como se ha descrito anteriormente e implementarse la técnica de registro holográfico. A continuación, puede inspeccionarse el material holográfico con el fin de obtener una determinación inmediata de si el colorante se encontraba presente en la muestra o no.

De manera similar, en un ejemplo no reivindicado, también puede configurarse el sensor para la utilización bajo condiciones de monitorización medioambiental. En este tipo de dispositivo, el sensor puede estar provisto de dos partes. La primera parte presentaría el material de registro holográfico inactivo y la segunda presentaría el material necesario para activar el material de registro holográfico. Convenientemente, las dos partes se encuentran dispuestas de manera que puedan aplicarse directamente de forma conjunta. Por ejemplo, cada una de las partes puede proporcionarse en forma de cinta, que podrían aplicarse conjuntamente. Alternativamente, una de las partes podría proporcionarse en forma de una capa sólida sobre el envase del material que debe monitorizarse y la segunda parte podría proporcionarse en forma de cinta. En contraste con los métodos anteriormente descritos, en los que la exposición al procedimiento de registro holográfico es una etapa posterior relativamente inmediata, el detector medioambiental funciona activando el material mediante la reunión de las partes no exponiéndolas durante un periodo de tiempo al procedimiento de registro holográfico. De esta manera, pueden observarse las condiciones medioambientales que pueden afectar al comportamiento del material de registro holográfico mediante los intentos sucesivos de registrar un holograma. Los materiales seleccionados para las dos partes pueden seleccionarse convenientemente para que resulten influidos por condiciones particulares, por ejemplo la temperatura, la humedad o la exposición a la luz. En este dispositivo, las dos partes se mantienen separadas y únicamente se unen en el caso de que se requiera la monitorización de una condición.

El detector ejemplificativo de la presente solicitud utiliza la polimerización de cadena como procedimiento de amplificación para la detección de una diana. Una molécula de colorante y un fotón inician reunidos un procedimiento químico que inicia la polimerización de cadena, resultando en la conversión de muchos miles de moléculas de monómero. Dicha amplificación de señal puede resultar significativamente ventajoso en determinadas aplicaciones en las que la concentración de analito es reducida.

Otra ventaja es que el detector dado a conocer en la presente memoria no es reversible. El material de registro holográfico fotopolimerizable ejemplificativo resulta particularmente adecuado para la utilización en el detector porque: (a) se autorrevela y no requiere tratamiento químico para que resulte visible el resultado, y (b) se produce un efecto inherente de amplificación debido al hecho de que una molécula de colorante inicia una reacción de polimerización de cadena. El detector proporciona información tanto cuantitativa como cualitativa, puede utilizarse fácil y rápidamente con una cantidad limitada de equipos especializados y puede integrarse con diferentes tecnologías. Además, los resultados pueden identificarse mediante inspección visual por un usuario tanto directamente como, dependiendo de la aplicación, tras la adición de equipos adicionales (por ejemplo una cámara CCD y equipos asociados de procesamiento de imágenes y software informático).

5

10

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección de la ubicación de un colorante, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
 - 5 proporcionar una capa seca que es activable en un estado fotosensible por la presencia del colorante,
 - poner en contacto el colorante con la capa seca,
 - 10 exponer la capa seca a un procedimiento de registro holográfico, utilizando la presencia resultante de un holograma para detectar la presencia del colorante e inferir dónde se ubica el colorante a partir de donde se ha formado una rejilla holográfica.
2. Procedimiento de detección de la ubicación de un colorante según la reivindicación 1, en el que la capa seca está prevista como una capa sobre un sustrato.
- 15 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la capa seca comprende un generador de radicales libres y por lo menos un monómero.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la capa seca comprende un polímero.
- 20 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el polímero es el alcohol polivinílico.
6. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el polímero es una mezcla de alcohol polivinílico y polivinilpirrolidona.
- 25 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de puesta en contacto comprende modelar la capa seca con el colorante.

