

**DESCRIÇÃO**  
**DA**  
**PATENTE DE INVENÇÃO**

**N.º 98 515**

**REQUERENTE:** BOEHRINGER MANNHEIM GMBH, alemã, com sede em 6800 Mannheim 31, República Federal Alemã.

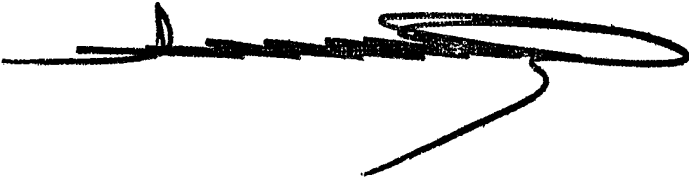
**EPÍGRAFE:** "PROCESSO E DISPOSITIVO PARA A APLICAÇÃO QUANTIFICADA DE UM LIQUIDO ANALITICO BIOQUIMICO A UM ALVO"

**INVENTORES:** Rolf Deeg, Eberhard Maurer, Reiner Babel, Sigmar Klose e Bernhard Köpfer

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

República Federal Alemã, 2 de Agosto de 1990, sob o N.º.

P 40 24 545.4.



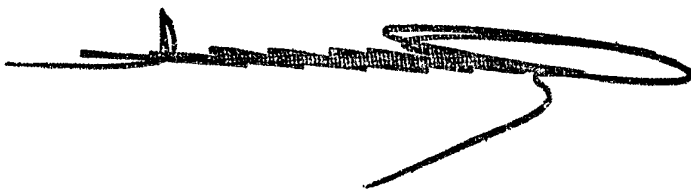
Descrição da patente de invenção de BOEHRINGER MANNHEIM GMBH, alemã, industrial e comercial, com sede em 6800 Mannheim 31, República Federal Alemã, (inventores: Rolf Deeg, Eberhard Maurer, Reiner Babel, Sigmar Klose e Bernhard Kopfer, residentes na Alemanha), para "PROCESSO E DISPOSITIVO PARA A APLICAÇÃO QUANTIFICADA DE UM LÍQUIDO ANALÍTICO BIOQUÍMICO A UM ALVO"

#### Descrição

A presente invenção refere-se a um processo para a aplicação quantificada de um líquido analítico a um alvo caracterizado por o líquido ser ejetado em pequenas quantidades sobre o alvo através de um bico e a um dispositivo apropriado.

Em química clínica, é frequentemente necessário efectuar a aplicação quantificada de um líquido analítico a um alvo. O líquido pode ser por exemplo uma amostra líquida, especialmente de sangue ou soro, um reagente líquido ou um líquido de calibração. Como regra geral, estes líquidos contêm proteínas ou outras macromoléculas que parti-

GSP :



cipam em processos bioquímicos.

O alvo sobre o qual se pretende aplicar o líquido pode ser um recipiente de reacção, sendo usados actualmente recipientes de reacção de plástico de dimensões muito pequenas especialmente em analisadores automáticos. Outro exemplo é constituído por placas de microtitulação frequentemente usadas em microbiologia. Um caso de particular importância para a presente invenção é a aplicação do líquido analítico a um elemento de análise (frequentemente designado como suporte do ensaio ou como elemento de análise no estado sólido). Em termos da presente invenção, este conceito inclui tanto elementos de análise discretos como bandas, tiras ou outras formas de elementos de análise contínuas que podem ser feitas passar de forma contínua através de uma estação de medida na qual se aplica o líquido analítico.

Tradicionalmente tem sido usadas várias formas de reservatórios de alimentação (dispensadores e diluidores) para a aplicação de líquidos analíticos em analisadores automáticos. Os reagentes são aplicados de modo predominante a elementos de análise de tal modo que se imerge por exemplo uma matriz de suporte, por exemplo feita de papel, num reagente líquido ou, segundo um processo de formação de camadas, prepara-se uma película de reagente a partir de um líquido com capacidade de formação de películas contendo polímeros. Se se pretende preparar especificamente um domínio de reagentes delimitado sobre uma camada de base, recomenda-se a utilização de técnicas de impressão.

Os pedidos de Patentes EP-A-119 573 e EP-A-268 237 (US 4 877 745) descrevem métodos e dispositivos do tipo indicado na introdução. A técnica descrita nestas publicações baseia-se na tecnologia de jacto de tinta originalmente desenvolvida para impressoras de computadores (impressoras de jacto de tinta). As duas memórias descritivas



contém ilustrações mais pormenorizadas do estado da técnica antecedente, que se dão como aqui reproduzidas.

