



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0717430-6 A2



(22) Data de Depósito: 09/09/2007
(43) Data da Publicação: 12/11/2013
(RPI 2236)

(51) *Int.Cl.*:
C12Q 1/00
G01N 27/30
G01N 33/487

(54) Título: SISTEMA DE BIOSSENSOR TENDO ESTABILIDADE E DESEMPENHO DE HEMATÓCRITOS MAIORES

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 22/09/2006 US 60/846.688

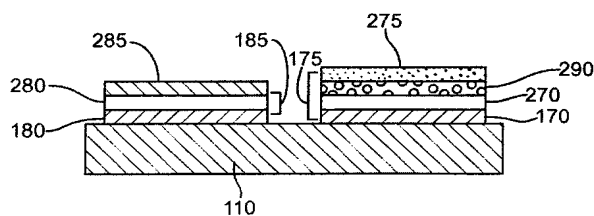
(73) Titular(es): Bayer Healthcare LLC

(72) Inventor(es): Christine D. Nelson, Eric Maurer, Hope Spradlin, Huan-Ping Wu

(74) Procurador(es): ISABELLA CARDOZO

(86) Pedido Internacional: PCT US2007077955 de 09/09/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/036516 de 27/03/2008



"SISTEMA DE BIOSSENSOR TENDO ESTABILIDADE E DESEMPENHO DE HEMATÓCRITOS MAIORES"

REFERÊNCIA A PEDIDOS DE PATENTES RELACIONADOS

Este pedido de patente reivindica o benefício do pedido de patente provisório U.S. 60/846.688, intitulado "Biosensor System Having Enhanced Stability and Hematocrit Performance", depositado em 22 de setembro de 2006, que é incorporado na totalidade por referência.

ANTECEDENTES

Os biossensores proporcionam uma análise de um fluido biológico, tal como sangue total, urina ou saliva. Tipicamente, um biossensor analisa uma amostra de fluido biológico, para determinar a concentração de um ou mais analisados, tais como glicose, ácido úrico, lactato, colesterol ou bilirubina, no fluido biológico. A análise é útil na diagnose e tratamento de anormalidades fisiológicas. Por exemplo, um indivíduo diabético pode usar um biossensor, para determinar o nível de glicose no sangue total para ajustes na dieta e/ou medicação.

Os biossensores podem ser implementados por uso de dispositivos de bancada, portáteis e assemelhados. Os dispositivos portáteis podem ser manuais. Os biossensores podem ser projetados para analisar um ou mais analisados e podem usar diferentes volumes de fluidos biológicos. Alguns biossensores podem analisar uma única gota de sangue total, tal como de um volume de 0,25 - 15 microlitros (μL). Os exemplos de dispositivos de medida portáteis incluem os medidores Ascensia Breeze[®] e Elite[®] da Bayer Corporation; os biossensores Precision[®] disponíveis da Abbott em Abbott Park, Illinois; os biossensores Accucheck[®] disponíveis da Roche em Indianapolis, Indiana; e os biossensores OneTouch Ultra[®] disponíveis da Lifescan em Milpites, Califórnia. Os exemplos de dispositivos de medida de bancada incluem o analisador BAS 100B disponível da BAS Instruments em West Lafayette, Indiana; a estação de trabalho eletroquímica da CH Instruments, disponível da CH Instruments, Texas; a estação de trabalho eletroquímica da Cypress disponível da Cypress Systems em Lawrence, Kansas; e o instrumento eletroquímico da EG&G disponível da Princeton Research Instruments em Princeton, Nova Jersey.

Os biossensores medem usualmente um sinal elétrico, para determinar a concentração de analisado em uma amostra do fluido biológico. O analisado sofre tipicamente uma reação de oxidação / redução ou oxirredução, quando um sinal de entrada é aplicado à matriz. Uma enzima ou uma espécie similar pode ser adicionada à amostra para acentuar a reação de oxirredução. O sinal de entrada é tipicamente um sinal elétrico, tal como uma corrente ou um potencial. A reação de oxirredução gera um sinal de saída, em resposta ao sinal de entrada. O sinal de saída é usualmente um sinal elétrico, tal como uma corrente ou um potencial, que pode ser medido e correlacionado com a concentração do analisado no

fluido biológico.

Muitos biossensores têm um dispositivo de medida e uma tira sensora. Uma amostra do fluido biológico é introduzida em uma câmara de amostra na tira sensora. A tira sensora é colocada no dispositivo de medida para análise. O dispositivo de medida tem usualmente contatos elétricos que conectam os condutores elétricos à tira sensora. Os condutores elétricos são conectados aos eletrodos de medida, contra e/ou outros eletrodos que se estendem em uma câmara de amostra. O dispositivo de medida aplica o sinal de entrada pelos contatos elétricos aos condutores elétricos na tira sensora. Os condutores elétricos transportam o sinal de entrada pelos eletrodos para uma amostra depositada na câmara de amostra. A reação de oxirredução do analisado gera um sinal de saída, em resposta ao sinal de entrada. O dispositivo de medida determina a concentração do analisado, em resposta ao sinal de saída.

A tira sensora pode incluir reagentes que reagem com o analisado na amostra de fluido biológico. Os reagentes podem incluir um agente ionizante, para facilitar a reação de oxirredução do analisado, bem como mediadores ou outras substâncias que auxiliam na transferência de elétrons entre o analisado e o condutor. O agente ionizante pode ser uma oxidorreductase, tal como uma enzima específica de analisado, que catalisa a oxidação de glicose em uma amostra de sangue total. Os reagentes podem incluir um aglutinante, que retém a enzima e o mediador conjuntamente.

Uma desvantagem das composições dos reagentes usadas em biossensores convencionais é a variação no desempenho de medida, exatidão ou precisão, que ocorre quando a tira sensora é armazenada. Os componentes eletrônicos e os métodos de análise, usados pelo dispositivo de medida para determinar a concentração de analisado da amostra, são geralmente selecionados em vista da composição do reagente na tira sensora funcionando como manufaturada inicialmente. No entanto, após transporte e armazenamento em prateleiras de armazenamento, a composição do reagente degrada com o tempo e a temperatura. Essa variação na química da composição do reagente pode resultar em uma redução do desempenho da medida.

Para aumentar a estabilidade de longo prazo de composições de reagentes de biossensores, os biossensores convencionais se baseiam, de uma maneira geral, em um excesso substancial de enzima e mediador em relação à quantidade desses reagentes necessária para analisar a amostra. Esperando-se que esses reagentes vão se degradar com o tempo, as composições de reagentes convencionais incluem proporções substancialmente maiores de enzima e/ou mediador do que as necessárias para a reação estequiométrica com o analisado. Além de aumentar o custo do biossensor pelo uso de reagentes de sacrifício, os reagentes desnecessários podem requerer um maior volume de amostra, um tempo de análise mais longo e uma diminuição do desempenho de medida do biossensor, devido

aos muitos fatores.

Por exemplo, a publicação PCT WO 88/03270 descreve uma densidade de deposição total de 3 mg/cm^2 ($30 \text{ } \mu\text{g/mm}^2$) com um método de impressão por tela. A proporção relativa de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ foi de 57,7%, tampão de fosfato a 28,8% e glicose oxidase (GO) a 3,6%.

5 Traduzindo esses percentuais em densidades de deposição na tira sensora, resulta em uma densidade de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ de $8,64 \text{ } \mu\text{g/mm}^2$ e uma densidade de GO de $1,08 \text{ } \mu\text{g/mm}^2$. Em outro exemplo, coluna 17, linhas 25 - 35 da patente U.S. 4.711.245, descreve-se a deposição de $15 \text{ } \mu\text{L}$ de uma solução $0,1 \text{ M}$ de 1,1'-dimetilferroceno em tolueno em um eletrodo a disco tendo um diâmetro de 4 mm . Com um peso molecular de 214 M.U. , o mediador de 1,1'-

10 dimetilferroceno foi aplicado a uma densidade de deposição de $25,5 \text{ } \mu\text{g/mm}^2$ [$(15 \text{ } \mu\text{L} * 0,1 \text{ M} * 214 \text{ g / mol}) / (2^2 * 3,14 \text{ mm}^2) = 25,5 \text{ } \mu\text{g/mm}^2$]. Em um outro exemplo, a patente U.S. 5.958.199 descreve a deposição no eletrodo sensor de $4 \text{ } \mu\text{L}$ de uma solução incluindo 40 mg de GO, 16 mg de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e 20 mg de CMC em 1 mL de água. Nesse caso, as densidades de deposição foram $6,67 \text{ } \mu\text{g/mm}^2$ para GO, $10,67 \text{ } \mu\text{g/mm}^2$ para $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e $13,33$

15 $\mu\text{g/mm}^2$ para CMC, com uma área de eletrodo (área de deposição) estimada de 6 mm^2 . Em um outro exemplo, a patente U.S. 5.997.817 descreve uma formulação de reagente incluindo 59 g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ dissolvidos em aproximadamente 900 mL de água com outros ingredientes. Aproximadamente $4,5 \text{ } \mu\text{L}$ desse reagente foram depositados em uma abertura de $21,4 \text{ mm}^2$ ($3,2 * 6,7$), para produzir uma densidade de deposição do mediador de $13,96$

20 $\mu\text{g/mm}^2$ ($4,5 * 10^{-3} \text{ mL} * 59 \text{ g / 900 mL}$).

Em cada um desses exemplos, as composições dos reagentes tinham densidades de deposição de mediadores na faixa de $10 - 25 \text{ } \mu\text{g/mm}^2$, enquanto que a densidade de deposição de enzima foi na faixa de $1 - 6 \text{ } \mu\text{g/mm}^2$. Essa grande carga de mediador em relação à enzima pode ser atribuível à aplicação única da composição em ambos os eletrodos de

25 medida e o contraeletrodo. Dependendo do projeto do sensor, o mediador pode funcionar no contraeletrodo, para suportar a atividade eletroquímica no eletrodo de medida. Desse modo, uma única deposição de cobertura de reagente, cobrindo ambos os eletrodos, pode resultar em uma sobrecarga substancial do eletrodo de medida com o mediador.

Os exemplos mostram que excessos de enzima e mediador são usados para garantir que ingredientes ativos suficientes estão presentes para uma medida precisa de glicose. O uso de tiras sensoras produzidas com maiores quantidades de sacrifício de reagentes, após armazenamento de longo prazo, pode resultar na desvantagem de uma polarização no desempenho da medida. Essa polarização pode ser observada em pelo menos dois modos:

30 (1) um aumento de corrente de fundo com o tempo (afetando a interceptação de calibração; e (2) uma polarização na sensibilidade do sensor (afetando a inclinação da calibração).

35

Durante armazenamento, o mediador reduzido pode ser produzido de interações entre o mediador oxidado e o sistema enzimático e o polímero. Esse é um processo natural

que se acredita que seja governado pela termodinâmica. Quanto maior a proporção de mediador ou enzima, maior a proporção de mediador reduzido que é produzida. Na medida em que a concentração de mediador reduzido aumenta com o tempo, a corrente de fundo vai aumentar no sentido do fim da vida útil das tiras sensoras.

5 Múltiplos métodos foram propostos para reduzir o efeito da polarização no desempenho do sensor, antes de uso de uma tira sensora armazenada. Por exemplo, Genshaw et al. na patente U.S. 5.653.863 descreveu um método de uso de um pulso inicialmente longo, antes da análise, para oxidar o mediador que foi reduzido durante transporte e armazenamento. Ainda que efetivo, esse método alongou o tempo necessário para completar
10 a análise.

Desse modo, seria desejável aumentar a estabilidade de longo prazo da composição dos reagentes, para aperfeiçoar o desempenho de medida do biossensor, após transporte e armazenamento. Esse aumento da estabilidade de longo prazo pode aumentar o desempenho de medida do biossensor e proporcionar uma vida útil mais longa para as tiras
15 sensoras. Também seria desejável reduzir a quantidade de enzima e/ou mediador de sacrifício, incluída na composição de reagentes, e diminuir o tempo necessário para completar a análise.

Outra deficiência dos biossensores convencionais usados para medir a concentração de glicose em amostras de sangue total (WB) é referida como o "efeito de hematócrito".
20 Além da água e da glicose, as amostras WB contêm células sanguíneas vermelhas (RBC). O hematócrito (Hct) é o volume de uma amostra WB ocupado pelas RBC em relação ao volume total da amostra WB e é expresso frequentemente como um percentual. O efeito de hematócrito ocorre quando as células sanguíneas vermelhas bloqueiam a difusão do analisado e/ou do mediador a um ou mais eletrodos do biossensor. Uma vez que o sinal de saída
25 medido pelo biossensor corresponde à taxa de difusão do adesivo de alta resistência a desprendimento e/ou do mediador, as RBC podem incluir erro na análise por interferência com esse processo de difusão. Desse modo, quanto mais o percentual de hematócrito (volume de células sanguíneas vermelhas) se desvia da calibração do sistema de % de hematócrito para uma amostra WB, mais o hematócrito influi (contribuindo para o erro) nas leituras de
30 glicose obtidas do biossensor.

As amostras WB têm geralmente percentuais de hematócritos variando de 20 a 60%, com ~ 40% sendo a média. Se as amostras de WB contendo níveis de glicose idênticos, mas tendo hematócritos de 20, 40 e 60%, são testadas, três diferentes leituras de glicose vão ser registradas por um sistema baseado em um conjunto de constantes de calibração
35 (inclinação e interceptação de amostra WB contendo 40% de hematócritos, por exemplo). Ainda que as concentrações de glicose sejam iguais, o sistema vai registrar que amostra WB com 20% de hematócritos contém mais glicose do que uma amostra WB com 40% de

hematócritos, e que uma amostra WB com 60% de hematócritos contém menos glicose do que uma amostra WB com 40% de hematócritos, devido às RBC interferindo com a difusão do analisado e/ou mediador na superfície do eletrodo. Desse modo, os biossensores convencionais podem ser incapazes de distinguir entre uma concentração de analisado mais baixa e uma concentração de analisado mais alta, quando as RBC interferem com a difusão.

Os biossensores convencionais são geralmente configurados para registrar concentrações de glicose, considerando um teor de 40% de hematócritos para a amostra WB, independentemente do teor efetivo de hematócritos. Para esses sistemas, qualquer medida de glicose feita em uma amostra de sangue contendo menos ou mais de 40% de hematócritos vai incluir alguma influência de hematócritos atribuível ao efeito de hematócrito.

Vários métodos e técnicas foram propostos para reduzir a influência do efeito de hematócrito nas medidas de glicose. Por exemplo, Ohara et al., na patente U.S. 6.475.372, descreveu um método de uso da razão de correntes de um pulso de potencial de avanço e reverso, para compensar o efeito de hematócrito. McAleer et al., nas patentes U.S. 5.708.247 e 5.951.836, descreveu uma formulação de reagentes usando partículas de sílica para filtrar as RBC da superfície do eletrodo, para reduzir o efeito de hematócrito. Carter et al., na patente U.S. 5.628.890, descreveu um método de uso de um espaçamento amplo entre os eletrodos, em combinação com camadas de malha para distribuir a amostra de sangue, para reduzir o efeito de hematócrito.

Essas técnicas convencionais para reduzir a influência atribuível ao efeito de hematócrito incluíram: (a) co-deposição de um polímero para minimizar o efeito de hematócrito; (b) adição de vários tipos de sílica fundida, para aumentar o efeito de filtração para a camada polimérica; (c) coeficientes de compensação com base na razão de correntes de um pulso de potencial de avanço e um reverso; e (d) autocompensação por utilização da resistência da solução existente das amostras de sangue total. Embora esses métodos possam ser úteis, os sensores de glicose convencionais continuam a apresentar uma influência analítica significativa atribuível ao efeito de hematócrito, geralmente de cerca de 15 a 30%. Desse modo, seria desejável proporcionar sistemas para quantificar os analisados em fluidos biológicos, em particular, o teor de glicose de sangue total, o que reduz a influência do efeito de hematócrito.

RESUMO

Em um aspecto, uma tira sensora eletroquímica inclui uma base, um primeiro e um segundo eletrodos na base, e uma tampa na base. A tira inclui pelo menos uma primeira camada em um primeiro condutor, a primeira camada incluindo uma camada de reagentes, incluindo no máximo $8 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ de um mediador. A tira proporciona um valor de concentração determinado, tendo pelo menos uma influência de uma influência de estabilidade inferior a $\pm 10\%$, após armazenamento a 50°C por 2 semanas, quando comparado a uma tira com-

parativa armazenada a -20°C por 2 semanas, uma influência de hematócrito inferior a $\pm 10\%$ para as amostras de sangue total, incluindo de 20 a 60% de hematócrito, e uma razão de interceptação para inclinação de no máximo de 20 mg/dL.

Os primeiro e segundo eletrodos da tira podem estar substancialmente no mesmo plano, e o segundo eletrodo pode incluir a primeira camada em um segundo condutor. O segundo eletrodo pode incluir uma segunda camada no segundo condutor, e a segunda camada pode incluir uma camada de reagentes diferente em composição da camada de reagentes da primeira camada. Os eletrodos podem ser separados por mais de 200 μm e podem ser separados de uma parte superior da tampa por pelo menos 100 μm .

A espessura inicial média da camada de reagentes da tira pode ser inferior a 8 μm ou pode ser de 0,25 a 3 μm . A camada de reagentes da tira pode ser formada a uma densidade de deposição de no máximo 0,2 $\mu\text{L}/\text{mm}^2$ de uma solução de reagentes. A camada de reagentes pode incluir poli (óxido de etileno), poli (álcool vinílico), hidroxietilenocelulose, carboximetilcelulose, ou uma combinação deles como um aglutinante polimérico. A densidade de deposição do aglutinante polimérico pode ser no máximo 2 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ no primeiro condutor. O aglutinante polimérico pode ser parcialmente solúvel em água e/ou pode ser um material em forma de gelo quando de hidratação.

A camada de reagentes pode incluir um sistema enzimático a uma densidade de deposição de no máximo 0,8 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ e/ou incluir no máximo 1,3 unidade de enzima. A camada de reagentes no eletrodo de medida pode incluir no máximo 2 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ do mediador. O mediador pode ser um mediador de transferência de dois elétrons e pode ser 3-fenilimino-3H-fenotiazinas, 3-fenilimino-3H-fenoxazinas, seus sais, seus ácidos, seus derivados, ou suas combinações. O mediador pode ter um potencial de oxirredução de pelo menos 100 mV mais baixo do que aquele de ferrocianeto.