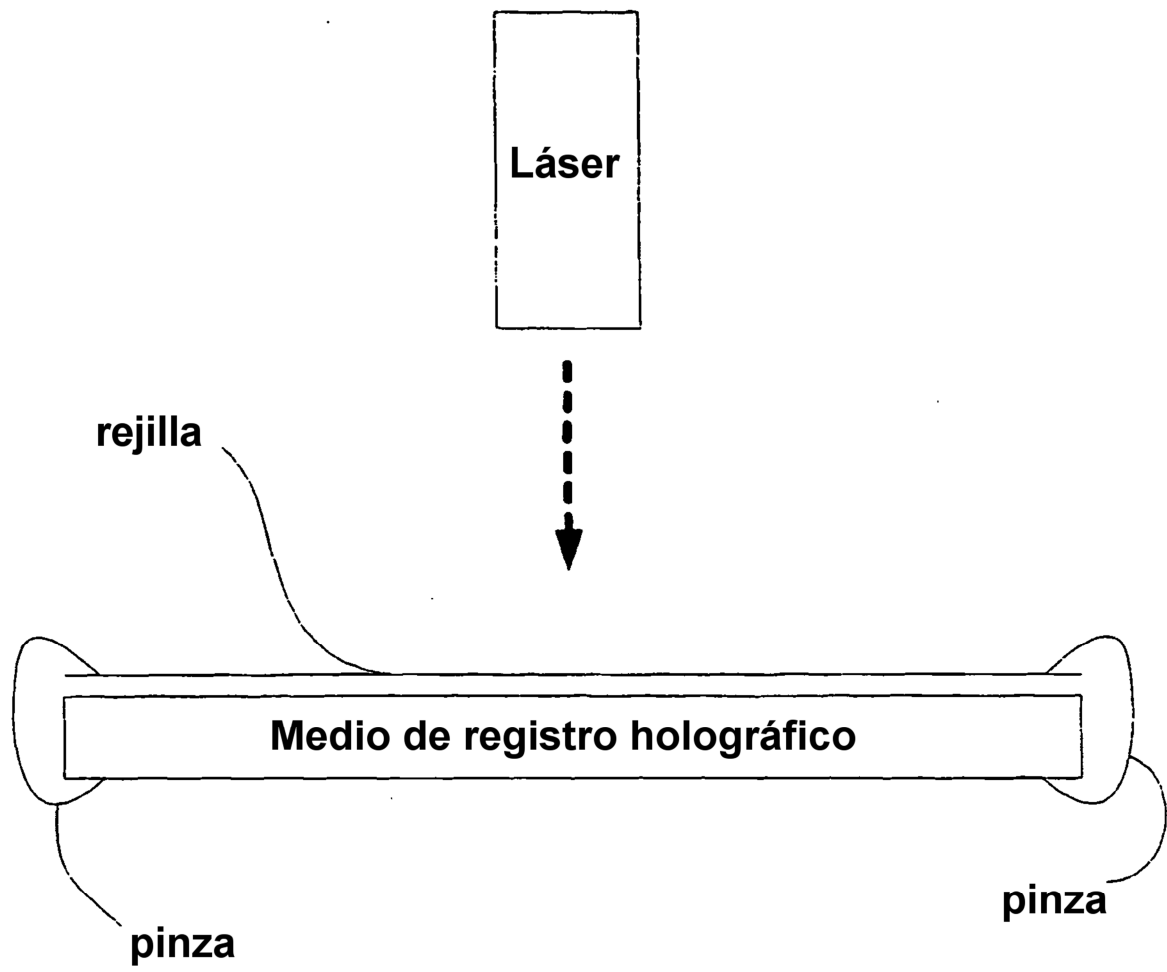


Figura 1

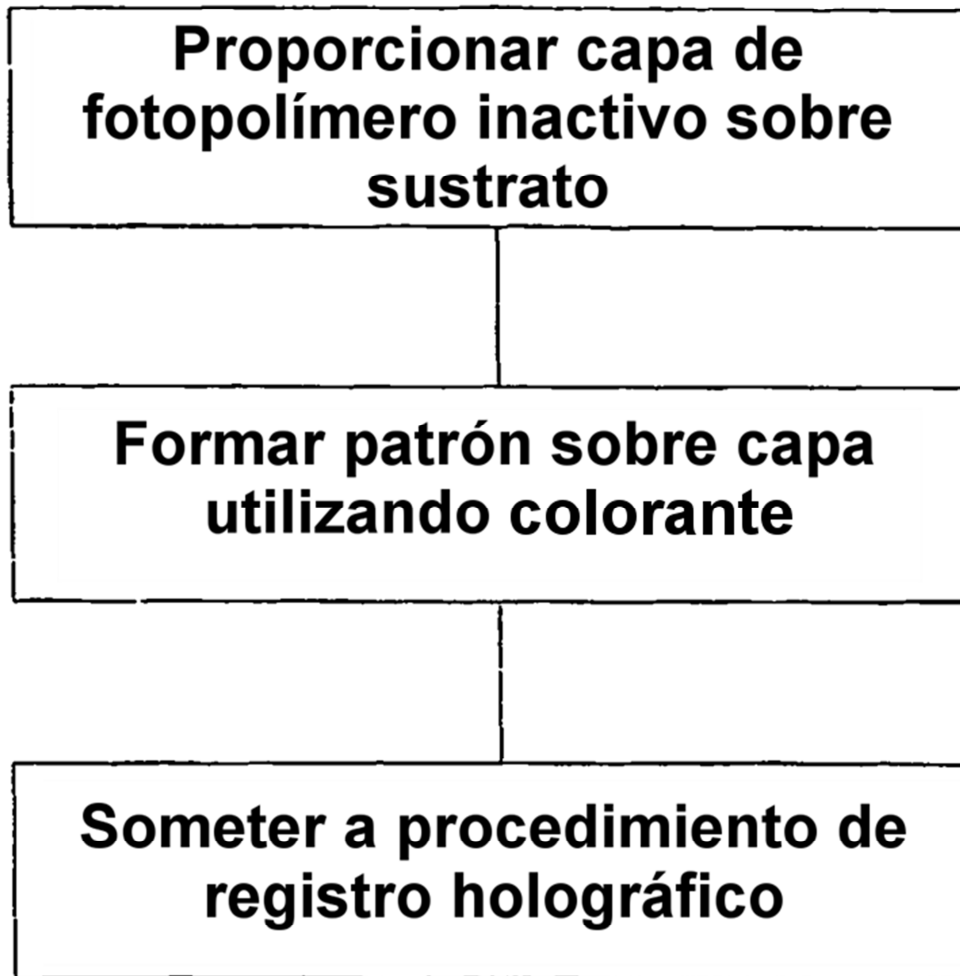