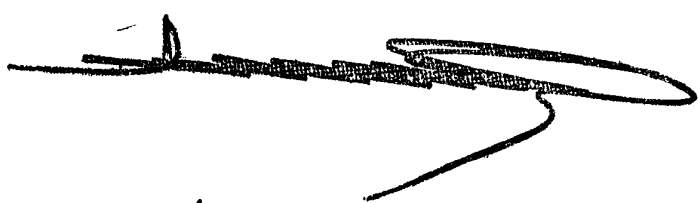
O pedido de Patente EP-A-119 573 trata especificamente do problema de proporcionar um "elemento de bombagem" económico projectado sob a forma de um componente descartável (uso único). A câmara de jactos neste caso é formada essencialmente por uma secção de um tubo elástico que forma parte do elemento de bombagem. Na direcção da sua superfície lateral situa-se uma vareta cilíndrica actuada electromagneticamente que se move contra o tubo cada vez que se pretende ejectar uma gota.

O pedido de Patente EP-A-268 237 descreve um dispositivo no qual a câmara de jactos é constituída por uma secção de um tubo rodeado por um elemento de actuação piezoeléctrico coaxial, também de desenho tubular, e que é comprimida quando se pretende ejectar uma gota.

Um objectivo da presente invenção consiste num processo ou num dispositivo para a aplicação de microquantidades de líquidos analíticos bioquímicos que é mais económico que os processos conhecidos até agora em termos de construção e que torna possível a quantificação muito precisa de quantidades muito reduzidas (menos de 1  $\mu$ l) a uma alta frequência (mais de 1000 Hz).

Este objectivo é alcançado, segundo um processo do tipo indicado na introdução, por um procedimento em que se evapora um volume parcial do líquido na câmara de jactos e se expande durante um curto período a fim de ejectar cada quantidade do líquido através do bico.

A tecnologia em que se baseia o processo de acordo com a presente invenção é conhecida para impressoras de computadores, onde é conhecida como técnica de jacto de bolha. No quadro da presente invenção estabeleceu-se



surpreendentemente que esta técnica de impressão pode ser transferida para a aplicação de líquidos analíticos.

Verificou-se que a utilização desta técnica para líquidos analíticos é excepcionalmente vantajosa. Em particular é possível fabricar de forma económica de bico descartável que contém o líquido analítico (especialmente reagentes ou líquidos de calibração) sob forma pré-embalada. Deste modo é possível uma simplificação e um aperfeiçoamento significativos no campo da análise automática, conforme se ilustra mais em pormenor seguidamente.

Em comparação com o pedido de Patente EP-A-119 573, no qual já se mencionou a possibilidade de "elementos de bombagem" descartáveis com reagentes pré-embalados, a solução de acordo com a presente invenção caracteriza-se especialmente pelo facto de que não são quaisquer necessárias peças mecânicas móveis, obtendo-se como resultado uma maior segurança. Para além disso, é possível preparar quantidades muito pequenas de líquido como uma frequência comparavelmente elevada.

Em comparação com o pedido de Patente EP-A-268 237, obtém-se uma simplificação apreciável em termos de construção. Os custos de fabrico são consideravelmente inferiores. A limpeza da câmara de jactos que é necessária no método piezoeléctrico já não é aplicável.

O facto de que a técnica do jacto de bolha não tenha ainda sido recomendado para a aplicação quantificada de líquidos analíticos bioquímicos, apesar destas vantagens significativas, pode ser atribuído à circunstância de esta técnica necessitar de um aquecimento muito forte do líquido analítico. Existe por conseguinte o risco de que as macromoléculas contidas no líquido, especialmente as substâncias proteicas, possam ser danificadas irreversivelmente na sua função ou de que possa ocorrer desnaturação



ou formação de agregados, o que pode bloquear os bicos. Surpreendentemente, no entanto, verificou-se que no quadro da presente invenção os efeitos sobre o líquido analítico que está associado com a técnica de jacto de bolha não representam qualquer dano de significado prático para as macromoléculas contidas no líquido ou qualquer problema de quantificação. Deste modo, por exemplo, experiências comparativas em que se determinou a actividade enzimática numa quantidade determinada de solução, antes do processamento da solução usando o método de acordo com a presente invenção, deram como resultado que se recuperou mais de 90 % da actividade original após a aplicação a um alvo.