A tira pode ter uma polarização de estabilidade inferior a $\pm 5\%$, após armazenamento a 50°C por 2 ou 4 semanas, quando comparada com uma tira comparativa armazenada a -20°C por 2 ou 4 semanas, respectivamente. A tira pode ser uma polarização de hematócrito inferior a $\pm 5\%$ para amostras de sangue total, incluindo de 20 a 60% de hematócritos. A tira pode ser uma razão de interceptação para inclinação de no máximo 10 mg/dL ou no máximo 1 mg/dL.

Em outro aspecto, uma tira sensora eletroquímica inclui uma base, primeiro e segundo eletrodos na base, e uma tampa na base. A tira inclui pelo menos uma primeira camada em um primeiro condutor, a primeira camada incluindo uma camada de reagentes incluindo um mediador e um sistema enzimático, em que a camada de reagentes proporciona um valor de concentração determinado tendo pelo menos uma de uma polarização de estabilidade inferior a $\pm 10\%$, após armazenamento a 50°C por 2 semanas, quando comparada a uma tira comparativa armazenada a -20°C por 2 semanas, uma polarização de hema-

tócitos inferior a $\pm 10\%$ para amostras de sangue total incluindo de 20 a 60% de hematócritos, e uma razão de interceptação para inclinação de no máximo 20 mg/dL.

Em outro aspecto, um método para a determinação da concentração de um analisado em uma amostra é proporcionado. O método inclui a aplicação de uma sequência de pulsos à amostra, a sequência de pulsos incluindo pelo menos 3 ciclos operacionais em um período de 30 segundos. O método também inclui a determinação da concentração do analisado na amostra, quando a concentração tem pelo menos uma de uma polarização de estabilidade inferior a $\pm 10\%$, uma polarização de hematócritos inferior a $\pm 10\%$ para amostras de sangue total incluindo de 20 a 60% de hematócritos, e uma razão de interceptação para inclinação de no máximo 20 mg/dL.

O método pode incluir pelo menos 3 ciclos operacionais em um período de 9 segundos, e a sequência de pulsos pode estar completa em no máximo 5 segundos. A determinação da concentração do analisado na amostra pode incluir a determinação da concentração do analisado na amostra, a partir de uma medida de corrente feita em um período de 2 segundos da aplicação da sequência de pulsos. Cada ciclo operacional pode incluir uma excitação e uma relaxação, em que cada excitação pode ter uma duração de 0,01 a 3 segundos. As excitações podem ter uma duração somada de no máximo 10 segundos ou no máximo de 2 segundos, e as excitações podem ter amplitudes diferindo por 500 mV. As excitações podem ser de no máximo 45% do tempo da sequência de pulsos. Cada uma das relaxações pode ter uma duração de pelo menos 0,2 segundo ou pode ter uma duração de 0,2 a 3 segundos. A sequência de pulsos pode incluir uma excitação inicial de 0,75 a 3 segundos em duração, em que a excitação inicial é mais longa em duração do que as excitações dos ciclos operacionais.

O método pode determinar uma concentração tendo uma polarização de estabilidade inferior a $\pm 5\%$, após armazenamento a 50°C por 2 ou 4 semanas, quando comparada a uma tira comparativa armazenada a -20°C por 2 ou 4 semanas, respectivamente. A concentração pode ter uma polarização de hematócritos inferior a $\pm 5\%$ para amostras de sangue total incluindo de 20 a 60% de hematócritos. A concentração pode ter uma razão de interceptação para inclinação de no máximo 10 mg/dL ou no máximo 1 mg/dL.

Em outro aspecto, um método para aumentar o desempenho da determinação quantitativa de analisado inclui a introdução de uma amostra contendo analisado, tendo um componente líquido, em uma tira sensora eletroquímica, a tira tendo uma base, um primeiro condutor na base, um segundo condutor na base, e pelo menos uma primeira camada no pelo menos o primeiro condutor, em que a pelo menos uma primeira camada inclui uma camada de reagentes incluindo um aglutinante polimérico e a amostra proporciona comunicação elétrica entre os primeiro e segundo condutores. O método também inclui a aplicação de um potencial elétrico entre os primeiro e segundo condutores, na forma de pelo menos 4

pulsos de leitura em um período de 30 ou de 9 segundos, e medir pelo menos um dos pulsos de leitura para proporcionar um valor quantitativo da concentração de analisado na amostra com um maior desempenho, atribuível a pelo menos um parâmetro de desempenho selecionado de uma polarização de estabilidade inferior a $\pm 10\%$, após a tira ser armazenada a 50°C por 2 semanas, quando comparada a uma tira comparativa armazenada a -20°C por 2 semanas, uma polarização de hematócritos inferior a $\pm 10\%$ em uma faixa de hematócritos de 20 a 60% para amostras de sangue total, uma razão de interceptação para inclinação de no máximo 10 mg/dL, e suas combinações.

Os pulsos de leitura podem ficar completos em no máximo 5 segundos, os pulsos de leitura podem ser medidos em um período de 2 segundos de aplicação do potencial elétrico, e cada um dos pulsos de leitura pode ter uma duração de 0,01 a 3 segundos. Os pulsos de leitura podem ter uma duração de no máximo 2 segundos e podem ser de amplitudes tendo uma diferença dentro de 500 mV.

O método pode determinar o valor quantitativo tendo uma polarização de estabilidade inferior a $\pm 5\%$, após armazenamento a 50°C por 2 ou 4 semanas, quando comparado com o de uma tira comparativa armazenada a -20°C por 2 ou 4 semanas, respectivamente. O método pode determinar o valor quantitativo tendo uma polarização de hematócritos inferior a $\pm 5\%$ para amostras de sangue total incluindo de 20 a 60% de hematócritos. O método pode determinar o valor quantitativo tendo uma razão de interceptação para inclinação de no máximo 10 mg/dL ou no máximo 1 mg/dL.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A invenção pode ser melhor entendida com referência aos desenhos e descrição apresentados a seguir. Os componentes nas figuras não estão necessariamente em escala, ênfase sendo, em vez disso, colocada na ilustração dos princípios da invenção. Além do mais, nas figuras, os números de referência similares designam de uma maneira geral partes correspondentes ao longo das diferentes vistas.

A Figura 1A é uma representação em perspectiva de uma tira sensora montada.

A Figura 1B é um diagrama de vista de topo de uma tira sensora com a tampa removida.

A Figura 2A é uma vista pela extremidade da taxa de escoamento em fusão (MFR) da Figura 1B.

A Figura 2B representa a transferência de um único elétron por um mediador de um sistema enzimático a um eletrodo de medida.

A Figura 2C representa a transferência de dois elétrons por um mediador de um sistema enzimático para um eletrodo de medida.

A Figura 3 representa um método eletroquímico de determinação da presença e da concentração de um analisado em uma amostra.

As Figuras 4A - 4D ilustram exemplos de sequências de pulsos amperométricos controlados, quando múltiplos ciclos operacionais foram aplicados à tira sensora, após introdução da amostra.

5 As Figuras 5A e 5B ilustram as curvas de resposta de dose para as tiras sensoras, incluindo o sistema enzimático PQQ - GDH no nível de hematócritos de 20, 40 e 55%.

A Figura 5C apresenta as razões I/S em mg/dL determinadas a partir de dados experimentais.

A Figura 5D mostra as razões I/S de 0 a 20 mg/dL, para múltiplas concentrações de glicose determinadas de tiras sensoras tendo composições de reagentes RC2, RC3 ou RC4.

10 A Figura 5E mostra o desempenho de hematócritos quase idêntico do sistema com plasma e de amostras de sangue total com 40% de hematócritos.

A Figura 6A mostra a polarização de estabilidade para quatro composições de reagentes, incluindo o sistema enzimático PQQ - GDH, após 2 semanas a 50°C.

15 A Figura 6B mostra a polarização de estabilidade para quatro composições de reagentes, incluindo o sistema enzimático PQQ - GDH, após 4 semanas a 50°C.

A Figura 6C mostra a polarização de estabilidade para três composições de reagentes, incluindo o sistema enzimático PQQ - GDH, após 52 semanas a 25°C sob uma umidade relativa de 80%.

20 A Figura 6D mostra a variação em estabilidade para tiras sensoras, incluindo RC2, quando o ponto de dados usado para calcular a concentração de analisado foi tomado a tempos variáveis, após início da análise.

A Figura 7A ilustra a curva de resposta de dose de uma tira sensora para múltiplas amostras de sangue total.

25 A Figura 7B ilustra as disseminações de polarizações de hematócritos absolutos para quatro lotes de manufatura de tiras sensoras obtidos com múltiplas amostras de sangue total.

A Figura 7C compara a sensibilidade de hematócritos entre as presentes tiras sensoras e as convencionais.

DESCRIÇÃO DETALHADA

30 Os biossensores proporcionam aos pacientes o benefício de uma medida quase que instantânea de níveis de glicose. Os erros nessas medidas podem ser atribuíveis a uma degradação da composição de reagentes e/ou ao efeito de hematócrito. A degradação da composição de reagentes é um processo contínuo, que ocorre durante o período de tempo no qual a tira sensora é transportada e armazenada, após manufatura. Múltiplos fatores podem afetar a taxa na qual a composição de reagentes se degrada, incluindo a temperatura.

35 O efeito de hematócrito surge quando as células sanguíneas vermelhas afetam aleatoriamente a taxa de difusão das espécies mensuráveis para a superfície condutora do eletrodo

de medida.

Por redução da quantidade de mediador e/ou da enzima usada na tira sensora, a estabilidade de longo prazo da composição de reagentes pode ser aumentada em relação aos biossensores e às composições de reagentes convencionais. Desse modo, a polarização de estabilidade e as razões de interceptação para inclinação da tira sensora podem ser aperfeiçoados. Além do mais, por combinação de um método de análise controlada com a composição de reagentes de maior estabilidade, o efeito de hematócrito pode ser reduzido. Desse modo, um ou qualquer combinação desse e de outros parâmetros de desempenho pode ser aperfeiçoado de acordo com a presente invenção.

Em um aspecto, os biossensores da presente invenção demonstram uma polarização de estabilidade preferivelmente de menos de $\pm 10\%$, particularmente, inferior a $\pm 5\%$, após armazenamento a 50°C por 4 semanas, quando comparados às tiras sensoras armazenadas a -20°C por 4 semanas. Em outro aspecto, os biossensores da presente invenção demonstram uma polarização de hematócritos de preferivelmente menos de $\pm 10\%$, particularmente, inferior a $\pm 5\%$ para amostras WB, incluindo de 20 a 60% de hematócrito. Em outro aspecto, os biossensores da presente invenção demonstram, de preferência, uma razão de interceptação para inclinação de no máximo 20 mg/dL, particularmente, de no máximo 10 mg/dL ou de no máximo 6 mg/dL, e, especialmente, de no máximo 1 mg/dL. Esses e outros parâmetros de desempenho da tira sensora podem ser aperfeiçoados.

As Figuras 1A e 1B ilustram uma tira sensora 100, que pode ser usada na presente invenção. A Figura 1A é uma representação em perspectiva de uma tira sensora 100 montada, incluindo uma base de sensor 110, cobertura pelo menos parcialmente por uma tampa 120, que inclui um respiradouro 130, uma área de cobertura de amostra 140 e uma abertura de extremidade de entrada 150. Um volume parcialmente encerrado 160 (o vão capilar ou o vão da cobertura) é formado entre a base 110 e a tampa 120. Outros projetos de tiras sensoras compatíveis com a presente invenção podem ser usados, tais como aqueles descritos nas patentes U.S. 5.120.420 e 5.798.031.

Uma amostra líquida para análise pode ser transferida para o vão da cobertura 160 por introdução do líquido na abertura 150. O líquido enche o vão da cobertura 160, enquanto expelindo o ar contido previamente pelo respiradouro 130. O vão da cobertura 160 pode conter uma composição (não mostrada), que auxilia na retenção da amostra líquida no vão da cobertura. Os exemplos dessas composições incluem os polímeros expansíveis por água, tais como carboximetilcelulose e poli (glicol etilênico); e matrizes poliméricas porosas, tais como dextrana e poliacrilamida.

A Figura 1B ilustra uma vista de topo da tira sensora 100, com a tampa 120 removida. Os condutores 170 e 180 podem se estender sob uma camada dielétrica 190, da abertura 150 para um eletrodo de medida 175 e um contraeletrodo 185, respectivamente. Em um

aspecto, os eletrodos de medida e contra 175, 185 podem ficar substancialmente no mesmo plano, como ilustrado na figura. Em um aspecto relacionado, os eletrodos de medida e contra 175, 185 podem ser separados por mais de 200 ou 250 μm , e podem ser separados de uma parte superior da tampa 120 por pelo menos 100 μm . Em outro aspecto, os eletrodos de medida e contra 175, 185 podem ser separados por menos de 200 μm . A camada dielétrica 190 pode cobrir parcialmente os eletrodos 175, 185 e pode ser feita de qualquer material dielétrico adequado, tal como um polímero isolante.

O contraeletrodo 185 pode suportar a atividade eletroquímica no eletrodo de medida 175 da tira sensora 100. Em um aspecto, o potencial para suportar a atividade eletroquímica no eletrodo de medida 175 pode ser proporcionado ao sistema sensor por formação do contraeletrodo 185 de um material inerte, tal como carbono, e incluindo uma espécie de oxirredução solúvel, tal como ferricianeto, dentro do vão da cobertura 160. Em outro aspecto, o potencial no contraeletrodo 185 pode ser um potencial de referência obtido por formação do contraeletrodo 185 de um par de oxirredução, tal como Ag/AgCl, para proporcionar um eletrodo de referência - contraeletrodo combinados. Alternativamente, a tira sensora 100 pode ser dotada com um terceiro condutor e eletrodo (não mostrados) para proporcionar um potencial de referência para o sistema sensor.

A Figura 2A ilustra um diagrama de vista pela extremidade da tira sensora ilustrada na Figura 1B, mostrando a estrutura de camadas do eletrodo de medida 175 e do contraeletrodo 185. Os condutores 170 e 180 podem se estender diretamente na base 110. As camadas condutoras superficiais 270 e 280 podem ser opcionalmente depositadas nos condutores 170 e 180, respectivamente. As camadas condutoras superficiais 270, 280 podem ser feitas do mesmo ou de materiais diferentes.

O material ou os materiais usados para formar os condutores 170, 180 e as camadas condutoras superficiais 270, 280 podem incluir qualquer condutor elétrico. Os condutores elétricos preferidos são não ionizantes, de modo que o material não sofra uma oxidação líquida ou uma redução líquida durante análise da amostra. Os condutores 170, 180 incluem, de preferência, uma camada fina de uma pasta metálica ou um metal, tal como ouro, prata, platina, paládio, cobre ou tungstênio. As camadas condutoras superficiais 270, 280 incluem, de preferência, carbono, ouro, platina, paládio ou suas combinações. Se uma camada condutora superficial não estiver presente em um condutor, o condutor é feito, de preferência, de um material não ionizante.

O material condutor superficial pode ser depositado nos condutores 170, 180 por qualquer meio convencional compatível com a operação da tira sensora, incluindo deposição de folha, deposição de vapor químico, deposição de pasta e assemelhados. No caso de deposição de pasta, a mistura pode ser aplicada como uma tinta nos condutores 170, 180, como descrito na patente U.S. 5.798.031.

As camadas de reagentes 275 e 285 podem ser depositadas nos condutores 170 e 180, respectivamente. As camadas são formadas de pelo menos uma composição de reagentes, que inclui reagentes e, opcionalmente, um aglutinante. O aglutinante é, de preferência, um material polimérico, que é pelo menos parcialmente solúvel em água. Em um aspecto, o aglutinante pode formar um gel ou um material similar a gel, quando hidratado pela amostra. Em outro aspecto, o aglutinante pode filtrar as células sanguíneas vermelhas.

Os materiais poliméricos parcialmente solúveis em água adequados, para uso como o aglutinante, podem incluir poli (óxido de etileno) (PEO), carboximetilcelulose (CMC), poli (álcool vinílico), hidroxietilenocelulose (HEC), hidroxipropilcelulose (HPC), metilcelulose, etilcelulose, etilhidroxietilcelulose, carboximetiletilcelulose, polivinilpirrolidona (PVP), poliaminoácidos tal como polilisina, poli (sulfonato de estireno), gelatina, ácido acrílico, ácido metacrílico, amido, anidrido maléico, seus sais, seus derivados e suas combinações. Entre os materiais mencionados acima, PEO, PVA, CMC e HEC são os preferidos, com CMC sendo atualmente particularmente preferido.

Além do aglutinante, as camadas de reagentes 275 e 285 podem incluir reagentes iguais ou diferentes. Quando incluindo os mesmos reagentes, as camadas de reagentes 275 e 285 podem ficar na mesma camada. Em um aspecto, os reagentes presentes na primeira camada 275 podem ser selecionados para uso com o eletrodo de medida 175, enquanto que os reagentes presentes na segunda camada 285 podem ser selecionados para uso com o contraeletrodo 185. Por exemplo, os reagentes na camada 285 podem facilitar o fluxo livre de elétrons entre a amostra e o condutor 180. De modo similar, os reagentes na camada 275 podem facilitar a reação do analisado.

A camada de reagentes 275 pode incluir um sistema enzimático específico para o analisado, que pode facilitar a reação do analisado, enquanto aumentando a especificidade do sistema sensor para o analisado, especialmente em amostras biológicas complexas. O sistema enzimático pode incluir um ou mais de enzima, co-fator e/ou outra parte que participa na redução ou oxirredução com o analisado. Por exemplo, uma oxidase de álcool pode ser usada para proporcionar uma tira sensora, que é sensível à presença de álcool em uma amostra. Esse sistema pode ser útil na medida de concentrações de álcool em sangue. Em outro exemplo, glicose desidrogenase ou glicose oxidase pode ser usada para proporcionar uma tira sensora, que é sensível à presença de glicose em uma amostra. Esse sistema pode ser útil na medida de concentrações de glicose em sangue, por exemplo, em pacientes que são conhecidos por ou suspeitos de ter diabetes.

As enzimas para uso no sistema enzimático incluem desidrogenase de álcool, desidrogenase de lactato, desidrogenase de β -hidroxibutirato, glicose-6-fosfato desidrogenase, glicose desidrogenase, desidrogenase de formaldeído, desidrogenase de maleato e desidrogenase de 3-hidroxiesteróide. Os sistemas enzimáticos são independentes de oxigênio,

desse modo, não são substancialmente oxidados por oxigênio.