Figura 2A

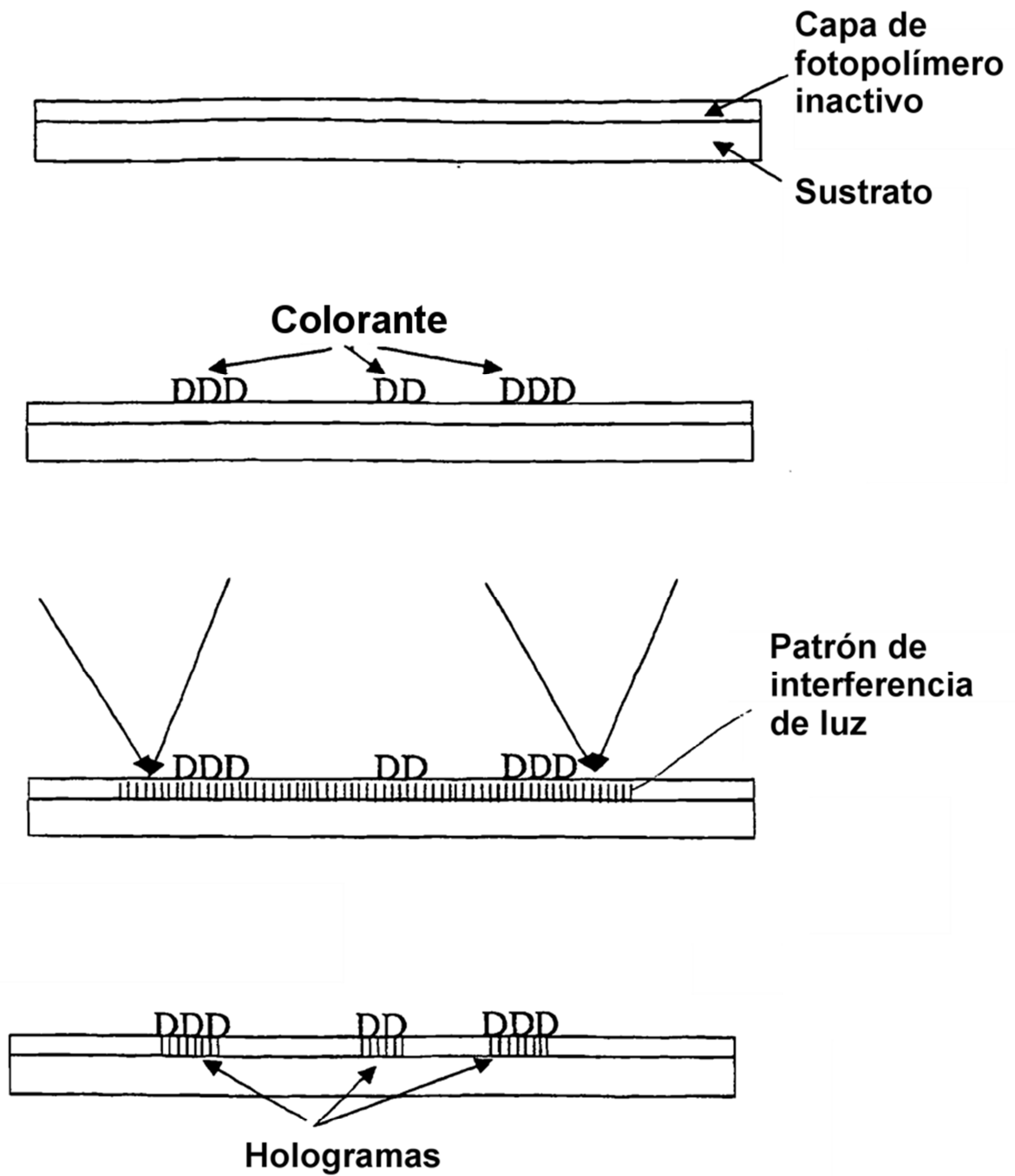
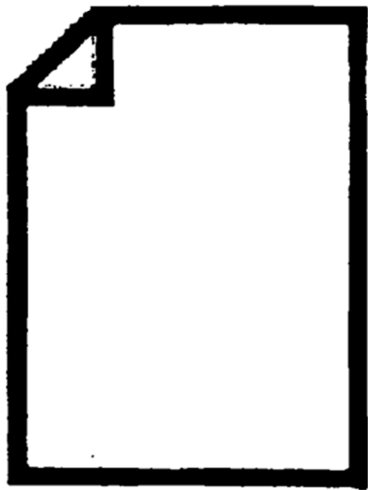