Por meio do ensaio de vários líquidos analíticos obteve-se surpreendentemente o resultado de que é possível trabalhar numa gama de viscosidade relativamente ampla (aproximadamente entre 1 centistoke e mais de 10 centistokes). Este facto é particularmente vantajoso em comparação com as aplicações de líquidos analíticos anteriormente conhecidos de jacto de tinta, uma vez que se observou uma gama de viscosidade muito mais estreita no último caso. Mesmo no que diz respeito à tensão superficial que pode ser influenciado pela adição de detergentes ou de solventes seleccionados, provou-se surpreendentemente que o processo de acordo com a presente invenção é pouco crítico em comparação com a técnica conhecida.

A presente invenção é ilustrada mais em pormenor com o auxílio de um Exemplo que é representado esquematicamente nas Figuras:

A Figura 1 é um diagrama básico - parcialmente sob a forma de um diagrama de blocos - de um dispositivo para a preparação de elementos analíticos;



A Figura 2 é um diagrama básico na perspectiva de um analisador automático com base na presente invenção,

A Figura 3 é uma vista superior que mostra um domínio de reagentes de um elemento analítico, e

A Figura 4 apresenta duas curvas de calibração relativas ao Exemplo 4.

A Figura 1 mostra como os reagentes líquidos podem ser aplicados ao domínio de reagentes 1 de um elemento analítico 2 sob a forma de um padrão pré-determinado de compartimentos. O termo "compartimento" significa um subdomínio delimitado. Situada sobre o domínio de reagentes 1 fica uma cabeça de jactos, marcada no seu conjunto pelo número 3, com a câmara de jactos 4 e um bico 5. Na câmara de jactos 4, encontra-se um elemento de aquecimento 7 que está em contacto térmico com um líquido analítico 6 contido na câmara de jacto 4. Comandada por uma unidade de comando 8, aplica-se uma corrente pulsada ao elemento de aquecimento 7 por meio de um gerador de pulsos 7 e de um amplificador 10, de cada vez que se pretende ejetar uma quantidade do líquido analítico 6 pelo bico 5. Forma-se muito rapidamente uma bolha de vapor 11 (num período de cerca de 200  $\mu$ s) e a expansão desta bolha provoca a ejeção de uma gota de líquido através do bico 5. A câmara de jactos 4 está ligada, através de uma linha 12 com um filtro 13, e um reservatório 14 do líquido analítico 6. A cabeça de jactos 3, o filtro 13 e o reservatório 14 podem ser acomodados num conjunto descartável (unidade do jacto).

Com o auxílio de um mecanismo de direccionamento X-Y 15, também comandado pela unidade de comando 8, e de uma mesa de posicionamento 16, o elemento de análise 2 pode ser posicionado segundo as duas direcções do plano do




domínio dos reagentes 1 de modo que as quantidades do reagente líquido ejectadas sucessivamente pelo bico formem um padrão pré-determinado. Convém notar que a cabeça de jactos 3 pode também ser movimentada de modo apropriado, seja como alternativa ou em conjunto com o movimento referido.

Na Figura 1, mostra-se uma cabeça de jacto 3 com um único elemento de aquecimento 7 e um bico 5. No entanto é vantajoso que se usem cabeças de jactos com vários bicos (normalmente 9, 12 ou 24 bicos) como as que são geralmente utilizadas para os processos de impressão por jacto de tinta. Deste modo torna-se possível reduzir o movimento do elemento de análise 2 necessário para produzir um padrão pré-determinado e aumentar a eficiência de quantificação. Em particular, é possível produzir um padrão bidimensional do líquido analítico 6 sobre o domínio dos reagentes 1 por meio do movimento do elemento de análise 2 relativamente à cabeça de jactos 3 numa única direcção.

Evidentemente que quando se usa uma cabeça de jactos 3 com vários canais, o gerador de pulsos 9 e o amplificador 10 são, de modo correspondente, do tipo multi-canal.

Para além das características específicas descritas, podem ser usados na presente invenção os elementos estruturais conhecidos para a técnica de jacto de bolha. Por conseguinte não é necessário entrar em pormenores estruturais do dispositivo, especialmente da câmara de jactos, dos bicos ou dos elementos de aquecimento. Esta informação pode ser encontrada na literatura das impressoras de jacto de bolha,

Conforme se explicou anteriormente, é uma vantagem particular da presente invenção o facto de ser possível fabricar uma unidade de jacto a um custo de tal modo económico que pode projectar-se sob a forma de um ele-

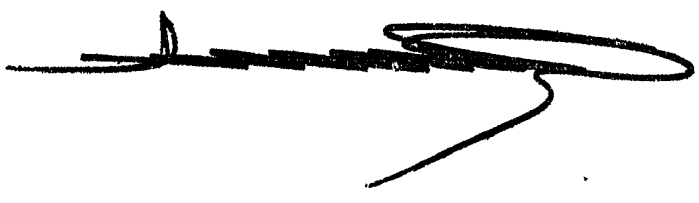


mento descartável contendo uma dose de líquido analítico pronta para usar (pré-acondicionada pelo fabricante). Deste modo eliminam-se as fases de manuseamento que agravam o custo quando se efectuam as análises com os aparelhos correspondentes. Assim, com um gasto relativamente reduzido na construção, é possível proporcionar sistemas de análise (constituídos pelo aparelho e por reagentes específicos adequados) que são excepcionalmente versáteis e fáceis de preparar. Na Figura 2 é apresentado um destes sistemas como exemplo.