Uma dessas famílias de enzimas independentes de oxigênio é a glicose desidrogenase (GDH). Usando-se co-enzimas ou co-fatores diferentes, a GDH pode ser mediada em uma diferente maneira por diferentes mediadores. Dependendo da associação deles com o GDH, um co-fator, tal como flavina adenina nucleotídeo (FAD), pode ser retido firmemente pela enzima hospedeira, tal como no caso de FAD-GDH, ou um co-fator, tal como pirroloquinolinaquinona (PQQ), pode ser ligado covalentemente à enzima hospedeira, tal como com PQQ-GDH. O co-fator em cada um desses sistemas enzimáticos pode ser retido permanentemente pela enzima hospedeira ou a co-enzima e a apoenzima podem ser reconstituídas antes do sistema enzimático ser adicionado à composição de reagentes. A co-enzima pode ser também adicionada independentemente à parte enzima hospedeira na composição de reagentes, para auxiliar na função catalítica da enzima hospedeira, tal como nos casos de nicotinamida adenina nucleotídeo NAD/NADH⁺ ou nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato NADP/NADPH⁺.

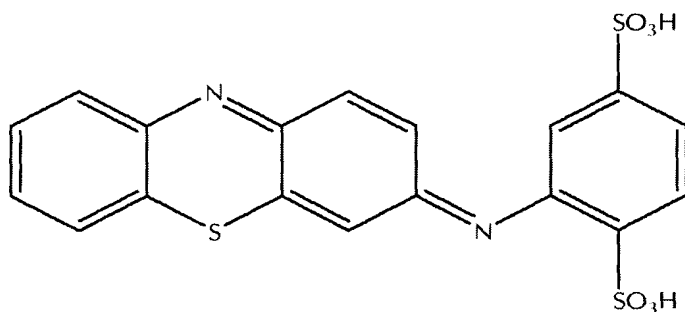
A camada de reagentes 275 pode também incluir um mediador para comunicação mais efetiva dos resultados da reação de analisado para o condutor superficial 270 e/ou o condutor 170. Os mediadores podem ser separados em dois grupos com base nas suas atividades eletroquímicas. Os mediadores de transferência de um elétron são partes químicas capazes de empregar um elétron adicional durante as condições da reação eletroquímica, enquanto que os mediadores de transferência de dois elétrons são partes químicas capazes de empregar dois elétrons adicionais durante as condições da reação. Como ilustrado na Figura 2B, os mediadores de transferência de um elétron podem transferir um elétron da enzima para o eletrodo de medida, enquanto que, como ilustrado na Figura 2C, os mediadores de transferência de dois elétrons podem transferir dois elétrons.

Ainda que outros mediadores possam ser usados, os mediadores de transferência de dois elétrons são os preferidos, devido às suas capacidades de transferir aproximadamente duas vezes mais elétrons do sistema enzimático para o eletrodo de medida, para a mesma quantidade molar de mediador, em relação aos mediadores de transferência de um elétron. Por redução da quantidade de mediador necessária para que o sensor execute em relação às tiras sensoras convencionais, as tiras sensoras da presente invenção podem demonstrar um aumento na estabilidade de longo prazo. Esse aumento de estabilidade pode ser atribuível a uma redução na desnaturação da enzima pelo mediador, durante armazenamento. O aumento de estabilidade pode ser também atribuível a uma redução na quantidade de mediador disponível para oxidar a enzima, durante armazenamento.

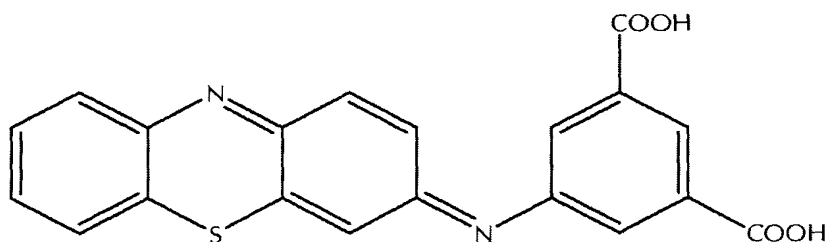
Os exemplos dos mediadores de transferência de um elétron incluem compostos, tais como 1,1'-dimetil ferroceno, ferrocianeto e ferricianeto, e rutênio (III) e rutênio (II) hexamina. Os mediadores de dois elétrons incluem as quinonas e hidroquinonas orgânicas, tais

como fenatrolina quinona; derivados de fenotiazina e fenoxazina; 3-(fenilamino)-3H-fenoxazinas; fenotiazinas; e 7-hidróxi-9,9-dimetil-9H-acridin-2-ona e seus derivados. Os exemplos de mediadores de dois elétrons adicionais incluem as moléculas orgânicas eletroativas descritas, por exemplo, nas patentes U.S. 5.393.615, 5.498.542 e 5.520.786, que são aqui incorporadas por referência.

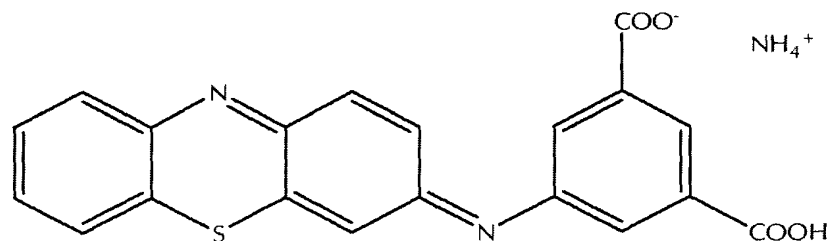
Os mediadores de transferência de dois elétrons incluem 3-fenilimino-3H-fenotiazinas (PIPT) e 3-fenilimino-3H-fenoxazinas (PIPO). Os mediadores de dois elétrons particularmente preferidos incluem o ácido ou sal carboxílico, tais como os sais de amônio, de derivados de fenotiazina. Atualmente, os mediadores de dois elétrons especialmente preferidos incluem ácido (E)-2-(3H-fenotiazina-3-ilidenoamino) benzeno-1,4-dissulfônico (Estrutura I), ácido (E)-5-(3H-fenotiazina-3-ilidenoamino) isoftálico (Estrutura II), (E)-3-(3H-fenotiazina-3-ilidenoamino)-5-carboxibenzoato de amônio (Estrutura III), e suas combinações. As fórmulas estruturais desses mediadores são apresentadas abaixo.



Estrutura I



Estrutura II



Estrutura III

Em outro aspecto, os mediadores de dois elétrons preferidos têm um potencial de

oxirredução que é pelo menos 100 mV mais baixo, particularmente, pelo menos 150 mV mais baixo do que o do ferricianeto.

As camadas de reagentes 275, 285 podem ser depositadas por qualquer meio conveniente, tal como impressão, deposição de líquido ou deposição de jato de tinta. Em um aspecto, as camadas são depositadas por impressão. Com outros fatores sendo iguais, o ângulo da lâmina de impressão pode afetar inversamente a espessura das camadas de reagentes. Por exemplo, quando a lâmina é movimentada a um ângulo de aproximadamente 82° com a base 110, a camada pode ter uma espessura de aproximadamente 10 μm . De modo similar, quando um ângulo de lâmina de aproximadamente 62° com a base 110 é usado, uma camada 30 μm mais espessa pode ser produzida. Desse modo, os ângulos de lâmina menores podem proporcionar camadas de reagentes mais espessas. Além do ângulo da lâmina, outros fatores, tal como a viscosidade do material sendo aplicado, bem como o tamanho da tela e a combinação por emulsão, podem afetar a espessura resultante das camadas de reagentes 275, 285.

Quando camadas de reagentes mais finas são preferidas, métodos de deposição diferentes de impressão, tal como aplicação de tinta com pipeta, aplicação de tinta por jato ou deposição por pino, podem ser necessários. Esses métodos de deposição propiciam, geralmente, camadas de reagentes secas na espessura de micrômetro ou submicrômetro, tal como de 1 - 2 μm . Por exemplo, os métodos de deposição por pino podem proporcionar espessuras de camadas de reagentes médias de 1 μm . A espessura da camada de reagentes, resultante de deposição por pino, pode ser, por exemplo, controlada pela quantidade de polímero incluída na composição de reagentes, com um teor de polímero mais alto proporcionando camadas de reagentes mais espessas. As camadas de reagentes mais finas podem requerer amplitudes de pulso mais curtas do que as camadas de reagentes mais espessas, para manter o desempenho de medida desejado e/ou medir substancialmente o analisado dentro da camada barreira de difusão (DBL).

O eletrodo de medida 175 pode também incluir uma DBL, que é integral com uma camada de reagentes 275 ou que é uma camada distinta 290, tal como ilustrado na Figura 2A. Desse modo, a DBL pode ser formada como uma combinação reagente / DBL no condutor, como uma camada distinta no condutor, ou como uma camada distinta na camada de reagentes. Quando o eletrodo de medida 175 incluir a DBL distinta 290, a camada de reagentes 275 pode ou não residir na DBL 290. Em vez de residir na DBL 290, a camada de reagentes 275 pode residir em qualquer parte da tira sensora 100, que permite que o reagente se solubilize na amostra. Por exemplo, a camada de reagentes 175 pode residir na base 110 ou na tampa 120.

A DBL proporciona um espaço poroso tendo um volume interno no qual uma espécie mensurável pode residir. Os poros da DBL podem ser selecionados de modo que a es-

pécie mensurável possa se difundir para a DBL, enquanto que os constituintes da amostra fisicamente maiores, tais como as RBC, são substancialmente excluídos. Embora as tiras sensoras convencionais tenham usados vários materiais para filtrar as RBCs da superfície do eletrodo de medida, uma DBL proporciona um espaço poroso interno para conter e isolar uma parte da espécie mensurável da amostra.

Quando a camada de reagentes 275 inclui um aglutinante solúvel em água, qualquer parte do aglutinante, que não se solubiliza na amostra antes da aplicação de uma excitação, pode funcionar como uma DBL integral. A espessura inicial média de uma combinação DBL / camada de reagentes é, de preferência, inferior a 16 ou 8 micrômetros (μm) e, particularmente, inferior a 4 μm . Atualmente, uma espessura inicial média especialmente preferida de uma combinação DBL / camada de reagentes é de 0,25 a 3 μm ou de 0,5 a 2 μm . A espessura inicial média desejada de uma combinação DBL / camada de reagentes pode ser selecionada para um período de excitação específico, com base em quando a taxa de difusão da espécie mensurável da DBL para uma superfície condutora, tal como a superfície do condutor 170 ou a superfície do condutor superficial 270 da Figura 2A, fica relativamente constante. Em um aspecto, a DBL / camada de reagentes pode ter uma espessura inicial média igual ou inferior a 1 μm , quando combinada com um pulso de excitação igual ou inferior a 0,25 segundo.

A DBL distinta 290 pode incluir qualquer material que proporcione o espaço de poros desejado, enquanto sendo parcial ou lentamente solúvel na amostra. Em um aspecto, a DBL distinta 290 pode incluir um material aglutinante de reagentes desprovido de reagentes. A DBL distinta 290 pode ter uma espessura inicial média de 1 a 15 μm e, particularmente, de 2 a 5 μm .

A Figura 3 representa uma análise eletroquímica 300 para determinar a presença e, opcionalmente, a concentração de um analisado 322 em uma amostra 312. Em 310, a amostra 312 é introduzida em uma tira sensora 314, tal como a tira sensora ilustrada nas Figuras 1A - 1B e 2A. As camadas de reagentes, tal como a 275 e/ou a 285 da Figura 2A, começam a solubilizar-se na amostra 312, propiciando, desse modo, reação. Nesse ponto na análise, pode ser benéfico proporcionar um retardo de tempo inicial, ou "período de incubação", para os reagentes reagirem com a amostra 312. De preferência, o retardo de tempo inicial pode ser de 0,5 a 5 segundos. Um tratamento mais profundo de retardos de tempo iniciais pode ser encontrado nas patentes U.S. 5.620.579 e 5.653.863.

Durante a reação, uma parte do analisado 322, presente na amostra 312, é oxidada ou reduzida química ou biologicamente em 320, tal como por uma oxirredutase. Por meio de oxidação ou redução, os elétrons podem ser transferidos entre o analisado 322 e um mediador 332 em 330, tal como pela oxirredutase.

Em 340, o mediador carregado 332 é excitado eletroquimicamente (oxidado ou re-

duzido). Por exemplo, quando a amostra 312 é sangue total contendo glicose oxidada pelo sistema enzimático PQQ-GDH em 320, que então transfere dois elétrons para reduzir um mediador de derivado de fenotiazina em 330, a excitação de 340 oxida o mediador de derivado de fenotiazina no eletrodo de medida. Dessa maneira, os elétrons são transferidos se-

5 letivamente do analisado de glicose para o eletrodo de medida da tira sensora, na qual podem ser detectados por um dispositivo de medida.

A corrente resultante da excitação 340 pode ser registrada durante a excitação 340 em função do tempo em 350. Em 360, a amostra sofre relaxação. De preferência, a corrente não é registrada durante a relaxação 360. Os valores da corrente e do tempo registrados

10 podem ser analisados para determinar a presença e/ou a concentração do analisado 322 na amostra 312 em 370.

Os sistemas sensores amperométricos aplicam um potencial (uma voltagem) à tira sensora para excitar a espécie mensurável, enquanto a corrente é monitorada. Os sistemas sensores amperométricos convencionais podem manter o potencial, enquanto medem a

15 corrente para, por exemplo, um período de pulso de leitura de 5 a 10 segundos. Em comparação com os métodos convencionais, os ciclos operacionais usados na análise eletroquímica 300 substituem os pulsos de leitura de longa duração, contínuos, com múltiplas excitações e relaxações de curta duração. Uma descrição mais detalhada das excitação e relaxação múltiplas ou sequências de pulsos "controlados" pode ser encontrada no pedido

20 PCT/US2006/028013, depositado em 19 de julho de 2006, intitulado "Amperometria Controlada".

Com referência à Figura 3, a excitação 340, o retardo 350 e a relaxação 360 constituem um único ciclo operacional. De preferência, pelo menos 2, 4, 6 ou 7 ciclos operacionais são aplicados durante um período de tempo selecionado independentemente de 3, 5, 7, 9

25 ou 14 segundos. Em um aspecto, os ciclos operacionais são aplicados durante um período de tempo de 3 a 14 segundos. Em outro aspecto, pelo menos 4 ciclos operacionais são aplicados em um período de 30 segundos, 9 segundos ou menos. Em outro aspecto, de 2 a 6 ciclos operacionais podem ser aplicados em um período igual ou inferior a 10 segundos. Em outro aspecto, de 2 a 4 ciclos operacionais podem ser aplicados em um período de 3 a 9

30 segundos.

Após a excitação 340, em 360 o dispositivo de medida pode abrir o circuito pela tira sensora 314, permitindo, desse modo, que o sistema relaxe. Durante a relaxação 360, a corrente presente durante a excitação 340 é substancialmente reduzida por pelo menos metade, de preferência, por uma ordem de grandeza e, particularmente, a zero. De preferência,

35 De preferência, um estado de corrente zero é proporcionado por um circuito aberto ou outro método conhecido daqueles versados na técnica, para proporcionar um fluxo de corrente substancialmente zero. Em um aspecto, a relaxação 360 é pelo menos de 0,5 ou pelo me-

nos 0,2 segundo de duração. Em outro aspecto, a relaxação 360 é de 0,2 a 3 segundos ou de 0,5 a 1 segundo de duração.

As Figuras 4A - 4D ilustram exemplos de sequências de pulsos amperométricos controlados, quando múltiplos ciclos operacionais foram aplicados à tira sensora, após introdução da amostra. Nesses exemplos, foram usados pulsos de onda quadrada, embora outros tipos de onda compatíveis com o sistema sensor e a amostra de teste também possam ser usados.

Cada sequência de pulsos ilustrada inclui um pulso de excitação de um segundo inicial 420, seguido por múltiplas excitações 430 de 0,25 segundo. O pulso de excitação inicial 420 pode ser de uma duração mais longa do que as excitações 430 subsequentes. Por exemplo, o pulso de excitação inicial 420 pode variar de 0,75 a 3 segundos de duração. O período do pulso de excitação 420 pode ser ajustado para oxidar a quantidade de enzima relativamente pequena depositada na tira. Quando o pulso de excitação inicial 420 é usado, é, de preferência, de duração mais longa do que as seguintes excitações 430 múltiplas. Por exemplo, a sequência de pulsos pode incluir o pulso de excitação inicial 420, tendo uma duração de 2 segundos, seguida por uma relaxação de circuito aberto de 3 segundos, seguida pela excitação 430 subsequente tendo uma duração de 0,125 segundo.

As excitações 430 múltiplas podem variar de duração de 0,01 a 3 segundos. Em um aspecto, o período de excitação total é igual ou inferior a dois segundos, incluindo, desse modo, o pulso inicial de um segundo 420, seguido por quatro das excitações 430 de 0,25 segundo. Em outro aspecto, o período de excitação total é igual ou inferior a 1,5 segundo, incluindo, desse modo, o pulso inicial de um segundo 420, seguido por uma ou duas das excitações 430 de 0,25 segundo. A sequência de pulsos pode incluir excitações adicionais, tal como a excitação 440 ilustrada na Figura 4A. Em outro aspecto, as excitações podem ser de diferentes amplitudes, tal como ilustrado nas Figuras 4C e 4D. Em um aspecto preferido, quando as excitações de diferentes amplitudes são usadas, a diferença nas amplitudes pode ficar dentro de 500 mV.

As excitações curtas podem permitir a análise precisa da amostra com as composições de reagentes tendo concentrações reduzidas de polímero, sistema enzimático e mediador, em relação às composições convencionais. Além do mais, as excitações curtas permitem que a análise seja completada em um período igual ou inferior a 8,5 segundos, ou, particularmente, em 5 segundos ou menos a partir da aplicação inicial de um sinal à tira sensora.

Podem ser usadas excitações curtas ou longas. De preferência, a medida de corrente a partir da qual a concentração de analisado é determinada é feita em um período de 2 segundos ou de 1 segundo da aplicação inicial do sinal. Particularmente, múltiplas excitações curtas são combinadas com uma medida de corrente feita em um período de 2 segun-

dos, 1 segundo ou menos, a partir da aplicação inicial, para determinar a concentração de analisado da amostra.

Em combinação com as sequências de pulsos amperométricos controlados da presente invenção, as composições de reagentes, incluindo as proporções específicas de aglutinante polimérico, sistema enzimático e/ou mediador, foram verificadas como reduzindo a polarização de hematócritos e/ou aumentando a estabilidade de longo prazo. Ainda que as tiras convencionais sejam frequentemente descritas em termos do percentual de cada ingrediente da composição de reagentes, é a densidade de cada ingrediente da composição de reagentes (quantidade absoluta por área) que é relevante para a estabilidade de longo prazo. Por limitação da quantidade de mediador e de enzima disponível para interação, a quantidade de mediador reduzida ambientalmente (mediador não responsivo à concentração de analisado subjacente) presente no momento da análise pode ser substancialmente reduzida. Desse modo, proporciona-se uma redução benéfica na corrente de fundo. Como os biossensores convencionais usam excesso de enzima, em uma tentativa para aperfeiçoar a estabilidade de longo prazo, foi inesperado que uma redução no sistema enzimático e/ou mediador proporcionou um aperfeiçoamento na estabilidade de longo prazo para os biossensores atuais. Além do mais, se composições de reagentes individuais forem otimizadas para cada eletrodo, a quantidade relativa de mediador disponível para interagir com a enzima pode ser mais reduzida em relação às tiras sensoras de composição de reagentes única.