Figura 2B



**Colorante activo en tinta de
bolígrafo**



Superficie de fotopolímero

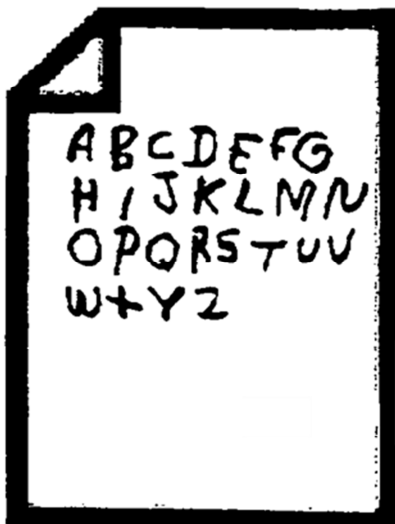


Imagen escrita holográfica

Figura 3

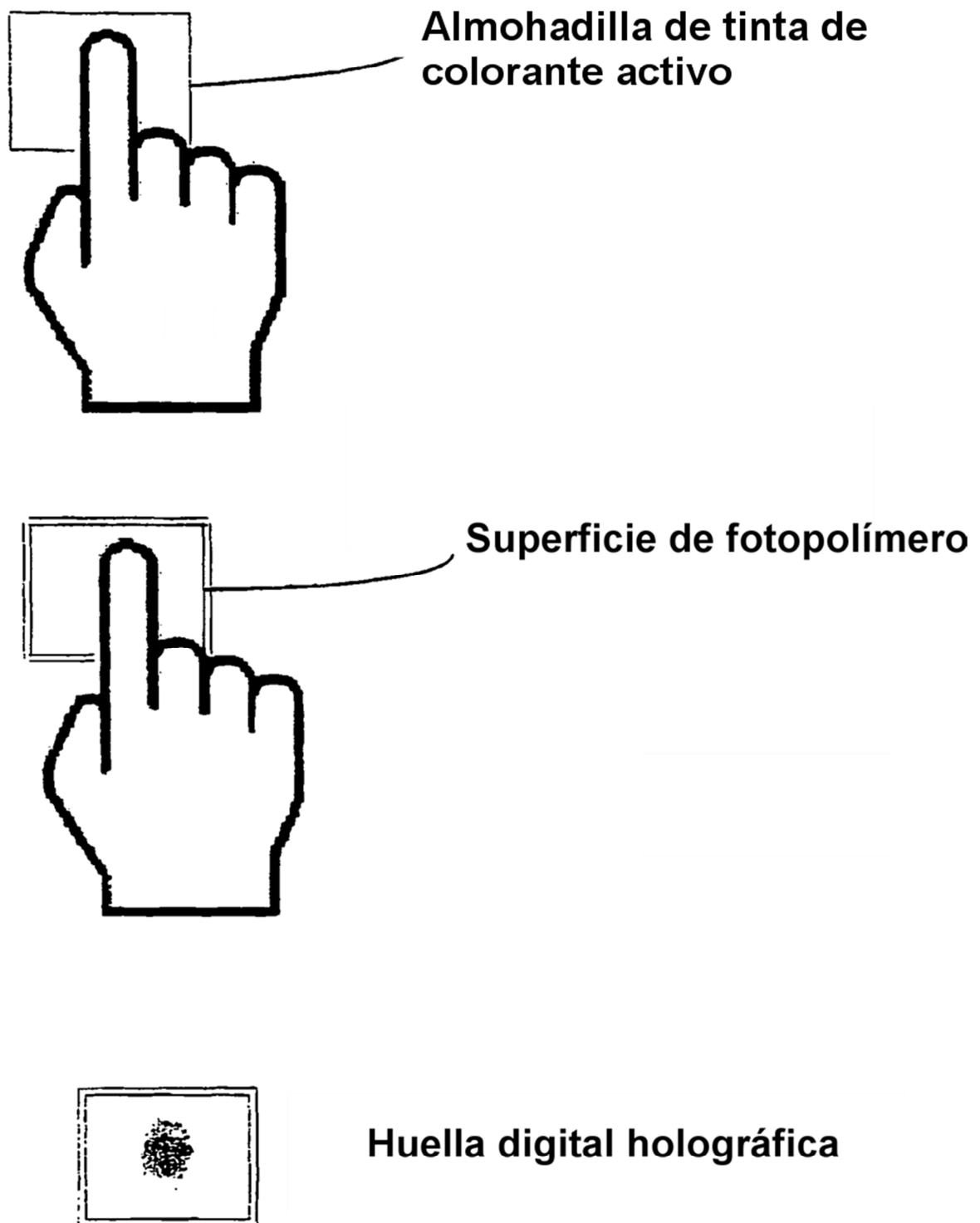


Figura 4

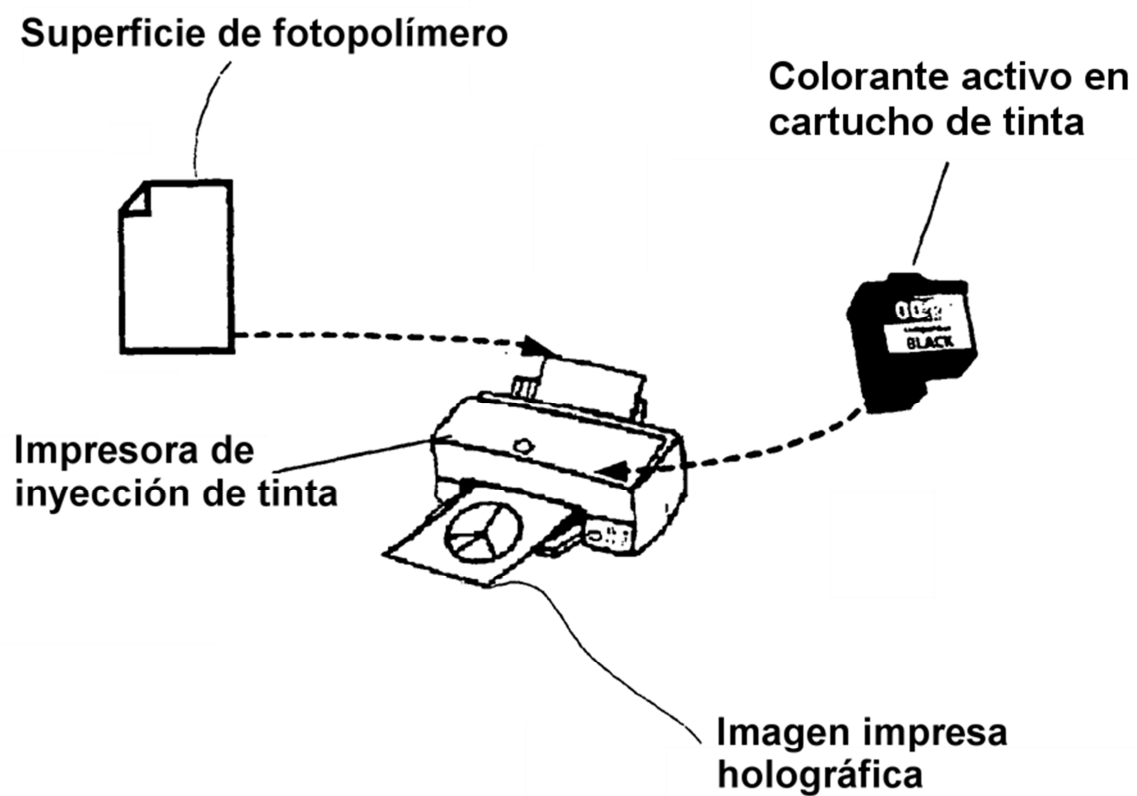
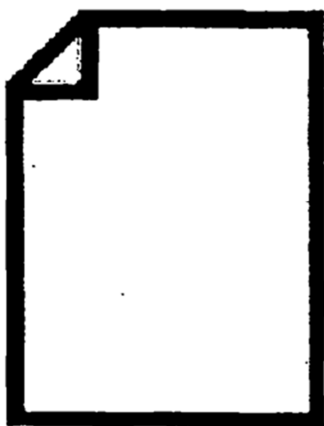