O elemento de análise usado no aparelho apresentado na Figura 2 é uma banda 20 constituída por um material de suporte do reagente adequado, por exemplo papel ou uma película de plástico. Este elemento é fornecido à medida das necessidades por um rolo de alimentação 21 a um rolo tractor 22. Situados por cima da banda 20, numa estação de quantificação do reagente 23, estão vários suportes 24 na parte lateral do aparelho, que cooperam com os elementos de fixação 27 na unidade de jactos 25 para colocar este de modo intercambiável em posições definidas sobre a banda 20. Existem contactos eléctricos 24a e 25a nos suportes 24 e nas unidades de jactos 25 para efectuar uma ligação eléctrica entre o aparelho e uma unidade de jactos inserida no suporte 24.

Na direcção do movimento da banda 20 (flecha 26), a jusante da estação de quantificação do reagente 23, situam-se outras unidades de processamento; no caso ilustrado existe uma unidade de quantificação da amostra 28, duas unidades de lavagem 29a e 29b, outra estação de quantificação de reagentes 31 e uma unidade de medida 30.

O procedimento de análise inicia-se com a aplicação de líquidos analíticos, especialmente de reagentes, a banda 20 através de uma ou de várias unidades de jacto 25 da estação de quantificação do reagente 23, forman-

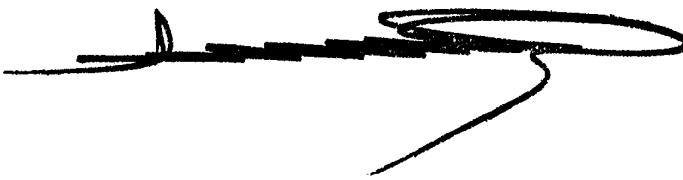


do domínios de reagentes 32 sobre a banda. A fim de assegurar a área pretendida dos domínios de reagentes 32 perpendicularmente à direcção do movimento 26, as unidades de jacto 25 possuem vários bicos adjacentes nas cabeças de jactos 3. Para além disto ou como alternativa, pode prever-se um movimento por meio de um mecanismo (não representado) transversalmente à direcção do movimento 26 da banda 20.

A unidade de quantificação da amostra 28 fornece uma dose de amostra. Quando necessário, é possível efectuar lavagens intermédias com asunidades de lavagem 29a e 29b. A estação de quantificação de reagente 31 possibilita a quantificação de outro reagente. A finalidade da unidade de medida 30 é medir um parâmetro físico característico da análise, por exemplo a reflectância óptica ou a fluorescência a um comprimento de onda de medida determinado.

Não se discutem na presente memória descritiva outros pormenores ou possíveis variantes do processo. A presente invenção pode ser usada num grande número de utilizações diferentes (por exemplo, imunoenálise heterogéneas, determinações enzimáticas, etc) em que se faz passar um elemento de análise, após aplicação de um reagente líquido, por um processo contínuo para uma estação de deposição de amostra, se faz contactar uma amostra com o domínio de reacção e se mede uma alteração fisicamente mensurável que ocorre como consequência da reacção entre a amostra e o reagente. Este procedimento já foi proposto, especialmente na Patente US 3 526 480, que se dá como aqui reproduzida.

Uma característica decisiva da presente invenção reside em que, no que se refere ao fornecimento de reagente, é possível uma adaptação muito simples e flexível aos requisitos da análise particular que se pretende efectuar. Deste modo, mudando simplesmente as unidades de jactos 25, o aparelho pode ser adaptado a diferentes análises, trabalhando com diferentes reagentes, sem necessidade de mudar contento-



res de reagentes ou de lavar os tubos de alimentação e os sistemas de medida usados em sistemas convencionais. A disposição de vários suportes de elementos de jacto ao longo do caminho de um elemento de análise conduzido pelas fases sucessivas de um processo contínuo torna possível, por um lado, dosear diversos reagentes diferentes em momentos diferentes e, por outro lado, mesmo para um único reagente, adaptar facilmente o intervalo de tempo para a aplicação ao elemento de análise e a disposição da amostra aos requisitos específicos.