Por exemplo, as polarizações de hematócritos foram maiores com as concentrações de polímeros mais altas de 2%, 1,5% e 1% do que com uma concentração de polímero de 0,5% em peso na solução de reagentes, quando do uso de uma alta carga de enzima. Isso pode ser atribuível às concentrações de polímeros mais altas produzindo camadas de reagentes mais espessas, que afetam a polarização de hematócritos na reidratação. Desse modo, na medida em que os tempos de ensaio ficam mais curtos, a reidratação rápida sem um aumento na polarização de hematócritos pode ser preferida. Dessa maneira, um equilíbrio preferível pode ser atingido entre o teor de polímero e a carga de enzima da composição de reagentes, para proporcionar o nível de hidratação desejado durante o tempo do ensaio. Quando aplicadas à tira sensora, as densidades de deposição de polímero iguais ou inferiores a $2 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ podem ser preferidas, com as densidades de deposição de polímero de 0,8 a $1,5 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ sendo particularmente preferidas.

Quando diferentes soluções de deposição são depositadas nos eletrodos de medida e contra, a quantidade do sistema enzimático presente no eletrodo de medida é controlada. Desse modo, a deposição de aproximadamente $0,24 \mu\text{L}$ de uma solução incluindo 1,2 U do sistema enzimático PQQ-GDH, $2,57 \mu\text{g}$ do mediador de estrutura I, $1,18 \mu\text{g}$ do polímero CMC, e $3,28 \mu\text{g}$ de tampão de fosfato proporciona uma concentração de solução de reagentes de 5 U/ μL de sistema enzimático, 24 mM de mediador, 0,5% de polímero e 100 mM de

tampão de fosfato.

A deposição dessa solução de reagentes em uma área de deposição de $1,5 \text{ mm}^2$, incluindo uma área de eletrodo de medida de 1 mm^2 , proporciona uma densidade de deposição de sistema enzimático no eletrodo de medida de cerca de $0,8 \text{ U/mm}^2$ ($1,2 \text{ U}/1,5 \text{ mm}^2$), uma densidade de deposição de mediador de $1,72 \text{ } \mu\text{g/mm}^2$ ($2,57 \text{ } \mu\text{g}/1,5 \text{ mm}^2$), uma densidade de deposição de polímero de $0,8 \text{ } \mu\text{g/mm}^2$, e uma densidade de deposição de tampão de fosfato de $2,2 \text{ } \mu\text{g/mm}^2$. De modo similar, para uma solução de reagentes incluindo aproximadamente $2 \text{ U}/\mu\text{L}$ do sistema enzimático PQQ-GDH, 24 mM do mediador de estrutura I, $0,5\%$ de CMC, e 100 mM de tampão de fosfato, a densidade de deposição de sistema enzimático vai ser cerca de $0,3 \text{ U/mm}^2$. Além do mais, a atividade específica de um sistema enzimático pode ser traduzida em densidade de peso em termos de $\mu\text{g/mm}^2$. Por exemplo, se a atividade de um sistema enzimático for 770 U/mg , a densidade de atividade do sistema enzimático de $0,3 \text{ U/mm}^2$ fica $0,39 \text{ } \mu\text{g/mm}^2$ em densidade em peso. Desse modo, a atividade de um sistema enzimático pode ser considerada quando da determinação da densidade de deposição para o sistema enzimático.

As camadas de reagentes convencionais incluem as densidades de deposição de enzima de 1 a $6 \text{ } \mu\text{g/mm}^2$. Em comparação, após deposição, as composições de reagentes da presente invenção podem incluir densidades de deposição de sistema enzimático inferiores a $1 \text{ } \mu\text{g/mm}^2$, de preferência, inferiores a $0,5 \text{ } \mu\text{g/mm}^2$. As soluções de deposição da presente invenção podem incluir cerca de $4 \text{ U}/\mu\text{L}$ ou menos do sistema enzimático ou podem incluir cerca de $3 \text{ U}/\mu\text{L}$ ou menos do sistema enzimático. Atualmente, $2,2 \text{ U}/\mu\text{L}$ ou menos do sistema enzimático PQQ-GDH podem ser incluídos na solução de reagentes. Desse modo, quando a composição de reagentes é aplicada na tira sensora, $1,3$ unidade ou menos do sistema enzimático pode estar presente na tira sensora, com de $0,3$ a $0,8$ unidade sendo particularmente preferido.

As tiras sensoras convencionais têm, geralmente, densidades de deposição de mediador variando de 10 a $25 \text{ } \mu\text{g/mm}^2$. Em comparação, densidades de deposição de mediador de $8 \text{ } \mu\text{g/mm}^2$ e menos são preferidas para a presente invenção, com densidades de deposição de mediador de $5 \text{ } \mu\text{g/mm}^2$ e menos sendo particularmente preferidas. Atualmente, as densidades de deposição de mediador de $2 \text{ } \mu\text{g/mm}^2$ e menos são especialmente preferidas. Em um aspecto preferido, os mediadores de dois elétrons são preferíveis em relação aos mediadores de um elétron.

A Tabela I, abaixo, proporciona as densidades de deposição dos componentes do aglutinante polimérico, tampão, sistema enzimático, e mediador nas composições de reagentes usadas nas Figuras 5A - 5E e nas Figuras 6A - 6C, discutidas abaixo. A densidade de deposição de sistema enzimático para a composição de reagentes 3 (RC3) a $0,42 \text{ } \mu\text{g/mm}^2$ é aproximadamente 60% menor do que o valor de $1 \text{ } \mu\text{g/mm}^2$ mais baixo das tiras

convencionais discutidas acima.

De modo similar, as densidades de mediador apresentadas na Tabela I são aproximadamente de uma ordem de grandeza menor do que aquelas das tiras sensoras convencionais. Por exemplo, a densidade de deposição de mediador de RC3 foi aproximadamente de um quinto daquela da tira sensora convencional. Essa redução na densidade de deposição do mediador em relação às tiras sensoras convencionais pode proporcionar um aumento substancial na estabilidade de longo prazo das composições de reagentes da presente invenção.

	CMC, $\mu\text{g}/\text{mm}^2$	Buffer, $\mu\text{g}/\text{mm}^2$	PQQ/GDH, $\mu\text{g}/\text{mm}^2$	Mediador, $\mu\text{g}/\text{mm}^2$
RC1	1,59	2,17	3,99	1,72
RC2	0,79	2,19	1,07	1,72
RC3	0,79	2,19	0,42	1,72
RC4	0,77	2,22	0,99	1,36

Tabela I

A Figura 5A representa as curvas de resposta de dose de glicose a diferentes níveis de hematócritos em amostras WB para a tira sensora RC2, que incluía 1,2 unidade por sensor (U/sensor) a uma densidade de deposição de $0,8 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ da enzima PQQ-GDH. A Figura 5B representa as curvas de resposta de dose de glicose a diferentes níveis de hematócritos em amostras WB para a tira sensora RC3, que incluía 0,5 unidade U/sensor a uma densidade de deposição de $0,3 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ da enzima PQQ-GDH. Ambos os sensores de 1,2 U e 0,5 U distribuíram polarizações de hematócritos inferiores a $\pm 5\%$. No entanto, uma diferença entre os sensores de 1,2 U e 0,5 U foi observada com relação à sensibilidade e interceptação do sistema.

Uma redução na razão de interceptação para inclinação pode ser observada para 0,5 U/sensor da Figura 5B, por comparação das razões de interceptação para inclinação (I/S), expressas em unidades de mg/dL, com aquelas para 1,2 U/sensor da Figura 5A, com razões mais baixas representando uma redução no sinal de fundo. Desse modo, a razão I/S para 1,2 U/sensor da Figura 5A é $\sim 6 \text{ mg}/\text{dL}$, enquanto que a razão I/S para 0,5 U/sensor da Figura 5B é $\sim 0,15 \text{ mg}/\text{dL}$, uma redução aproximada de 40 vezes na concentração de hematócritos de 40%. O desempenho do sinal de fundo superior do sensor de 0,5 U, em relação a um sensor de 1,5 U, foi estabelecido.

Em um aspecto, a característica de desempenho de baixo fundo (baixa interceptação) pode ser proporcionada por densidades de deposição de mediador e de enzima relativamente baixas. Em outro aspecto, a característica de desempenho de alta sensibilidade (alta inclinação) pode ser proporcionada por otimização da razão de sincronização das excitações e relaxações da sequência de pulsos. Por exemplo, a combinação de um período de

relaxação relativamente longo de 1,5 segundo, com um período de excitação relativamente curto de 0,25 segundo, proporciona uma grande densidade de corrente na superfície do eletrodo de medida. Numericamente, o valor de interceptação relativamente pequeno em relação ao valor de inclinação relativamente grande aperfeiçoa ainda mais a I/S. Desse modo, as características de desempenho do sensor preferíveis (pequenos valores I/S) podem ser proporcionadas pela composição de reagentes e método de medida, em combinação.

A equação (1), abaixo, proporciona uma relação analítica entre a imprecisão de corrente e a imprecisão resultante na concentração de glicose determinada em função da razão I/S, quando a relação de glicose e corrente é $i = S \cdot G + Int$:

$$\frac{\Delta G / G}{\Delta i / i} = \frac{SD_G / G}{SD_i / i} = \frac{\%CV_G}{\%CV_i} = 1 + \frac{1}{G} \frac{Int}{S} \quad (1),$$

na qual G denota a concentração de glicose, G/G é o erro relativo da concentração de glicose em mg/dL, $\Delta i / i$ é o erro relativo da corrente medida, SD_G / G é o desvio padrão relativo em $\Delta G / G$, SD_i / i é o desvio padrão relativo em $\Delta i / i$, $\%CV_G$ é o coeficiente de variação, que é proporcional ao desvio padrão relativo e representa a precisão de medida de glicose, $\%CV_i$ é o coeficiente de variação, que é proporcional ao desvio padrão relativo e representa a precisão de medida de corrente, e Int/S é a razão de interceptação para inclinação (I/S) em mg/dL. A equação (1) pode ser derivada de $i = S \cdot G + Int$, tomando-se a derivada da função reversa $G = f(i) = (i - Int)/S$ na derivação e análise da propagação de erro. Devido ao termo $1 + 1/G$, uma imprecisão de corrente de 1 resulta em uma imprecisão de concentração de glicose superior a 1, se o valor I/S for superior a zero. As razões de interceptação para inclinação (I/S), expressas em mg/dL, podem ser expressas em termos de milimols/litro (mM/L), por divisão do valor I/S (mg/dL) por 18 ($[mg/dL]/18 = [mM]$ para glicose).

A imprecisão de corrente descreve a variação entre as medidas de corrente das múltiplas tiras sensoras. Desse modo, a imprecisão de corrente representa a quantidade que um valor de corrente registrado difere do valor de corrente médio, quando são analisadas amostras de glicose idênticas usando múltiplas tiras sensoras. Quanto mais um valor de corrente registrado de uma tira particular se desvia do valor médio para tiras múltiplas, mais inferior a corrente registrada dessa tira se correlaciona com a concentração de glicose efetiva da amostra. Desse modo, a precisão da medida de corrente pode ser medida por sua imprecisão ou $\%CV_i$, e a precisão da medida de glicose também pode ser medida por sua imprecisão ou $\%CV_G$.

A Tabela II, abaixo, proporciona inclinações (valores $1/G$) calculadas com a Equação (1) de múltiplas concentrações de glicose em mg/dL. Desse modo, $1/57,6 = 0,0174$, $1/111 = 0,009$, $1/222,25 = 0,0045$, $1/444,75 = 0,0022$, e $1/669 = 0,0015$, quando os denominadores são as concentrações de glicose no plasma testadas. Na medida em que a concentração de glicose aumenta, o valor da inclinação diminui de acordo com a equação (1).

Concentração de glicose em mg/dL	Razão I/S calculada da equação (1)	Razão I/S determinada experimentalmente
57,6	0,0174	0,0174
111	0,009	0,009
222,25	0,0045	0,0045
444,75	0,0022	0,0022
669	0,0015	0,0015

Tabela II

A Figura 5C apresenta razões I/S em mg/dL determinadas de dados experimentais. Os valores de corrente foram obtidos com sequências de pulsos amperométricos controlados de amostras WB, incluindo 40% de hematócritos e concentrações de glicose de 57,6, 111, 222,25, 444,75 ou 669 mg/dL. As constantes de calibração foram determinadas a 4, 5, 5,5, 7, 8,5, 10, 11,5, 13 e 14,5 segundos na análise. Como pode-se notar da tabela, os valores calculados e experimentalmente determinados são iguais, confirmando a capacidade da Equação (1), para descrever o comportamento da tira sensora relativa à imprecisão de glicose e corrente.

Para baixas concentrações de glicose, tal como 50 mg/dL e abaixo, é preferível manter um baixo valor I/S para reduzir a imprecisão introduzida na concentração de glicose determinada da imprecisão subjacente no valor de corrente registrado. Por exemplo, se a razão I/S for 50 mg/dL e a concentração de glicose for 50 mg/dL, então a razão de $\%CV_G/\%CV_I$ é $2[1 + (I/S)/G = 1 + 50/50 = 2]$, e qualquer imprecisão de corrente vai ser amplificada por um fator de 2 na concentração de glicose determinada. Desse modo, se a imprecisão típica nos valores de corrente registrados é 3,5%, um sistema tendo uma razão I/S de 50 mg/dL resulta em uma imprecisão de glicose de 7%.

A Figura 5D mostra razões I/S de 0 a 20 mg/dL para concentrações de glicose de 55,375, 112,25 e 433,5 mg/dL, determinadas das tiras sensoras tendo as composições de reagentes RC2, RC3 ou RC4 da Tabela 1 acima. Na medida em que as razões I/S diminuem de 20, a imprecisão associada com a concentração de glicose determinada também diminui. Desse modo, demonstrando que as razões I/S mais baixas são as preferidas nas concentrações de glicose mais baixas, como discutido acima.

Quando cada um desses fatores são considerados, as tiras sensoras tendo uma razão I/S igual ou inferior a 20 mg/dL são as preferidas, com aquelas tendo razões I/S iguais ou inferiores a 6 mg/dL ou iguais ou inferiores a 6 mg/dL sendo particularmente preferidas. Atualmente, as tiras tendo uma razão I/S igual ou inferior a 1 mg/dL são especialmente pre-

feridas.

A Figura 5E mostra o desempenho de hematócritos quase que idêntico de um sistema sensor de acordo com a presente invenção, usado com amostras de plasma e de sangue total com 40% de hematócritos. Nesse exemplo, a composição de reagentes da tira sensora era RC2, como descrito na Tabela 1 acima. Desse modo, as sequências de pulsos controlados, em combinação com as composições de reagentes da presente invenção, proporcionam uma redução substancial no efeito de hematócrito observado para as amostras WB.

A Figura 6A mostra o efeito da tensão ambiental na estabilidade de longo prazo de tiras sensoras. O eixo Y do gráfico mostra a polarização de estabilidade absoluto em termos de mg/dL para concentrações de glicose abaixo de 75 mg/dL ou o % de polarização para concentrações de glicose a e acima de 75 mg/dL para tiras sensoras sob tensão ambiental, em relação às tiras sensoras armazenadas a -20°C. As tiras sensoras sob tensão foram armazenadas a 50°C por duas semanas, como um processo acelerado simulando armazenamento a 25°C por 18 meses. Uma vez que a densidade do mediador era inicialmente baixa (1,72 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$), a linha de polarização de estabilidade médio na Figura 6A estabeleceu que na medida em que a densidade da enzima diminuiu de RC1 (3,2 U/ mm^2 , ou 4 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ a 770 U/mg de atividade enzimática específica) para RC2, RC3 e RC4 (tanto a 0,8 U/ mm^2 ou menos), do mesmo modo com as polarizações induzidas ambientalmente.

A Figura 6A também estabeleceu que uma composição de reagentes de acordo com a presente invenção pode proporcionar estabilidade de longo prazo suficiente para não precisar de um longo pulso oxidante inicial, antes da análise, tal como descrito na patente U.S. 5.653.863 de Genshaw et al. A análise que gerou os dados da Figura 6A tinha uma duração total de 4,5 segundos, com um tempo de oxidação total de 1,5 segundo (correspondente à sequência de pulsos da Figura 4A). Desse modo, apenas 30% do tempo do ensaio foi despendido oxidando a amostra WB na Figura 6A, comparado com ~ 67% do tempo do ensaio total na análise da patente U.S. 5.653.863 (20 segundos de oxidação por um tempo de análise total de 30 segundos). Em um aspecto, 45% ou menos do tempo do ensaio total é gasto oxidando a amostra. Em outro aspecto, 35% ou menos do tempo do ensaio total é gasto oxidando a amostra.

Ainda que o mediador de estrutura II tenha parecido ter uma polarização de estabilidade ligeiramente mais baixa do que o mediador de estrutura I na Figura 6A, essa pequena diferença pode ser atribuível a outros fatores dentro do sistema de teste. Desse modo, as composições de reagentes RC2, RC3 e RC4, em combinação com as sequências de pulsos controlados da presente invenção, demonstraram uma polarização de estabilidade inferior a $\pm 5\%$, após exposição a temperaturas de 50°C por duas semanas, enquanto que a RC1, com uma densidade de deposição de sistema enzimático mais alta, não apresentou.

A Figura 6B mostra o efeito da tensão ambiental na estabilidade de longo prazo de tiras sensoras, a 50°C, por quatro semanas. O eixo Y do gráfico mostra a polarização de estabilidade absoluta, em termos de mg/dL, para concentrações de glicose abaixo de 75 mg/dL, ou o % de polarização para concentrações de glicose a e acima de 75 mg/dL, para tiras sensoras sob tensão ambiental, em relação às tiras sensoras armazenadas a -20°C. O aumento na polarização de estabilidade para o período de armazenamento de 4 semanas da Figura 6B, em relação ao período de armazenamento de 2 semanas mais curto da Figura 6A, é observado nos valores do eixo Y para RC1. Uma vez que a densidade do mediador era inicialmente baixa ($1,72 \mu\text{g}/\text{mm}^2$), a linha de polarização de estabilidade médio na Figura 6B estabeleceu que na medida em que a densidade da enzima diminuiu de RC1 ($3,2 \text{ U}/\text{mm}^2$, ou $4 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ a $770 \text{ U}/\text{mg}$ de atividade enzimática específica) para RC2, RC3 e RC4 (tanto a $0,8 \text{ U}/\text{mm}^2$ quanto menos), de modo que induziu ambientalmente polarizações. Desse modo, a linha de polarização de estabilidade médio para o período de armazenamento de 4 semanas mais longo da Figura 6B também diminui substancialmente para RC2, RC3 e RC4, em relação a RC1. Mesmo após 4 semanas de armazenamento a 50°C, as composições de reagentes RC2, RC3 e RC4, em combinação com as sequências de pulsos controlados da presente invenção, demonstraram uma polarização de estabilidade inferior a $\pm 5\%$.