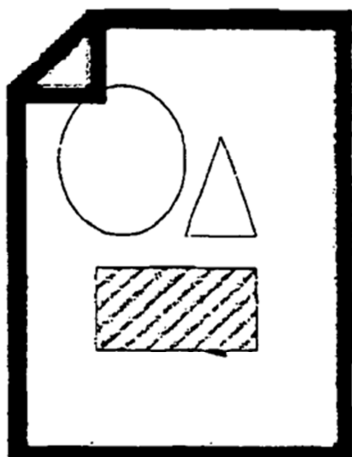
Figura 5



**Colorante activo en
pintura**



**Superficie de
fotopolímero**



Dibujo holográfico

Figura 6

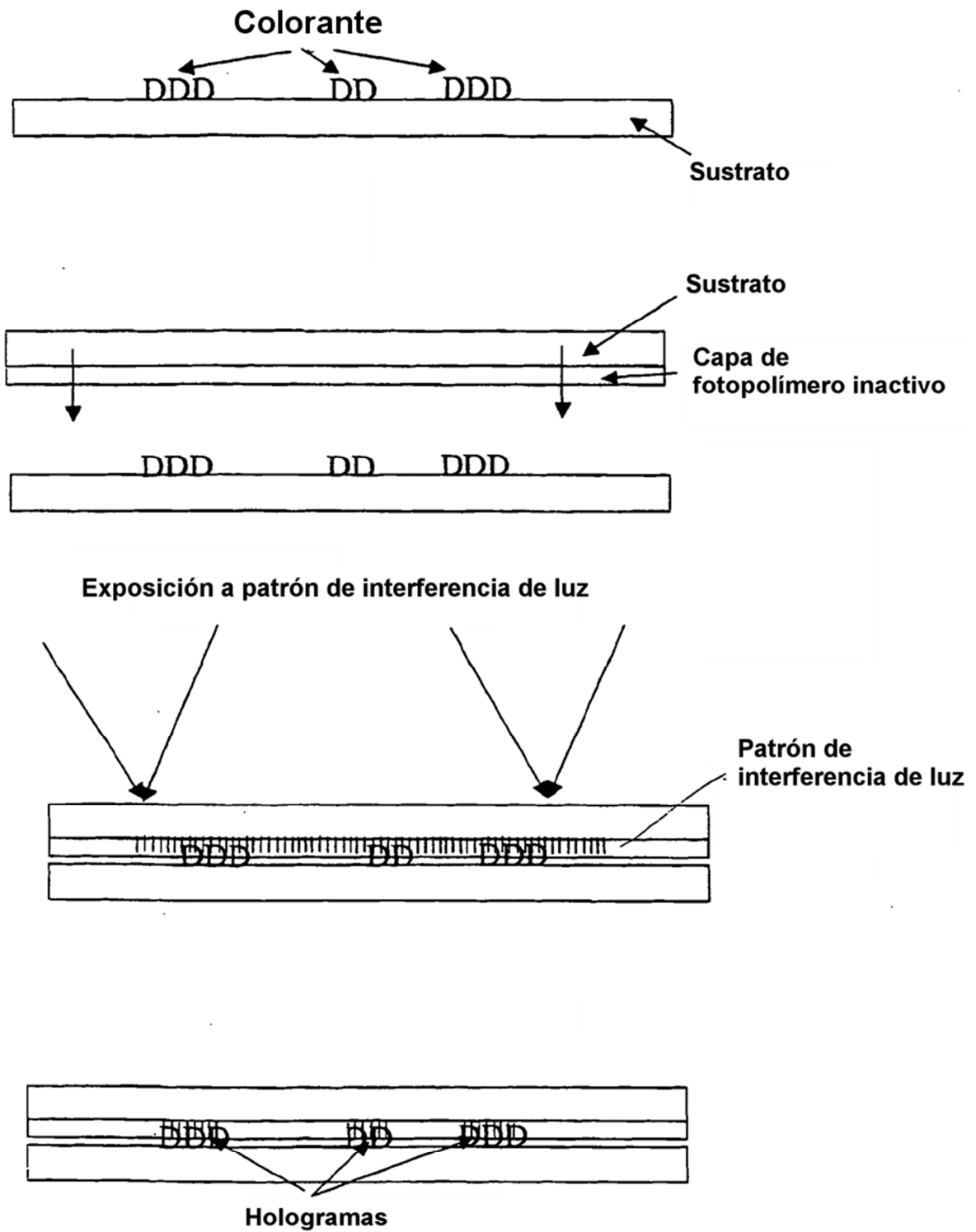


Figura 7