Até agora apenas tinha sido possível uma disposição de tanta simplicidade mediante a utilização de elementos de análise pré-preparados como os usados normalmente sob a forma externa de tiras de análise ou de placas de análise. No entanto, nestes casos tornava-se necessário um mecanismo de movimentação caro para os elementos de análise. Para além disso, os elementos de análise tinham de ser conservados durante períodos prolongados entre o fabrico e a utilização. Tendo em consideração a problemática estabilidade durante o armazenamento destes elementos de análise, resulta desta circunstância um custo elevado. Em virtude da presente invenção, o elemento de análise com um domínio de reagentes que contém a combinação de reagentes pretendida pode ser facilmente preparado de fresco imediatamente antes de usar (isto é, antes de se depositar a amostra).

O elemento de análise transportado de forma contínua não tem necessariamente de ter a forma de uma banda. Em função dos requisitos de análise, será também possível usar pequenos reactores, por exemplo sob a forma de placas de plástico com alvéolos ligados entre si ou de outra forma de suportes de reagentes transportáveis.

A presente invenção pode ser utilizada com vantagem para a aplicação de uma grande variedade de reagentes convencionais empregues em química clínica a um su-



porte sólido. Por exemplo, é possível aplicar enzimas, substratos ou outros componentes solúveis reactivos a um suporte de tal modo que seja fácil fazer a respectiva eluição a fim de reagirem na fase líquida. No entanto, a presente invenção pode também ser usada com vantagem para a aplicação de reagentes que estão ligados ao suporte (especialmente anticorpos, antigenes, etc.). Por fim, pode ser conveniente que os componentes da reacção sejam aplicados em primeiro lugar por outros métodos à superfície do suporte a que se efectua a aplicação pelo processo de acordo com a presente invenção. Deste modo, por exemplo, é possível proporcionar um material de suporte numa grande superfície com um revestimento superficial contendo estreptavidina, sobre o qual se aplicam selectiva e especificamente reagentes biotinilados, sendo os preferidos reagentes ligados ao suporte por meio de ligações biotina-estreptavidina, São descritos mais pormenores no pedido de Patente Alemã "Analyseelement und Verfahren zu seiner Herstellung" ("Elemento de análise e processo para a sua preparação") ("Processo do Agente de Patente BM 3382/00/DE), depositada simultaneamente, que se dá como aqui reproduzida.

Se, usando o processo de acordo com a presente invenção, se aplicam vários reagentes líquidos diferentes a um domínio de reagentes, é vantajoso escolher o padrão de aplicação de tal modo que os compartimentos produzidos por quantidades dos diferentes reagentes líquidos não venham a entrar em contacto entre si. Isto aplica -se especialmente se os reagentes contidos nos líquidos interferem entre si (pelo menos no estado líquido). Neste caso, as quantidades dos diferentes reagentes líquidos formam de preferência um padrão de compartimentos em alternância de modo a que fiquem adjacentes mas separados por intervalos. A este respeito faz-se novamente referência ao pedido de Patente referido depositado simultaneamente.

Este padrão de compartimentos é apresentado na Figura 3.




No Exemplo ilustrado, as quantidades de reagente líquido formam várias filas de compartimentos 35, contendo cada uma muitas rodela 36 dispostas adjacentes umas às outras, sendo cada rodela produzida por uma quantidade do reagente líquido. Para o caso em que o reagente líquido é aplicado ao suporte segundo um processo contínuo, como se mostra na Figura 2, os diferentes compartimentos com a mesma composição de reagente podem ser ejetados de modo conveniente a partir de bicos diferentes da mesma unidade de jactos 25. A direcção do movimento é paralelo às colunas (flecha 26) neste caso.

As letras inscritas na parte superior da Figura 3 indicam três conjuntos diferentes - A, B e C - de compartimentos 35, contendo os compartimentos 35 no mesmo conjunto os mesmos reagentes e diferindo os reagentes em conjuntos diferentes na sua composição química.

Também podem ser usadas outras disposições de rodela em vez de filas alternadas. Em especial, pode ser conveniente um padrão de manchas constituído por rodela que não se sobreponham mutuamente (de tal forma que cada rodela forme um compartimento).

No Exemplo ilustrado, as rodela em cada compartimento estão afastadas pouco mais de 0,1 mm. A distância entre os compartimentos é de cerca de 0,26 mm. Só se usou um compartimento alternadamente em cada dois que se podiam produzir pela técnica de impressão. Em principio, a distância entre as rodela pode ser ainda menor.