A Figura 6C mostra a polarização de estabilidade para três composições de reagentes, incluindo o sistema enzimático PQQ-GDH, após 52 semanas a 25°C sob uma umidade relativa de 60%. Diferentemente das Figuras 6A e 6B, um período de tempo mais longo, a uma temperatura mais baixa, foi usado para envelhecer as tiras. Os valores de polarização para RC2 e RC3 foram similares àqueles observados sob envelhecimento acelerado, sendo inferiores a $\pm 5\%$ em média. A RC4 mostrou um aumento na polarização em relação aos resultados de envelhecimento acelerado das Figuras 6A e 6B, aumentando, em média, um pouco menos do que o nível de $\pm 10\%$. Esse aumento pode ser atribuível ao erro experimental ou a um aspecto de estabilidade com o lote do mediador de estrutura III, usado em RC4 sob as circunstâncias específicas desse teste.

A Figura 6D mostra os valores de polarização de estabilidade para as tiras sensoras incluindo RC2, em que os dados usados para calcular a concentração do analisado foram tomados a um tempo específico, após início da análise. Por exemplo, a linha de 2,75 segundos representa os valores de polarização / % de polarização de concentração de analisado, determinados após o primeiro pulso de excitação curto, tal como a excitação 430 na Figura 4A. De modo similar, a linha de 4,375 segundos representa os valores de polarização / % de polarização de concentração de analisado, determinados após um segundo pulso de excitação curto. Desse modo, usando uma tira sensora sob tensão ambiental, incluindo RC2 e uma sequência de pulsos controlados, a concentração do analisado da amostra pode ser determinada precisamente em menos de 3 segundos.

Exemplo 1: Preparação de tiras sensoras

Em um aspecto, as tiras sensoras de acordo com a presente invenção foram produzidas usando deposição por pino. A solução de reagentes do contraeletrodo foi preparada fazendo-se uma solução padrão de tampão de fosfato 100 mM em carboximetilcelulose (CMC) a 1%. Depois, mediador em pó suficiente foi dissolvido na solução de tampão / CMC, para produzir uma solução final de mediador a 100 mM em tampão de fosfato a 100 mM e 1% de CMC.

A solução de reagentes do eletrodo de medida foi preparada tipicamente produzindo-se uma solução padrão de tampão de fosfato a 100 mM em CMC 0,5% (100 mL, por exemplo). Depois, mediador em pó suficiente foi dissolvido na solução padrão de tampão / CMC, para produzir uma solução (10 mL, por exemplo) de mediador a 24 - 25 mM em tampão de fosfato a 100 mM e CMC 0,5%. Finalmente, para uma carga de enzima de 5 U/ μ L, cerca de 33,4 mg do sistema enzimático PQQ-GDH (794 U/mg de atividade específica) foram combinados com 5 mL da solução de mediador / tampão / CMC em um recipiente de vidro ($[5.000 \text{ U/mL} * 5 \text{ mL}] / [794 \text{ U/mg}] = 33,4 \text{ mg}$). A mistura foi submetida a um lento redemoinho, para dissolver o pó seco de enzima na solução. Essa formulação era para a RC 2. Se apenas 2 mL da solução de reagentes final fossem necessários, então cerca de 13,4 mg de enzima PQQ-GDH com 749 U/mg de atividade específica eram pesados. De modo similar, para a composição RC3 de 2 U/ μ L, cerca de 13,4 de enzima PQQ-GDH com 749 U/mg de atividade específica eram dissolvidos por 5 mL da solução de mediador / tampão / CMC, para constituir a solução de reagentes final para deposição. Se apenas 2 mL da solução de reagentes final fossem necessários, então cerca de 5,34 mg de enzima PQQ-GDH a 749 U/mg de atividade específica eram pesados para produzir a solução final.

A deposição por pino foi usada para depositar a solução de reagentes do contraeletrodo em uma das superfícies de carbono, para formar o contraeletrodo. O volume distribuído por cada deposição foi de cerca de 0,2 a 0,24 μ L, que se espalhou para cobrir uma área de cerca de 1,5 a 2 mm². De modo similar, a deposição por pino foi usada para depositar a solução de reagentes do eletrodo de medida em uma das superfícies de carbono, para formar o eletrodo de medida. O volume para cada deposição de eletrodo de medida foi também cerca de 0,2 - 0,24 μ L, com um espalhamento de solução similar sobre o carbono, para formar o eletrodo de medida. A folha de sensor completa foi deixada secar ao ar por 15 minutos, seguido por armazenamento em um recipiente dessecado, antes da laminação final para formar as tiras sensoras completas. Em um aspecto, as densidades de deposição de soluções de reagentes iguais ou inferiores a 0,16 μ L/mm² (0,24 uL / 1,5 mm²) no eletrodo de medida são as preferidas.

Exemplo 2: Estudo de doadores

As amostras de sangue total foram coletadas de 21 pacientes tendo diabetes melito.

Duas análises foram conduzidas em cada paciente, para proporcionar 42 medidas de cada um dos lotes de quatro tiras sensoras SS1 a SS4, como apresentadas na Tabela III abaixo. Diferentes composições de reagentes para os eletrodos de medida e contra foram usadas para SS1 a SS3, enquanto que SS4 usou uma única composição de reagentes cobrindo substancialmente ambos os condutores. SS1, SS2 e SS3 representam diferentes lotes de manufatura usando as mesmas proporções de reagentes. O volume da composição de reagentes depositada nos condutores individuais para SS1 a SS3 foi cerca de 0,24 μL , com duas áreas de deposição de cerca de 1,5 mm^2 cada. O volume da composição de reagentes depositado para cobrir ambos os condutores para SS1 foi cerca de 0,3 μL , com uma área de deposição total de cerca de 3 mm^2 .

	Deposição de eletrodo de medida	Deposição de contraeletrodo
SS1	1,62 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ CMC 1,11 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de tampão 0,58 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de sistema enzimático PQQ - GDH 1,39 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de mediador de estrutura I pH 7,2 \pm 0,1	1,62 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ CMC 1,11 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de tampão 1,39 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de mediador de estrutura I pH 7,2 \pm 0,1
SS2	1,62 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ CMC 1,11 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de tampão 0,58 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de sistema enzimático PQQ - GDH 1,39 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de mediador de estrutura I pH 7,2 \pm 0,1	1,62 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ CMC 1,11 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de tampão 1,39 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de mediador de estrutura I pH 7,2 \pm 0,1
SS3	1,62 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ CMC 1,11 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de tampão 0,58 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de sistema enzimático PQQ - GDH 1,39 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de mediador de estrutura I pH 7,2 \pm 0,1	1,62 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ CMC 1,11 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de tampão 1,39 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de mediador de estrutura I pH 7,2 \pm 0,1
SS4	1,62 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ CMC 0,781 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de tampão 0,41 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de sistema enzimático PQQ - GDH 1,95 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de mediador de estrutura I pH 7,2 \pm 0,1	igual ao eletrodo de medida

Tabela III

As amostras foram analisadas com uma sequência de pulsos tendo uma excitação inicial, incluindo duas excitações curtas separadas por cerca de 0,25 segundo, seguida por uma relaxação de 1 segundo. Após as excitação e relaxação iniciais, uma sequência de três excitações de cerca de 0,375 segundo, separadas por duas relaxações de cerca de 1 segundo, foi aplicada. Uma corrente de saída, registrada após cerca de 5 segundos da aplicação do sinal de entrada inicial, foi usada para determinar a concentração de glicose da amostra.

As Tabelas IV e V abaixo proporcionam os resultados de polarização de hematócrito estatístico para SS1 a SS4, em que duas análises foram conduzidas com cada tipo de tira sensora para cada uma das 21 amostras de sangue, para proporcionar 42 leituras. A Tabela IV mostra a inclinação, a interceptação e a razão I/S para cada lote de tiras sensoras, enquanto que a Tabela V mostra o percentual de leituras tendo polarizações dentro de $\pm 15 / \pm 15\%$, $\pm 10 / 10\%$ ou $\pm 5 / 5\%$ do valor de referência YSI. Para as concentrações de glicose inferiores a 75 mg/dL, a polarização é expressa como mg/dL (absoluta), e para as concentrações de glicose iguais ou superiores a 75 mg/dL, a polarização é expressa em percentual (relativa).

Sensor	Inclinação	Interceptação	Razão I/S, mg/dL
SS1	34,61	91,73	2,65
SS2	32,65	- 115,8	- 3,55
SS3	30,76	- 28,00	- 0,91
SS4	33,91	106,87	3,15

Tabela IV

Sensor	% de Polarização dentro de $\pm 15\%$	% de Polarização dentro de $\pm 10\%$	% de Polarização dentro de $\pm 5\%$
SS1	100	100	93
SS2	100	97,6	64
SS3	100	97,6	93
SS4	100	97,6	67

Tabela V

A Tabela IV estabelece que cada um dos lotes de tiras sensoras tinha uma razão I/S inferior a 5 mg/dL, estabelecendo, desse modo, o desempenho de sinal de fundo superior das tiras. O desempenho de um sistema sensor pode ser caracterizado pelo espalhamen-

to das polarizações contra os valores de referência. Esse espalhamento pode ser medido pelo percentual de valores de polarização caindo dentro de certos limites, tal como ± 15 mg/dL / $\pm 15\%$ ou ± 10 mg/dL / $\pm 10\%$. Quanto menor o limite, melhor o desempenho. Múltiplos fatores, incluindo a imprecisão de medida e o efeito de hematócrito, vão contribuir para os valores de polarização. Normalmente, o desempenho é julgado por ter pelo menos 95% da população de dados estando dentro de um certo limite predeterminado. Desse modo, a Tabela V estabelece que 100% da população de dados de SS1 a SS4 estava dentro do limite de ± 15 mg/dL / $\pm 15\%$. Além do mais, mais de 95% da população de dados de SS1 a SS4 estava dentro do limite de ± 10 mg/dL / $\pm 10\%$.

A Figura 7A ilustra a curva de resposta de dose do lote SS1 para as 21 amostras de sangue total. O valor de R^2 de 0,997 estabeleceu a capacidade da tira em proporcionar valores de corrente refletindo precisamente a concentração de glicose efetiva das amostras. A Figura 7B ilustra os espalhamentos das polarizações para os lotes SS1 a SS4, com as 42 leituras de 21 amostras pela faixa de concentrações de glicose no estudo de doador. A figura estabelece que 100% dos valores de polarização para todas as tiras sensoras caíram dentro de $\pm 15\%$, e que o desempenho dos lotes de manufatura SS1 e SS3 foi superior sob as condições do estudo com 93% da população de dados estando dentro do limite de 5%. O espalhamento estreito das polarizações para as tiras sensoras pode ser atribuído às maiores sensibilidade e precisão, refletidas nas pequenas razões I/S, e ao pequeno efeito de hematócrito proporcionado pelas tiras.

A Figura 7C ilustra a sensibilidade de hematócritos, a polarização de hematócritos em relação ao teor de hematócritos da amostra, obtidas do lote SS1, em comparação com uma tira convencional tendo uma densidade de deposição de $2,96 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ para um polímero HEC, $0,69 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ para um tampão cítrico, $2,14 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ para uma enzima de glicose oxidase, e $13 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ para o mediador de ferricianeto. Uma sensibilidade de hematócritos de -0,26 foi obtida para o lote SS1, enquanto que as tiras sensoras convencionais tinham uma inclinação de -1,26, com os valores de inclinação numericamente maiores indicando uma maior sensibilidade de hematócritos. Desse modo, a sensibilidade de hematócritos do lote SS1 foi aproximadamente 79% menor do que aquela proporcionada pelas tiras convencionais.

Para proporcionar um entendimento claro e consistente do relatório descritivo e das reivindicações, as definições apresentadas a seguir são proporcionadas.

"Sistema" é definido como uma tira sensora eletroquímica em comunicação elétrica pelos seus condutores com um dispositivo de medida eletrônico, que propicia a quantificação de um analisado em uma amostra.

"Dispositivo de medida" é definido como um dispositivo eletrônico, que pode aplicar um sinal de entrada elétrico e medir o sinal de saída resultante. O dispositivo de medida

também pode incluir a capacidade de processamento para determinar a presença e/ou a concentração de um ou mais analisados, em resposta ao sinal de saída.

"Analisaado" é definido como uma ou mais substâncias presentes em uma amostra. Uma análise determinar a presença e/ou a concentração do analisado presente na amostra.

5 "Amostra" é definida como uma composição que pode conter uma proporção desconhecida do analisado. Tipicamente, uma amostra para análise eletroquímica está em forma líquida, e, de preferência, a amostra é uma mistura aquosa. Uma amostra pode ser uma amostra biológica, tal como sangue, urina ou saliva. Uma amostra pode ser também um derivado de uma amostra biológica, tal como um extrato, uma diluição, um filtrado, ou um precipitado reconstituído.

10 "Condutor" é definido como uma substância eletricamente condutora, que se mantém estacionário durante uma análise eletroquímica. Os exemplos de materiais condutores incluem metais sólidos, pastas metálicas, carbono condutor, pastas de carbono condutor, e polímeros condutores.

15 "Material não ionizante" é definido como um material que não ioniza durante a análise eletroquímica de um analisado. Os exemplos de materiais não ionizantes incluem carbono, ouro, platina e paládio.

"Desempenho de medida" é definido em termos de exatidão e/ou precisão. Desse modo, um aumento no desempenho de medida pode ser um aumento em exatidão e/ou precisão da medida.

20 "Precisão" é definida como quão próximas as múltiplas medidas dos analisados são para a mesma amostra. A precisão pode ser expressa em termos do espalhamento ou variação entre as múltiplas medidas em relação a uma média.

"Exatidão" é definida como quão próxima a proporção de analisado, medida por uma tira sensora, corresponde à proporção real de analisado na amostra. Exatidão pode ser expressa em termos de polarização, com maiores valores de polarização refletindo menos exatidão.

25 "Polarização" é definida como a diferença entre um valor medido e o valor de referência aceito. A polarização pode ser expressa em termos de "polarização absoluta" ou "polarização relativa". A polarização absoluta pode ser expressa em unidades da medida, tal como mg/dL, enquanto que a polarização relativa pode ser expressa como um percentual do valor de polarização absoluta em relação ao valor de referência. A polarização de hematócritos ou de estabilidade pode ser expressa em termos de um valor de polarização absoluta, ou como um percentual. A polarização de hematócritos usa uma concentração de analisado obtida com um instrumento de referência, tal como o YSI 2300 STAT PLUS®, disponível da YSI Inc., Yellow Springs, Ohio, como o valor de referência aceito. A polarização de estabilidade usa uma concentração de analisado obtida de uma tira sensora, armazenada a uma

temperatura de -20°C, para reduzir substancialmente a alteração térmica da composição de reagentes.

5 "Sensibilidade de hematócritos" é definida como o grau no qual variações no nível de hematócritos de uma amostra afeta os valores de polarização de hematócritos para uma análise.

"Estabilidade de longo prazo" é definida em relação às tiras sensoras acondicionadas, tal como com folha e dessecante, e armazenadas a -20°C por 2 ou 4 semanas após manufatura versus as tiras sensoras expostas a 50°C por 2 ou 4 semanas, respectivamente. O armazenamento a 50°C por 2 semanas pode ser considerado como aproximadamente 18
10 meses de armazenamento à temperatura ambiente. A variação ou o desvio médio para os níveis de hematócritos de 0, 50, 100 e 400% no desempenho de medida para a tira armazenada a 50°C versus aquela a -20°C indica a direção da estabilidade de longo prazo ou "polarização de estabilidade" para a tira sensora. Nesse caso, um aumento no sinal de fundo ou na polarização mostra uma diminuição no desempenho de medida para a tira sensora. Desse modo, por armazenamento das tiras sensoras acondicionadas a 50°C e observando a
15 variação de polarização em relação às tiras armazenadas a -20°C, uma indicação de quanta polarização vai aumentar para as tiras sensoras remanescentes nas prateleiras de armazenamento, para os vários períodos de tempo, pode ser obtida.

"Mediador" é definido como uma substância que pode ser oxidada ou reduzida e
20 que pode transferir um ou mais elétrons. Um mediador é um reagente em uma análise eletroquímica e não é o analisado de interesse, mas proporciona uma medida indireta do analisado. Em um sistema simples, o mediador sofre uma reação de oxirredução, em resposta à oxidação ou redução do analisado. O mediador oxidado ou reduzido então sofre a reação oposta no eletrodo de medida da tira sensora e é regenerado ao seu número de oxidação
25 original.

"Espécie mensuráveis" é definidas como qualquer espécie eletroquimicamente ativa, que pode ser oxidada ou reduzida sob um potencial adequado na superfície do eletrodo de uma tira sensora eletroquímica. Os exemplos de espécies mensuráveis incluem um analisado, um substrato ou um mediador.

30 "Oxirredutase" é definida como qualquer enzima que facilita a oxidação ou redução de uma espécie mensurável. Uma oxirredutase é um reagente. O termo oxirredutase inclui: "oxidases", que facilitam as reações de oxidação nas quais oxigênio molecular é o aceitador de elétrons; "redutases", que facilitam as reações de redução nas quais o analisado é reduzido e oxigênio molecular não é o analisado; e "desidrogenases", que facilitam as reações
35 de oxidação nas quais oxigênio molecular não é o aceitador de elétrons. Consultar, por exemplo, *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Revised Edition*, A.D. Smith, Ed., Nova York: Oxford University Press (1997) pp. 161, 476, 477, e 560.

"Molécula orgânica eletroativa" é definida como uma molécula orgânica desprovida de um metal que é capaz de sofrer uma reação de oxirredução. As moléculas orgânicas eletroativas podem se comportar como espécies e/ou mediadores de oxirredução. Os exemplos de moléculas orgânicas eletroativas incluem co-enzima pirroloquinolina quinona (PQQ), benzoquinonas e naftoquinonas, N-óxidos, compostos nitrosos, hidroxilaminas, oxinas, flavinas, fenazinas, fenotiazinas, indofenóis e indaminas.