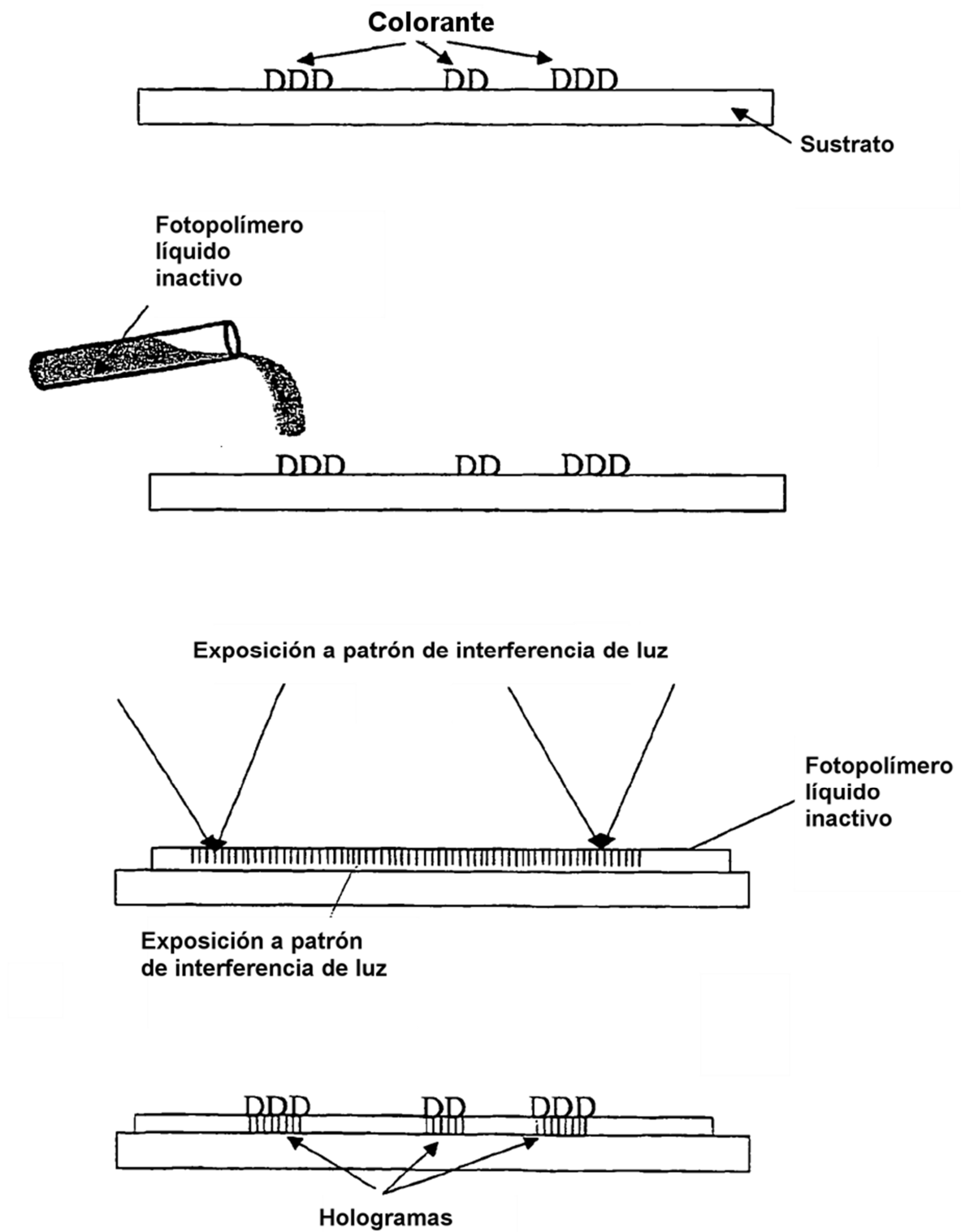


Figura 8

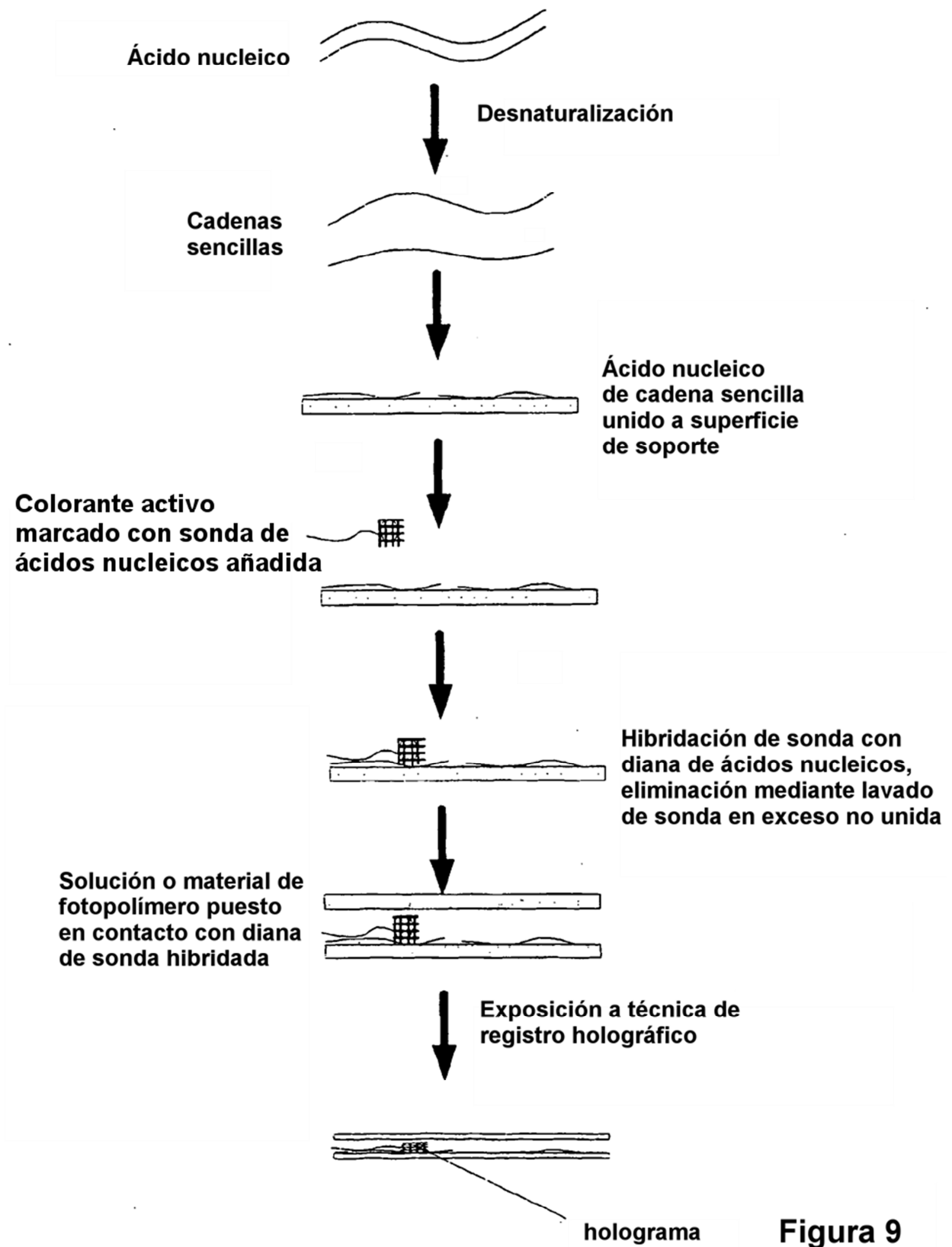


Figura 9