No quadro da presente invenção verificou-se que uma disposição densa como a descrita, produzida pelo processo de acordo com a presente invenção, de rodela constituídas por reagentes líquidos diferentes torna possível em muitos casos realizar de modo vantajoso vários procedimentos analíticos. Até ao presente quando se usavam reagentes



diferentes mutuamente incompatíveis num elemento de análise, estes reagentes eram integrados em camadas diferentes de um elemento de análise de multicamada, sendo estas camadas preparadas separadamente e em seguida combinadas entre si e sendo aplicadas sucessivamente a uma camada de base num processo de deposição de camadas. De facto, já foi proposto na Patente DE-C2-27 29 333 a aplicação de reagentes mutuamente incompatíveis sobre uma superfície pelo processo de impressão de serigrafia de modo a que as áreas de aplicação sejam alternadas. No entanto esta técnica conhecida é cara e necessita de tempos de reacção prolongados. O processo de acordo com a presente invenção torna possível a produção de distâncias tão pequenas entre as rodelaas que, após aplicação da amostra, os diferentes reagentes misturam-se rapidamente e a mistura é virtualmente completa permitindo uma reacção homogénea.

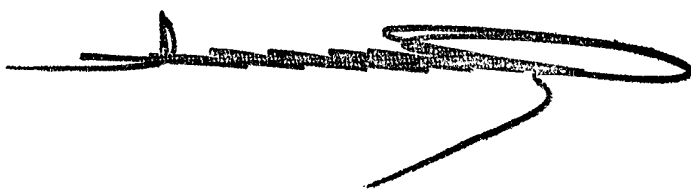
Os exemplos que se seguem destinam-se a elucidar mais completamente a presente invenção.

**Exemplo 1:**

Substituiu-se a tinta da cabeça de uma impressora de jacto de tinta funcionando de acordo com o principio do jacto de bolha (Hewlett-Packard Quiet Jet plus) por uma solução de corante de tartrizina.

**Dados da cabeça de impressão:**

- 12 jactos dispostos em fila
- diâmetro das gotas: cerca de 75  $\mu$ m
- menor quantidade mensurável (1 gota): 230 picolitros
- máxima densidade de impressão por fase de impressão: 75,6 x 75,6 gotas/cm<sup>2</sup> (192 x 192 gotas/polegada<sup>2</sup>)



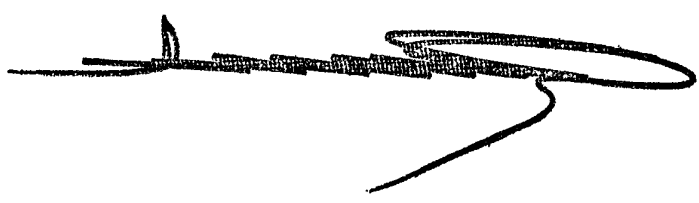
Esta cabeça de impressão é acomodada em conjunto com um reservatório de tinta num conjunto removível. A cabeça de impressão é comandada por meio de um computador pessoal com o auxílio de um programa de comando em Basic.

Mediram-se volumes de entre 0,1 e 5  $\mu$ l da solução do corante (40  $\mu$ g/ml de tartrazina em tampão de fosfato de sódio 40 mM (NaPB) de pH 7,4) para tubos de ensaio para cada um dos quais se tinham previamente pipetado 2 ml de água destilada. Em seguida misturaram-se cuidadosamente os componentes num analisador, comercial (ES 22 da Boehringer Mannheim GmbH) e mediu-se a extinção a 405 nm. Efectuaram-se 15 determinações a fim de calcular a precisão da medida do volume. Os resultados são apresentados no Quadro 1.

#### Exemplo 2:

Neste Exemplos, mediu-se de modo análogo ao do Exemplo 1 uma solução de 0,5 mg/ml da enzima peroxidase em NaPB 40 mM de pH 7,4, com 3% em peso de polivinilpirrolidona e 0,01 % em peso de Triton-X-100. Neste caso, cada um dos tubos já continha 2 ml de solução de substrato ABTS<sup>(R)</sup> (1,9 mmol/l de 2,2'-azinodi[3-etilbenzotiazolidina-6-sulfonato] de diaminio; 100 mmol/l de tampão de fosfato/citrato de pH 4,4; 2,2 mmol/l de perborato de sódio). Os volumes medidos situavam-se entre 0,23 e 80 nl. Determinaram-se de modo análogo ao do Exemplo 1 as extinções e a precisão da medição dos líquidos.

Os resultados do Exemplo 2 são apresentados no Quadro 2.