"Aglutinante" é definido como um material que proporciona suporte e contenção físicos aos reagentes, enquanto tendo uma grande compatibilidade química com os reagentes.

"Espessura inicial média" é definida como a altura média de uma camada no seu estado seco, antes da introdução de uma amostra líquida. O termo média é usado porque a superfície de topo da camada é desuniforme, tendo picos e vales.

"Densidade de deposição" é definida como a massa de um material depositado em uma área. Por exemplo, quando 0,24 μL de uma solução contendo 2,57 μL de um sólido são depositados em uma superfície tendo uma área de 1,5 mm^2 , uma densidade de deposição de 1,72 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ($2,57 \mu\text{g} / 1,5 \text{mm}^2$) resulta.

"Unidade enzimática" (U) é definida como a proporção de um sistema enzimático, que vai catalisar a transformação (oxidação ou redução) de 1 micromol de substrato (analisado) em 1 minutos, sob as condições usuais.

"Atividade enzimática" ou "atividade" com relação a um sistema enzimático é o número de unidades enzimáticas por volume. Desse modo, a atividade pode ser dada em termos de U/L ou mU/mL, em que 1 U/L = $\mu\text{mol}/\text{minuto}/\text{Litro}$, por exemplo.

"Reação de oxirredução" é definida como uma reação química entre duas espécies, envolvendo a transferência de pelo menos um elétron de uma primeira espécie para uma segunda espécie. Desse modo, uma reação de oxirredução inclui uma oxidação e uma redução. A parte de oxidação da reação envolve a perda de pelo menos um elétron pela primeira espécie, e a parte de redução envolve a adição de pelo menos um elétron para a segunda espécie. A carga iônica de uma espécie que é oxidada é tornada mais positiva por uma proporção igual ao número de elétrons transferidos. Igualmente, a carga iônica de uma espécie que é reduzida é feita menos positiva por uma proporção igual ao número de elétrons transferidos.

"Número de oxidação" é definido como a carga iônica formal de uma espécie química, tal como um átomo. Um número de oxidação mais alto, tal como (III), é mais positivo, e um número de oxidação mais baixo, tal como (II), é menos positivo. Uma espécie neutra tem uma carga iônica de zero (0). A oxidação de uma espécie resulta em um aumento no número de oxidação dessa espécie, e a redução de uma espécie resulta em uma diminuição no número de oxidação dessa espécie.

"Par de oxirredução" é definido como duas espécies conjugadas de uma substância química tendo diferentes números de oxidação. A redução da espécie tendo o número de oxidação mais alto produz a espécie tendo o número de oxidação mais baixo. Alternativamente, a oxidação da espécie tendo o número de oxidação mais baixo produz a espécie tendo o número de oxidação mais alto.

"Espécie oxidável" é definida como a espécie de um par de oxirredução tendo o número de oxidação mais baixo, e que é, desse modo, capaz de ser oxidado na espécie tendo o número de oxidação mais alto. Igualmente, o termo "espécie reduzível" é definido como a espécie de um par de oxirredução tendo o número de oxidação mais alto, e que é, desse modo, capaz de ser reduzido na espécie tendo o número de oxidação mais baixo.

"Espécie de oxirredução solúvel" é definida como uma substância que é capaz de sofrer oxidação ou redução, ou que é solúvel em água (pH 7, 25°C) a um nível de pelo menos 1,0 grama por litro. As espécies de oxirredução solúveis incluem as moléculas orgânicas eletroativas, os complexos organometálicos de transição e os complexos de coordenação de metais de transição. O termo "espécie de oxirredução solúvel" exclui os elementos metálicos, e os íons metálicos isolados, especialmente aqueles que são insolúveis ou muito pouco solúveis em água.

"Complexo organometálico de transição", também referido como "complexo OTM" é definido como um complexo no qual um metal de transição é ligado a pelo menos um átomo de carbono por uma ligação sigma (carga formal de -1 no átomo de carbono ligado por sigma ao metal de transição) ou uma ligação pi (carga formal de 0 nos átomos de carbono ligado por pi ao metal de transição). Por exemplo, ferroceno é um complexo OTM com dois anéis de ciclopentadienila (Cp), cada um deles ligado pelos seus cinco átomos de carbono a um centro de ferro por duas ligações pi e uma ligação sigma. Outro exemplo de um complexo OTM é ferricianeto (III) e a sua contraparte reduzida de ferrocianeto (II), em que seis ligantes de ciano (carga formal de -1 em cada um dos 6 ligantes) são ligadas por sigma a um centro de ferro pelos átomos de carbono dos grupos ciano.

"Complexo de coordenação" é definido como um complexo tendo uma geometria de coordenação bem definida, tal como uma geometria octaédrica, ou plana quadrada. Diferentemente dos complexos OTM, que são definidos pelas suas ligações, os complexos de coordenação são definidos pelas suas geometrias. Desse modo, os complexos de coordenação podem ser complexos OTM (tal como o ferricianeto mencionado acima), ou complexos nos quais os átomos não metálicos diferentes de carbono, tais como os heteroátomos incluindo nitrogênio, enxofre, oxigênio e fósforo, são ligados indiretamente ao centro do metal de transição. Por exemplo, rutênio hexamina é um complexo de coordenação tendo uma geometria octaédrica bem definida, na qual seis ligantes de NH_3 (carga formal de 0 em cada um dos 6 ligantes) são ligados indiretamente ao centro de rutênio.

Uma discussão mais completa de complexos organometálicos de transição, complexos de coordenação e ligação de metais de transição pode ser encontrada em Collman et al., *Principles and Applications of Organotransition Metal Chemistry* (1987) e Miessler & Tarr, *Inorganic Chemistry* (1991).

5 "Dispositivo portátil" é definido como um dispositivo que pode ser portado por uma mão humana e que é assim transportável. Um exemplo de um dispositivo portátil é o dispositivo de medida acompanhado do sistema de monitoramento de glicose no sangue Ascensia® Elite, disponível da Bayer HealthCare, LLC, Elkhart, IN.

10 "Em" é definido como "acima" e é relativo à orientação sendo descrita. Por exemplo, se um primeiro elemento é depositado sobre pelo menos uma parte de um segundo elemento, o primeiro elemento é dito como sendo "depositado em" o segundo. Em outro exemplo, se um primeiro elemento está presente acima de pelo menos uma parte de um segundo elemento, o primeiro elemento é dito como estando "em" o segundo. O uso do termo "em" não exclui a presença de substâncias entre os elementos
15 superior e inferior sendo descritos. Por exemplo, um primeiro elemento pode ter um revestimento sobre a sua superfície de topo, enquanto que um segundo elemento sobre pelo menos uma parte do primeiro elemento, e o seu revestimento de topo pode ser descrito como "em" o primeiro elemento. Desse modo, o uso do termo "em" pode significar ou não que os dois elementos sendo relacionados estão em contato físico
20 entre si.

Ainda que várias modalidades da invenção tenham sido descritas, vai ser evidente para aqueles versados na técnica que outras modalidades e implementações são possíveis dentro do âmbito da invenção. Consequentemente, a invenção não deve ser limitada exceto à luz das reivindicações em anexo e dos seus equivalentes.

REIVINDICAÇÕES

1. Tira sensora eletroquímica para detectar um analisado, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que compreende:

uma base;

5 um primeiro eletrodo na base tendo pelo menos uma primeira camada em um primeiro condutor, a primeira camada incluindo uma camada de reagentes, compreendendo pelo menos $8 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ de um mediador;

um segundo eletrodo na base;

uma tampa na base; e

10 em que a tira proporciona um valor de concentração determinado, tendo pelo menos uma de uma polarização de estabilidade inferior a $\pm 10\%$, após armazenamento a 50°C por 2 semanas, quando comparada a uma tira comparativa, armazenada a -20°C por 2 semanas, uma polarização de hematócritos inferior a $\pm 10\%$ para amostras de sangue total incluindo de 20 a 60% de hematócritos, e uma razão de interceptação
15 para inclinação de no máximo 20 mg/dL.

2. Tira, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que os primeiro e segundo eletrodos estão substancialmente no mesmo plano.

3. Tira, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o segundo eletrodo compreende a primeira camada em um segundo condutor.

20 4. Tira, de acordo com a reivindicação 3, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o segundo eletrodo compreende uma segunda camada no segundo condutor.

5. Tira, de acordo com a reivindicação 4, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a segunda camada compreende uma camada de reagentes, diferente em composição da camada de reagentes da primeira camada.

25 6. Tira, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que os eletrodos são separados por mais de $200 \mu\text{m}$.

7. Tira, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que os eletrodos são separados de uma parte superior da tampa por pelo menos $100 \mu\text{m}$.

30 8. Tira, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a espessura inicial da camada de reagentes é inferior a $8 \mu\text{m}$.

9. Tira, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a espessura inicial da camada de reagentes é de $0,25$ a $3 \mu\text{m}$.

35 10. Tira, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a camada de reagentes é formada a uma densidade de deposição de no máximo $0,2 \mu\text{L}/\text{mm}^2$, a partir de uma solução de reagentes.

11. Tira, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a camada de reagentes compreende um aglutinante polimérico selecionado do grupo

consistindo de poli (óxido de etileno), poli (álcool vinílico), hidroxietilenocelulose, carboximetilcelulose, e suas combinações.

5 12. Tira, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a densidade de deposição do aglutinante polimérico é no máximo de $2 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ no primeiro condutor.

13. Tira, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a camada de reagentes compreende um aglutinante polimérico parcialmente solúvel em água, que forma um material similar a gel por hidratação.

10 14. Tira, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a camada de reagentes compreende um sistema enzimático, a uma densidade de deposição de no máximo $0,8 \mu\text{g}/\text{mm}^2$.

15 15. Tira, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a camada de reagentes compreende no máximo 1,3 unidade de um sistema enzimático.

16. Tira, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a camada de reagentes compreende no máximo $2 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ do mediador.

17. Tira, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o mediador é um mediador de transferência de dois elétrons.

20 18. Tira, de acordo com a reivindicação 17, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o mediador é selecionado do grupo consistindo de 3-fenilimino-3H-fenotiazinas, 3-fenilimino-3H-fenoxazinas, seus sais, seus ácidos, seus derivados, e suas combinações.

19. Tira, de acordo com a reivindicação 17, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o mediador tem um potencial de oxirredução pelo menos 100 mV inferior àquele do ferricianeto.

25 20. Tira, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a polarização de estabilidade é inferior a $\pm 5\%$, após armazenamento a 50°C por 2 semanas, quando comparada com a da tira comparativa, armazenada a -20°C por 2 semanas.

30 21. Tira, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a polarização de estabilidade é inferior a $\pm 5\%$, após armazenamento a 50°C por 4 semanas, quando comparada com a da tira comparativa, armazenada a -20°C por 4 semanas.

35 22. Tira, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a polarização de hematócritos é inferior a $\pm 5\%$, para amostras de sangue total incluindo de 20 a 60% de hematócrito.

23. Tira, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a razão de interceptação para inclinação é no máximo de 10 mg/dL.

24. Tira, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a razão de interceptação para inclinação é no máximo de 1 mg/dL.

25. Tira sensora eletroquímica para detectar um analisado, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende:

5 uma base;

 um primeiro eletrodo na base tendo pelo menos uma primeira camada em um primeiro condutor, a primeira camada incluindo uma camada de reagentes, compreendendo um mediador e um sistema enzimático, em que a camada de reagentes proporciona um valor de concentração determinado tendo pelo menos uma de uma polarização de estabilidade inferior a $\pm 10\%$, após armazenamento a 50°C por 2 semanas, quando comparada a uma tira comparativa, armazenada a -20°C por 2 semanas, uma polarização de hematócritos inferior a $\pm 10\%$ para amostras de sangue total, incluindo de 20 a 60% de hematócrito, e uma razão de interceptação para inclinação de no máximo 20 mg/dL;

15 um segundo eletrodo na base;

 uma tampa na base.

26. Método de determinação da concentração de um analisado em uma amostra, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

20 aplicar uma sequência de pulsos à amostra, a sequência de pulsos compreendendo pelo menos 3 ciclos operacionais em um período de 30 segundos; e

 determinar a concentração do analisado na amostra, a concentração determinada tendo pelo menos uma polarização de estabilidade inferior a $\pm 10\%$, uma polarização de hematócritos inferior a $\pm 10\%$ para amostras de sangue total, por uma faixa de hematócritos de 20 a 60%, e uma razão de interceptação para inclinação de no máximo 20 mg/dL.

27. Método, de acordo com a reivindicação 26, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência de pulsos compreende pelo menos 3 ciclos operacionais em um período de 9 segundos.

28. Método, de acordo com a reivindicação 26, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência de pulsos está completa em no máximo 5 segundos.

29. Método, de acordo com a reivindicação 26, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a determinação da concentração do analisado na amostra inclui a determinação da concentração do analisado na amostra de uma medida de corrente feita em um período de 2 segundos, a partir da aplicação da sequência de pulso.

30. Método, de acordo com a reivindicação 26, **CARACTERIZADO** pelo fato de que cada ciclo operacional compreende uma excitação e uma relaxação.

31. Método, de acordo com a reivindicação 30, **CARACTERIZADO** pelo fato de

que cada uma das excitações tem uma duração de 0,01 a 3 segundos.

32. Método, de acordo com a reivindicação 30, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que as excitações têm uma duração somada de no máximo 10 segundos.

33. Método, de acordo com a reivindicação 30, **CHARACTERIZADO** pelo fato de
5 que as excitações são de amplitudes tendo uma diferença dentro de 500 mV.

34. Método, de acordo com a reivindicação 30, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que as excitações compreendem no máximo 45% do tempo da sequência de pulsos.

35. Método, de acordo com a reivindicação 30, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que cada uma das relaxações tem uma duração de 0,2 a 3 segundos.

10 36. Método, de acordo com a reivindicação 30, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência de pulsos inclui uma excitação inicial de 0,75 a 3 segundos em duração, em que a excitação inicial é de duração mais longa do que as excitações dos ciclos operacionais.

15 37. Método, de acordo com a reivindicação 26, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a polarização de estabilidade é inferior a $\pm 5\%$.

38. Método, de acordo com a reivindicação 26, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a polarização de estabilidade é inferior a $\pm 5\%$, após armazenamento a 50°C por 4 semanas, quando comparada com a tira armazenada a -20°C por 4 semanas.

20 39. Método, de acordo com a reivindicação 26, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a polarização de hematócritos é inferior a $\pm 5\%$ para amostras de sangue total, incluindo de 20 a 60% de hematócrito.

40. Método, de acordo com a reivindicação 26, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a razão de interceptação para inclinação é no máximo de 10 mg/dL.

25 41. Método de aumento do desempenho de determinação quantitativa de analisado, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

30 introduzir um analisado contendo amostra, tendo um componente líquido, em uma tira sensora eletroquímica, a tira tendo uma base, um primeiro condutor na base, um segundo condutor na base, e pelo menos uma primeira camada em pelo menos o primeiro condutor, em que a pelo menos uma primeira camada inclui uma camada de reagentes incluindo um aglutinante polimérico, e a amostra proporciona comunicação elétrica entre os primeiro e segundo condutores;

aplicar um potencial elétrico entre os primeiro e segundo condutores, na forma de pelo menos 4 pulsos de leitura em um período de 30 segundos;

35 medir pelo menos um dos pulsos de leitura para proporcionar um valor quantitativo da concentração de analisado na amostra com maior desempenho atribuível a pelo menos um parâmetro de desempenho, selecionado do grupo consistindo de polarização de estabilidade inferior a $\pm 10\%$, após a tira ser armazenada a 50°C por 2 se-

manas, quando comparada com uma tira comparativa armazenada a -20°C por 2 semanas, uma polarização de hematócritos inferior a $\pm 10\%$ por uma faixa de hematócritos de 20 a 60% para amostras de sangue total, uma razão de interceptação para inclinação de no máximo 10 mg/dL, e suas combinações.

5 42. Método, de acordo com a reivindicação 41, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que os pelo menos 4 pulsos de leitura são aplicados em um período de 9 segundos.

 43. Método, de acordo com a reivindicação 41, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que os pulsos de leitura estão completos em no máximo 5 segundos.

10 44. Método, de acordo com a reivindicação 41, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o pulso de leitura é medido em um período de 2 segundos de aplicação do potencial elétrico, para proporcionar o valor quantitativo da concentração de analisado na amostra.

 45. Método, de acordo com a reivindicação 41, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que os pulsos de leitura têm uma duração de no máximo 2 segundos.

15 46. Método, de acordo com a reivindicação 41, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que os pulsos de leitura são de amplitudes tendo uma diferença dentro de 50 mV.

 47. Método, de acordo com a reivindicação 41, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a polarização de estabilidade é inferior a 5%.

20 48. Método, de acordo com a reivindicação 41, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a polarização de estabilidade é inferior a 5%, após armazenamento a 50°C por 4 semanas, quando comparada com a da tira comparativa, armazenada a -20°C por 4 semanas.

25 49. Método, de acordo com a reivindicação 41, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a polarização de hematócritos é inferior a $\pm 5\%$ por uma faixa de hematócritos de 20 a 60% para amostras de sangue total.

 50. Método, de acordo com a reivindicação 41, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a razão de interceptação para inclinação é de no máximo 1 mg/dL.