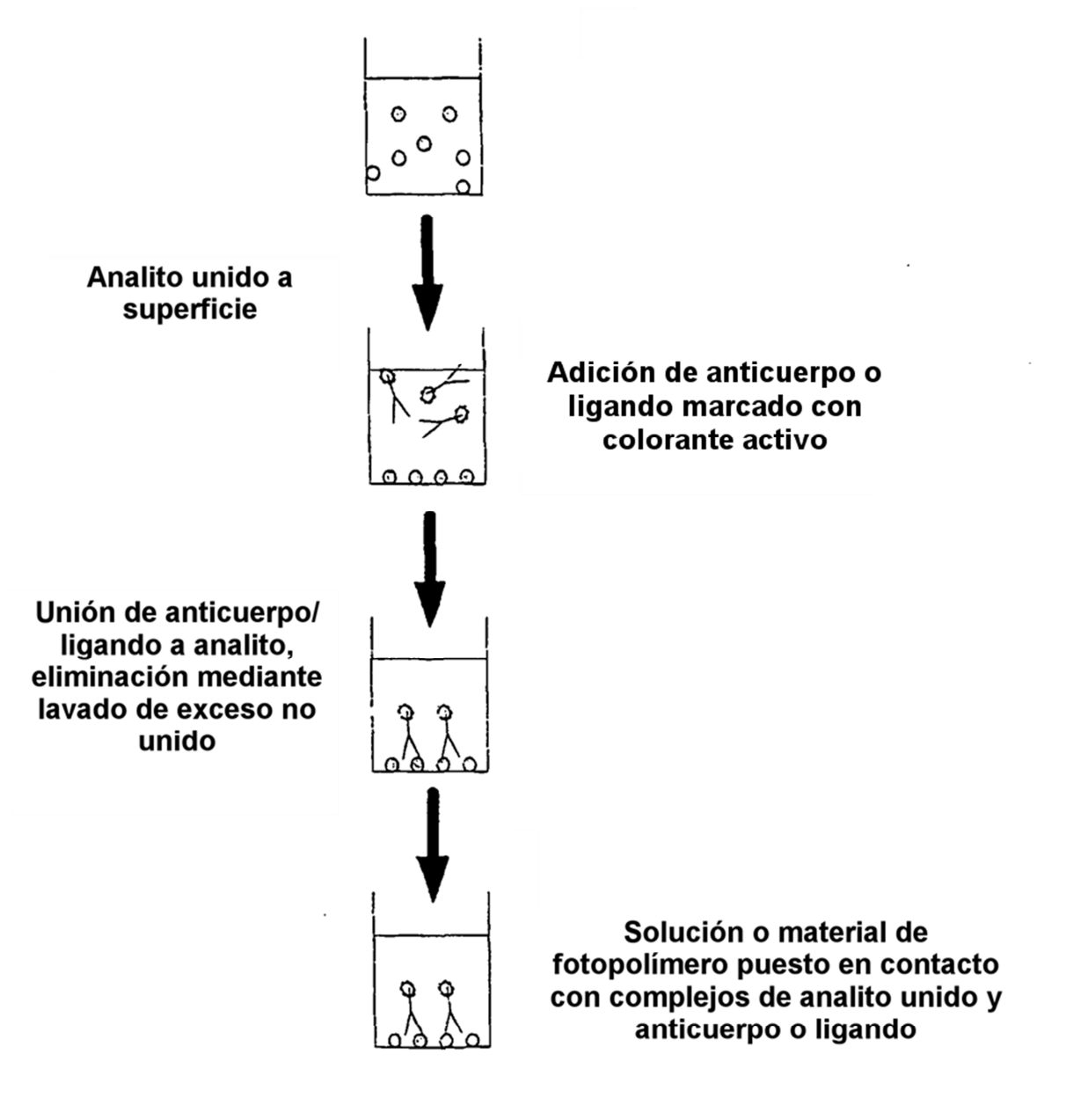


Figura 10

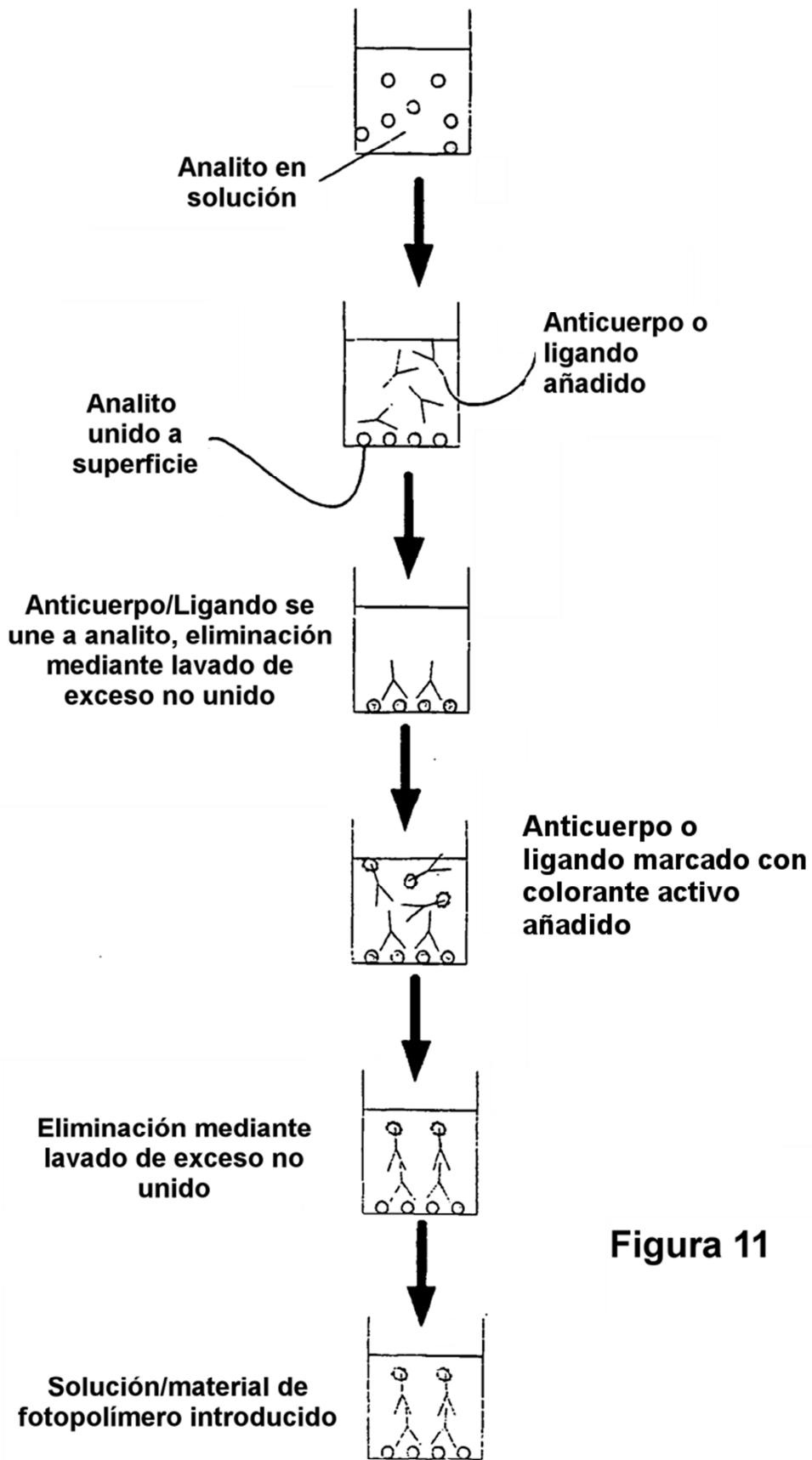


Figura 11