Quadro 1:

VOLUME ( $\mu$ l)	0,1	0,2	0,6	2	5
CV (%)	1,4	0,96	0,63	0,57	0,65

Quadro 2:

VOLUME (nl)	0,23	0,46	1	20	80
CV (%)	7,77	4,95	3,84	4,1	1,98


Nos dois quadros indicam-se o volume nominal e o coeficiente de variação CV. Os valores de CV, que se baseiam em 15 medições em cada caso, mostram que a precisão da medição (relativamente aos volumes muito pequenos) é excelente.

Exemplo 3:

Processou-se com uma cabeça de impressão de modo correspondente ao dos Exemplos 1 e 2 um reagente líquido com a composição seguinte:

tris.HCl 100 mM de pH 7.9  
ácido tribromo-hidroxibenzóico 15 mM  
hidrazona de 3-metil-2-benzo-(2'-sulfo)-  
-tiazolinona 5 mM  
oxidase de sarcosine a 50 U/ml  
peroxidase a 10 U/ml

Aplicou-se a solução de revestimento a um papel absorvente com a máxima densidade de impressão (75,6 x 75,6 gotas/cm<sup>2</sup> (192 x 192 gotas/polegada<sup>2</sup>), produzindo seis domínios de reagentes separados. Repetiu-se a aplicação três vezes, sendo a quantidade total de líquido aplicado de cerca de 3,9  $\mu$ l/cm<sup>2</sup>. Secou-se em seguida o papel à temperatura ambiente (cerca de 30 min) ou aplicou-se a amostra imediatamente.




Se se aplicar 1  $\mu$ l de amostra com concentração de sarcosina variáveis entre 0 e 100 mM a cada um dos seis domínios de reagentes, produz-se uma alteração de cor bem graduada após cerca de 1 min, a qual pode ser calibrada e quantificada de modo convencional por fotometria de reflectância. O limite de detecção visual é de cerca de 10 ng de sarcosina/ $\mu$ l.

Este Exemplo mostra que, de acordo com a presente invenção, pode facilmente preparar-se mesmo um elemento de análise trabalhando com quantidades relativamente elevadas de reagentes para um ensaio enzimático. Em comparação com as análises convencionais, há uma poupança significativa de reagente e é possível trabalhar com uma quantidade muito reduzida de amostra. O limite mínimo de detecção mostra que não houve virtualmente perda de actividade enzimática.

Exemplo 4:

Efectuaram-se análises da hormona da tiróide TSH por um lado com um sistema de imunoanálise convencional (sistema enzimático ES 22 da Boehringer Mannheim GmbH, Experiência A) e por outro lado com um sistema modificado de acordo com a presente invenção (Experiência B). As várias fases da Experiência B foram efectuadas do modo seguinte:

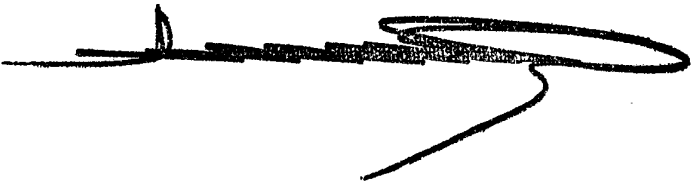
- a) Usaram-se tubos de poliestireno revestidos de estreptavidina (preparada de acordo com EP-A-0344578). Pipetaram-se para cada tubo 100  $\mu$ l da amostra ou de padrão.
- b) Aplicaram-se, usando uma cabeça de impressão como as dos Exemplos 1 a 3, 10  $\mu$ l de uma solução de conjugado previamente filtrada através de um filtro de 0,8  $\mu$ m. A solução de conjugado continha 18 U/ml de



um conjugado constituído por um anticorpo monoclonal dirigido contra TSH (ECACC 87122202) e peroxidase em tampão de fosfato de sódio (NaPB) 80 mM de pH 7,4.

- c) 1 min após a adição do conjugado, adicionaram-se ao referido sistema por meio da unidade de quantificação 1 ml de tampão de incubação (NaPB 80 mM de pH 7,4 com 1250  $\mu\text{g/ml}$  de um anticorpo monoclonal biotinilado dirigido contra TSH (ECACC 87122201), 2 g/l de albumina de soro de bovino e 1 g/l de IgG de bovino). (A biotinilação do anticorpo foi efectuada de acordo com JACS 100 (1978, 3585-3590) por reacção com N-hidroxissuccinimidobiotina numa proporção de 10:1.)
- d) Incubou-se em seguida a mistura durante 60 min.
- e) Efectuaram-se 5 ciclos de lavagem, cada um constituído por aspiração da solução reagente e adição de água da torneira, por meio da unidade de quantificação do sistema usado.
- f) Pipetou-se, novamente por meio da unidade de quantificação, 1 ml de solução de substrato de Enzymun-A<sup>(R)</sup>.
- g) Incubou-se a mistura durante 30 min.
- h) Mediu-se a extinção da solução de substrato a 405 nm usando o dispositivo de medida fotométrica do sistema.