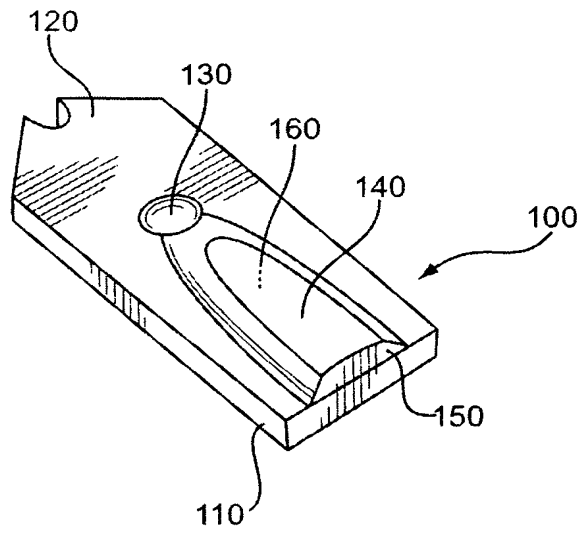


Fig. 1A

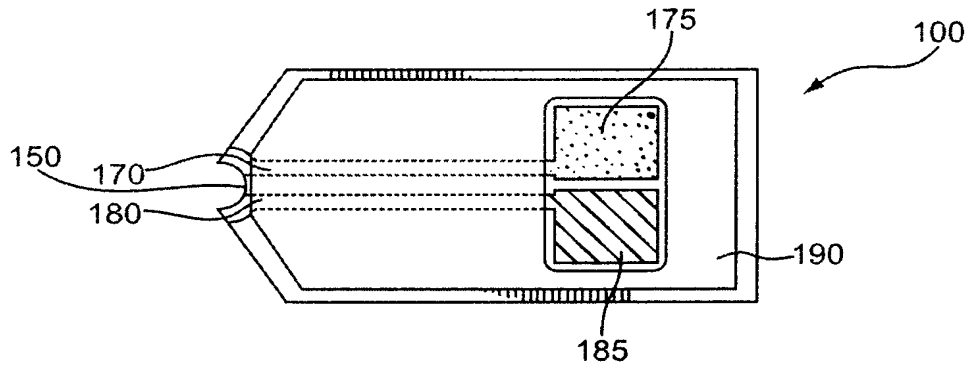


Fig. 1B

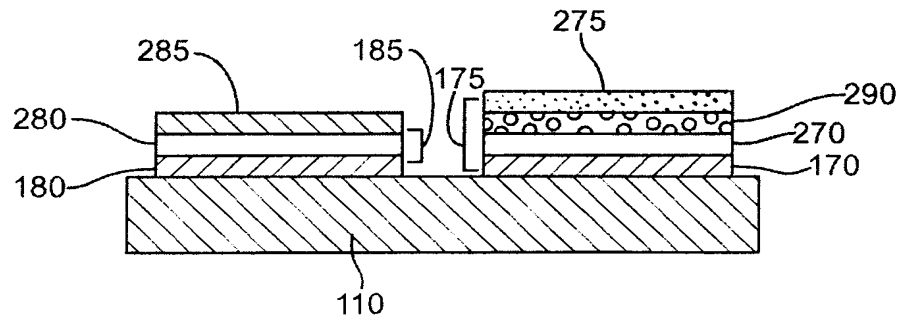


Fig. 2A

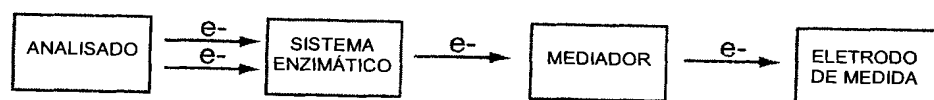


Fig.2B

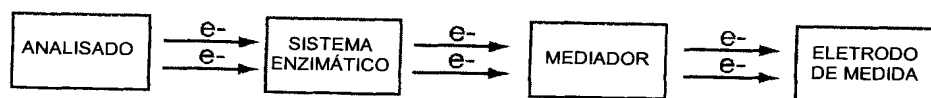


Fig.2C

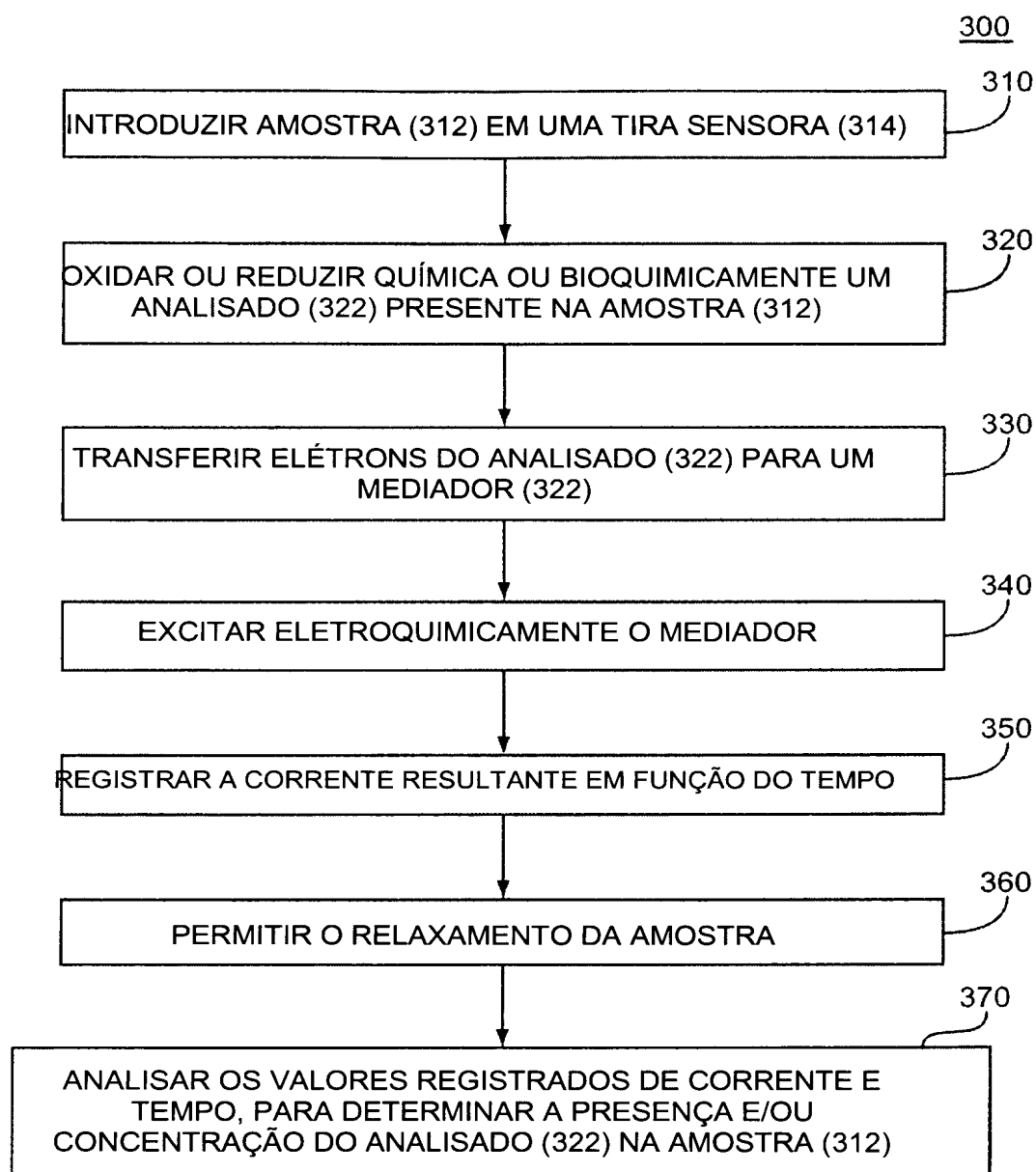


Fig.3

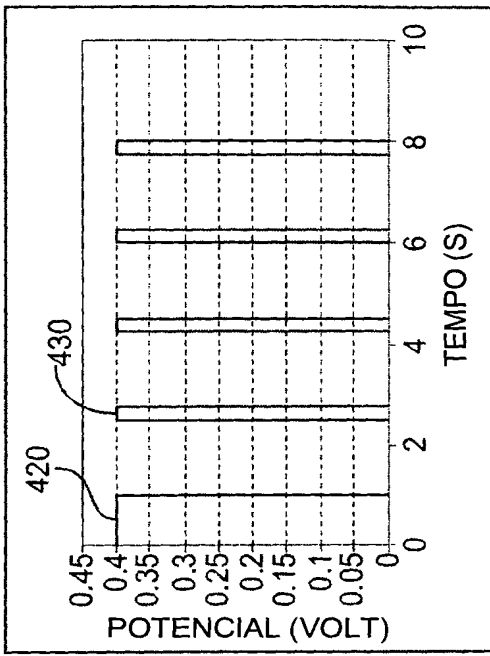


Fig. 4B

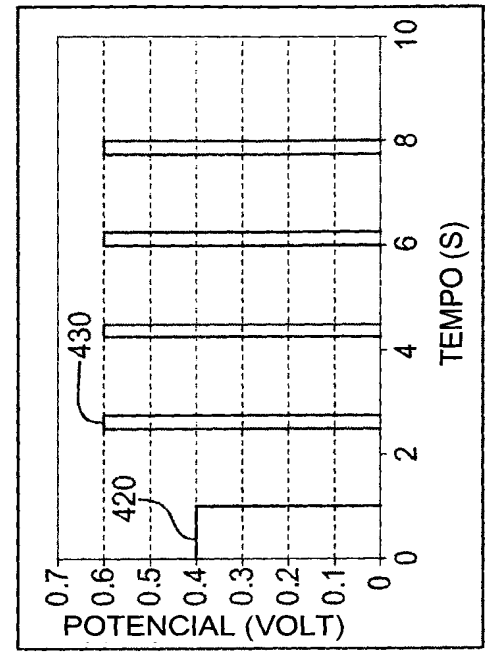


Fig. 4D

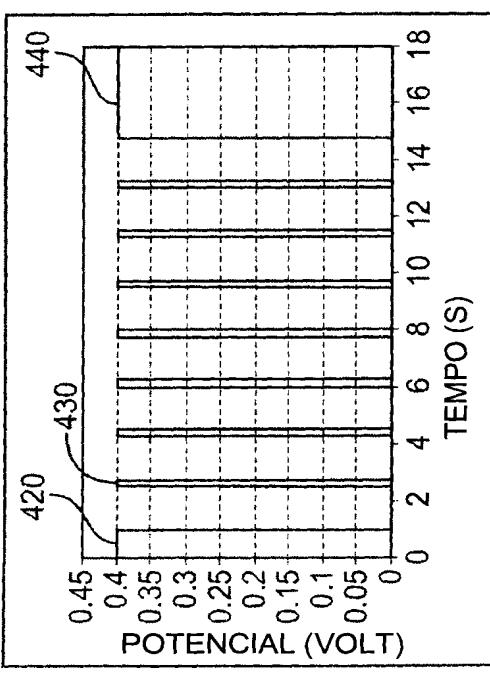


Fig. 4A

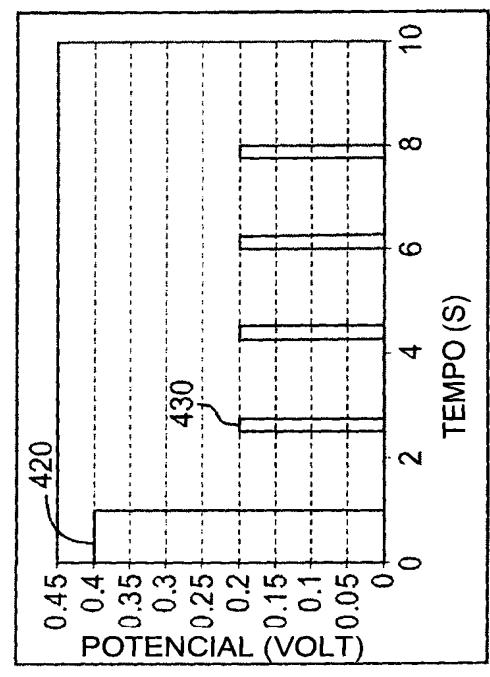


Fig. 4C

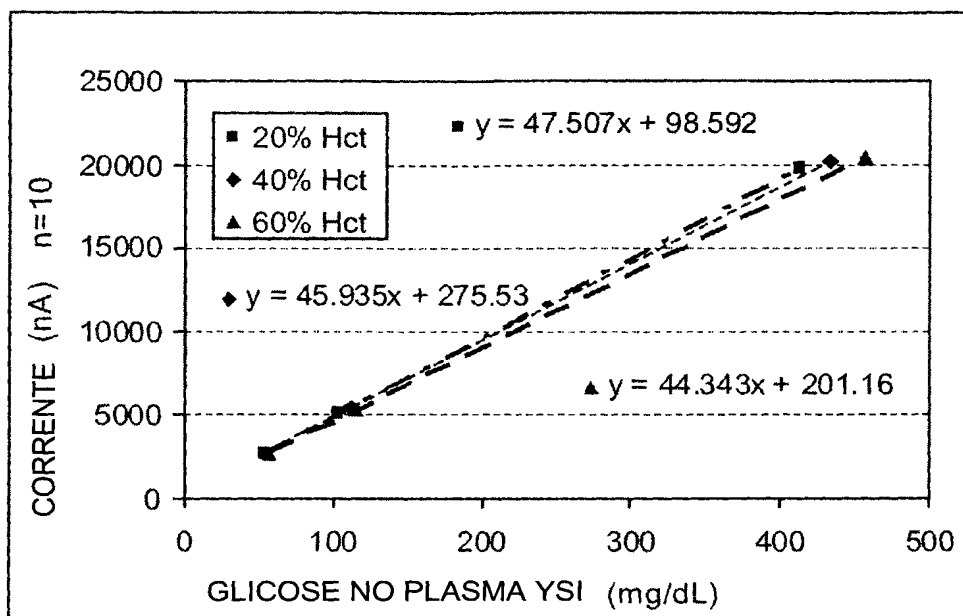


Fig.5A

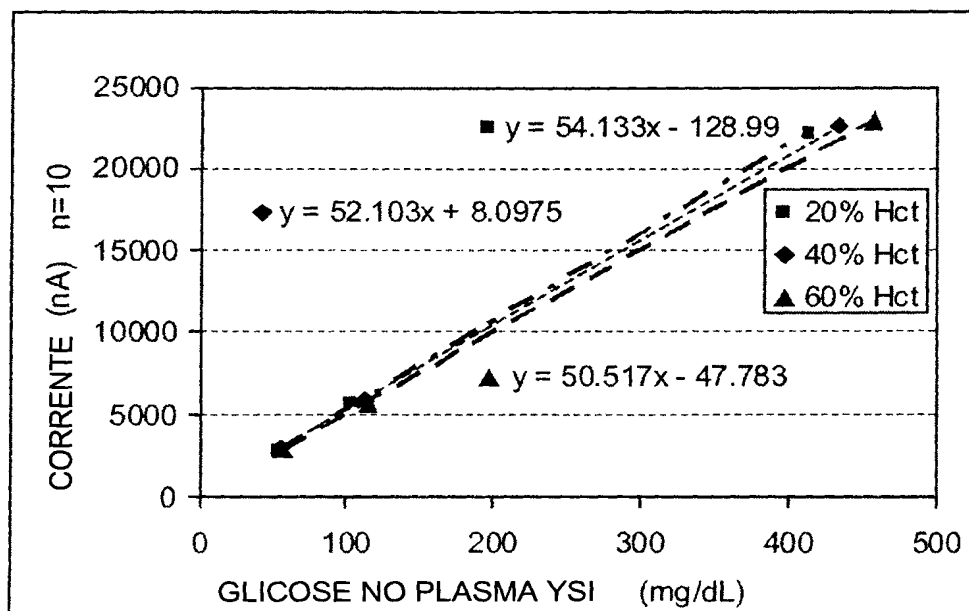


Fig.5B

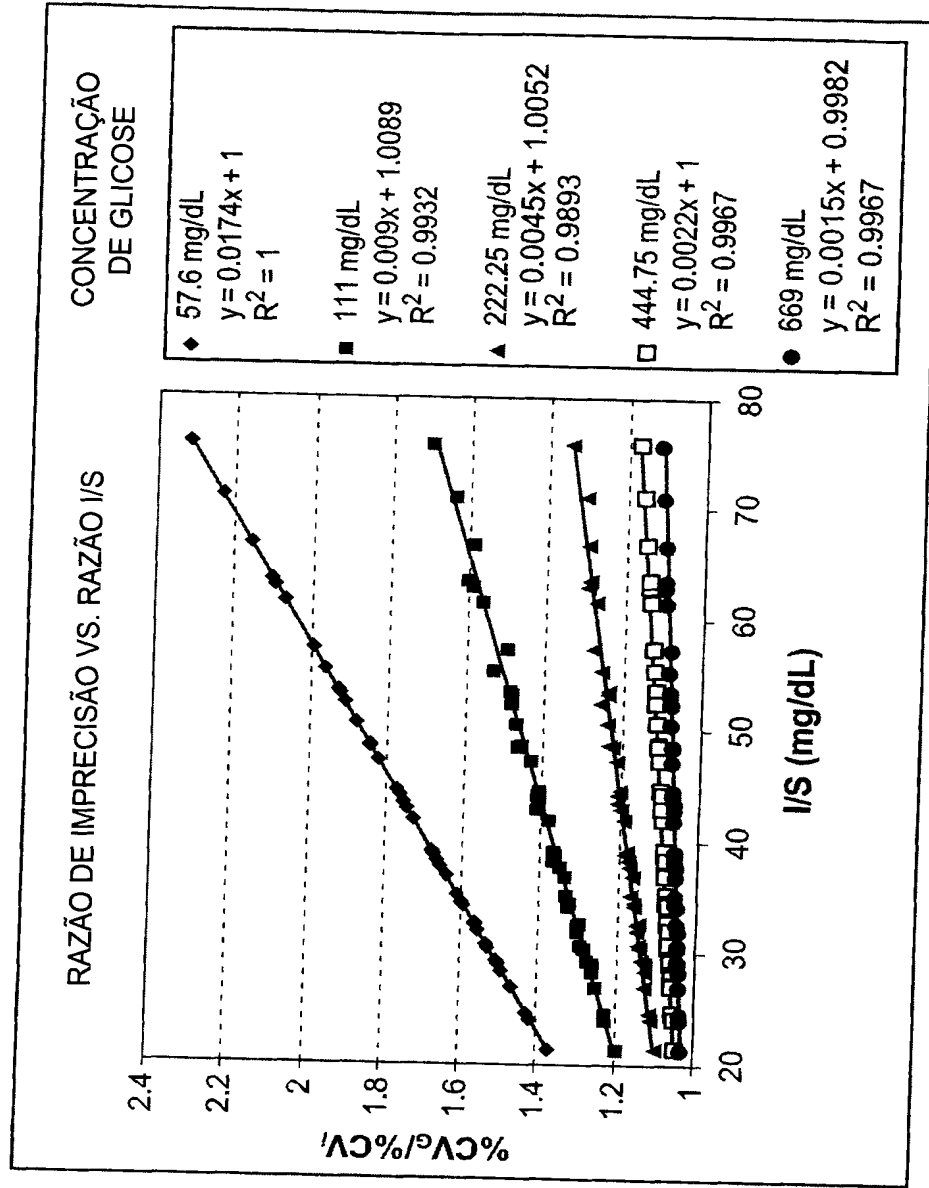


Fig. 5C

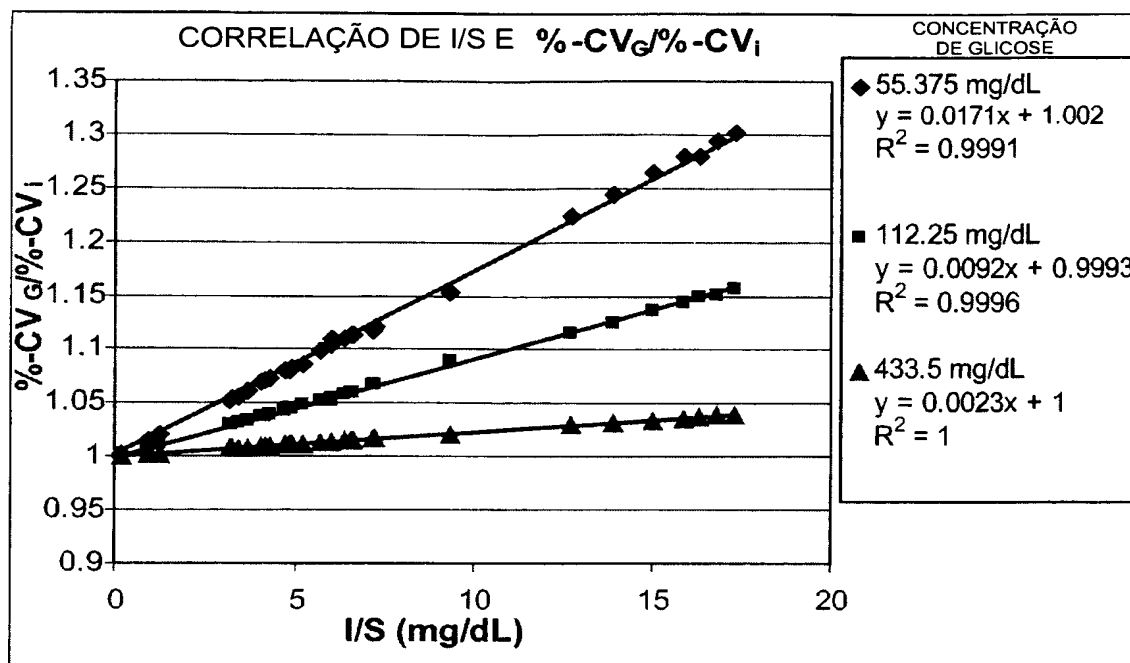


Fig.5D

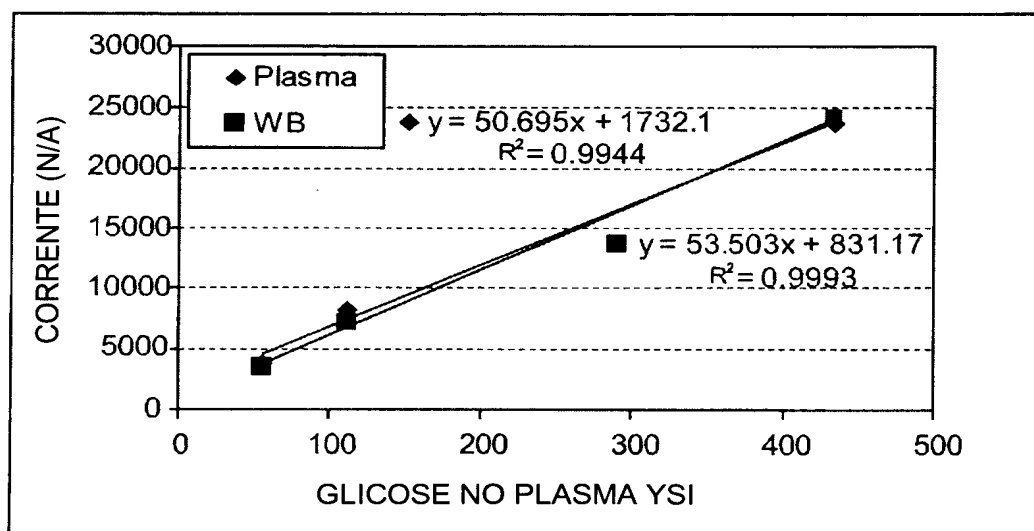


Fig.5E

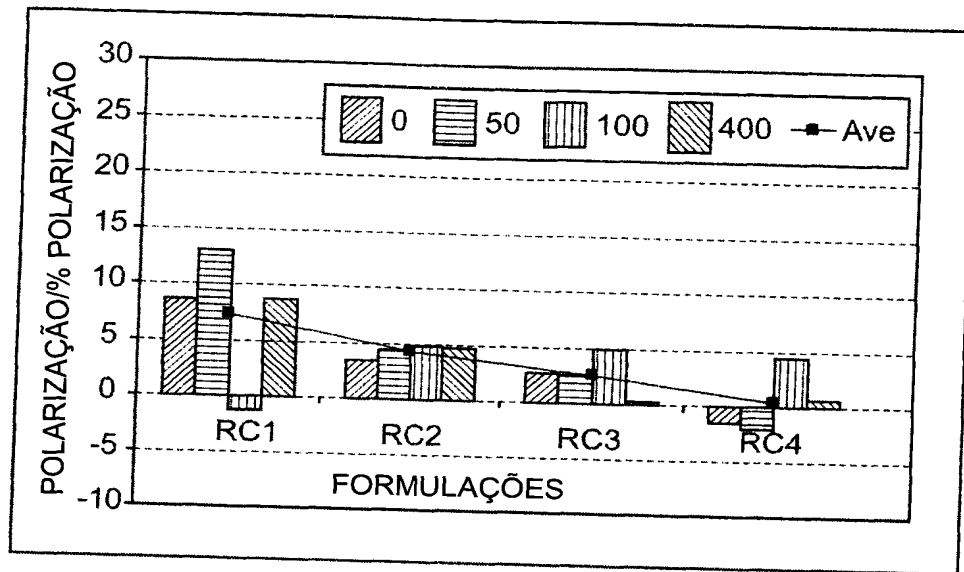


Fig.6A

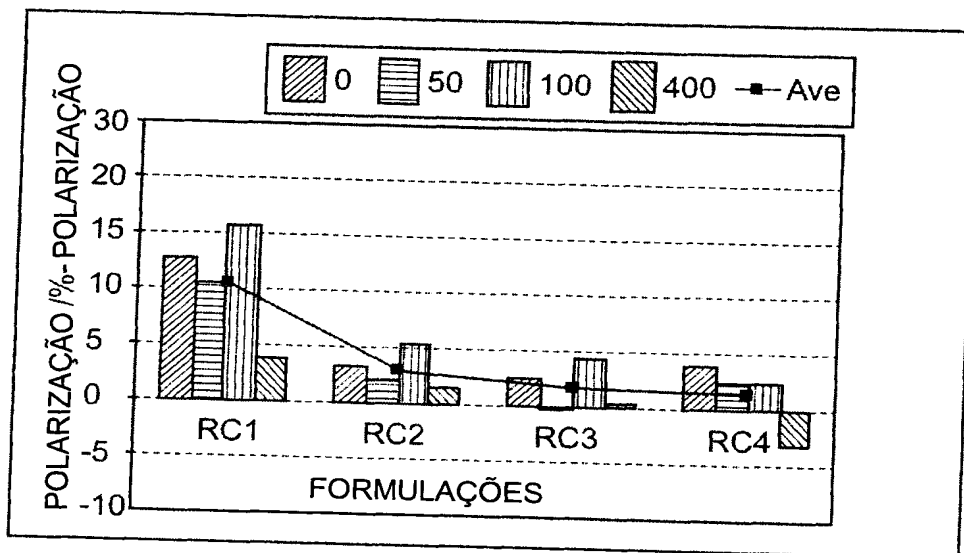


Fig.6B

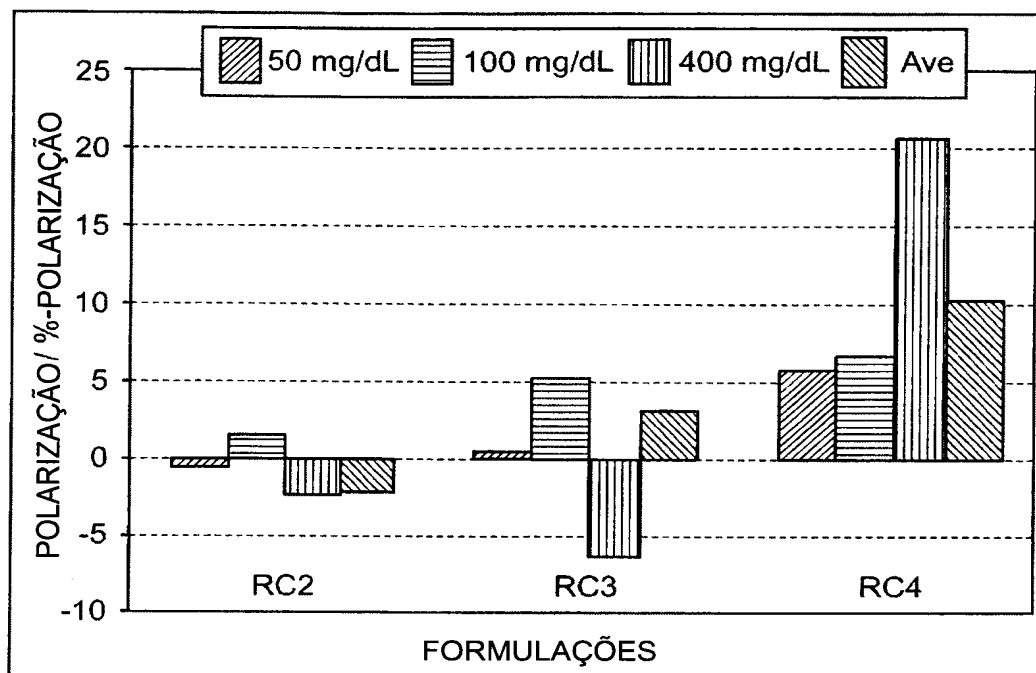


Fig.6C

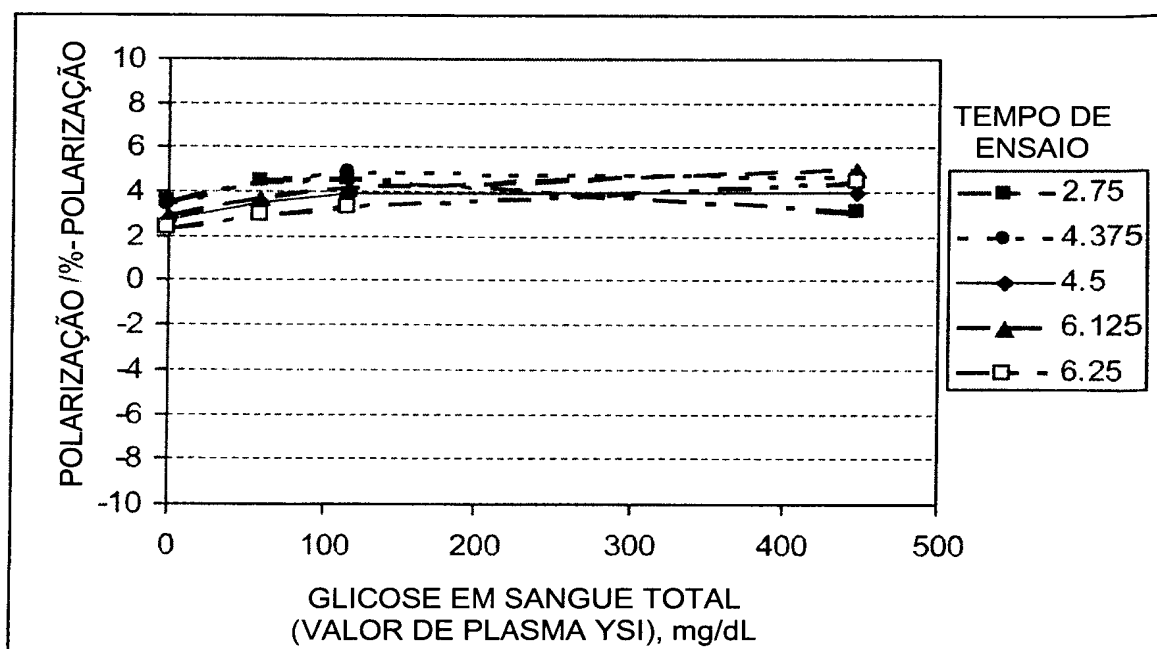


Fig.6D

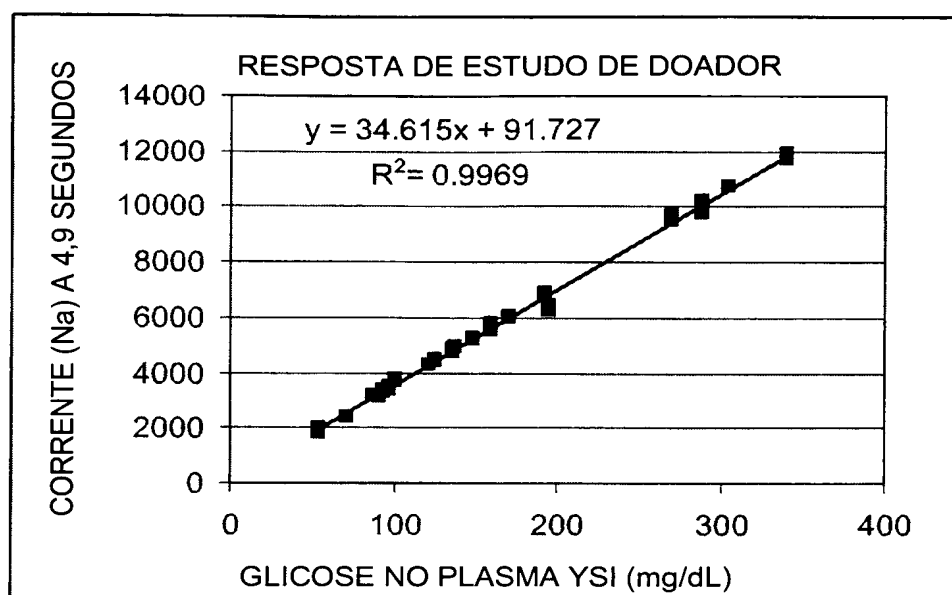


Fig.7A

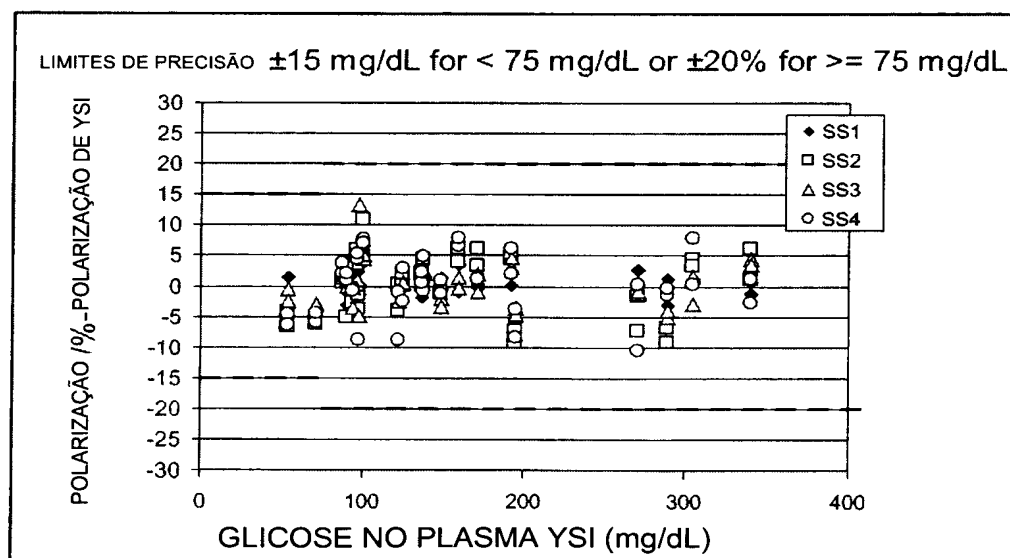


Fig.7B

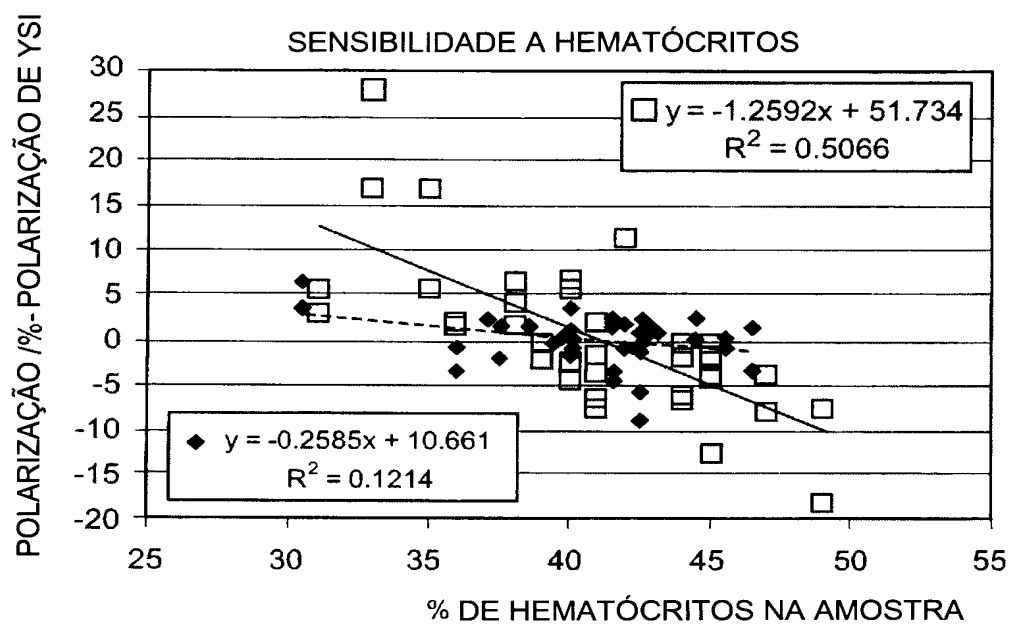


Fig.7C

RESUMO

"SISTEMA DE BIOSSENSOR TENDO ESTABILIDADE E DESEMPENHO DE HEMATÓCRITOS MAIORES"

5 A presente invenção se refere a tiras sensoras eletroquímicas e a métodos de determinação da concentração de um analisado em uma amostra, ou de aperfeiçoar o desempenho de uma determinação de concentração. As tiras sensoras eletroquímicas podem incluir no máximo $8 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ de um mediador. As tiras, a camada de reagentes da tira, ou os métodos podem proporcionar a determinação de um valor de concentração tendo pelo menos uma de uma polarização de estabilidade inferior a $\pm 10\%$, após
10 armazenamento a 50°C por 4 semanas, quando comparada a uma tira comparativa, armazenada a 20°C por 4 semanas, uma polarização de hematócritos inferior a $\pm 10\%$ para amostras de sangue total incluindo de 20 a 60% de hematócritos, e uma razão de interceptação para inclinação de no máximo 20 mg/dL. Um método de aumentar o desempenho de uma determinação quantitativa de analisado também é proporcionado.