Na experiência convencional de comparação (Experiência A) as fases b e c foram combinadas. Neste caso, adicionou-se o conjugado da fase b numa concentração de 18 U/ml no tampão de incubação descrito na fase c. Adicionou-se 1 ml desta solução combinada por meio da unidade de quantificação do referido sistema.



A calibração foi efectuada com padrões convencionais desde 0 até 51,1  $\mu$ U de TSH/ml.

Quadro 3:

Precisão/recuperação do soro do branco	Experiência B	Experiência A
x ( $\mu$ U/ml)	1,8	1,99
CV (%)	3,1	2,9
x ( $\mu$ U/ml)	5,74	6,26
CV (%)	4,8	3,2

O Quadro 3 apresenta os resultados de dois volumes nominais diferentes (1,9  $\mu$ U/ml e 6,0  $\mu$ U/ml com 12 medições em cada caso, por um lado com o procedimento modificado de acordo com a presente invenção e por outro lado de acordo com a experiência de comparação. Foram obtidos resultados comparáveis no que refere-se à precisão e à recuperação do valor nominal.

A Figura A apresenta as curvas de calibração para as Experiências A e B, isto é, a extinção E em função da concentração das soluções padrão. O facto de que as duas curvas concordam com grande precisão é mais uma evidência de que as propriedades das soluções que contém as proteínas, nomeadamente do conjugado anticorpo-enzima no presente caso, não sofre virtualmente alterações por aplicação usando o processo de acordo com a presente invenção.

Este resultado prova especialmente que o processo de acordo com a presente invenção é adequado para a quantificação de quantidades muito pequenas de reagente líquido, uma vez que a TSH a analisar estava presente numa concentração extremamente reduzida.



REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

Processo para a aplicação quantificada de um líquido analítico bioquímico a um alvo em que o líquido é ejectado em pequenas quantidades sobre o alvo através de um bico de uma câmara de formação de jacto caracterizado por se evaporar um volume parcial de líquido na câmara de formação de jacto e expandir durante um curto período a fim de ejectar cada quantidade do líquido através de um bico.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por o líquido analítico ser um reagente líquido.


- 3ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 ou 2 caracterizado por o líquido analítico conter uma proteína, especialmente uma proteína com capacidade de ligação, uma enzima, um anticorpo, um conjugado anticorpoenzima, um antigénio, um hepteno ou um substrato.

- 4ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações anteriores caracterizado por o alvo ser um recipiente de reacção no qual se introduz o líquido analítico.

- 19 -



- 5ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 2 ou 3 caracterizado por o alvo ser uma região de reagente de um elemento de análise, se ejectarem sucessivamente várias quantidades do reagente líquido e o bico e o elemento de análise se moverem um em relação ao outro de tal modo que as gotas produzidas pelas quantidades do reagente líquido na região do reagente formam um padrão pré-determinado de compartimentos na região do reagente.

- 6ª -

Processo de acordo com a reivindicação 5 caracterizado por o elemento de análise, após aplicação do reagente líquido, ser conduzido de modo contínuo para uma estação de fornecimento de amostras, se fazer contactar uma amostra com a região de reagente e se medir uma alteração fisicamente mensurável como consequência da reacção entre a amostra e o reagente.

- 7ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 5 ou 6 caracterizado por se ejectarem vários reagentes líquidos diferentes de uma câmara de formação de jactos separada através de bicos separados.

- 8ª -

Processo de acordo com a reivindicação 7 caracterizado por não haver praticamente contacto entre os compartimentos produzidos por quantidades de diferentes reagentes líquidos no padrão pré-determinado.

- 20 -



- 9ª -

Processo de acordo com a reivindicação 8 caracterizado por as quantidades dos diferentes reagentes líquidos formarem um padrão de gotas alternadas no qual as quantidades dos diferentes reagentes líquidos se encontram adjacentes mas separadas por intervalos.

- 10ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 5 a 9 caracterizado por uma gota produzida por uma quantidade de um reagente líquido na região de reagente ter uma superfície de menos de  $2 \text{ mm}^2$ .

- 11ª -

Dispositivo para aplicação quantificada de um líquido analítico bioquímico a um alvo em que o líquido bioquímico se encontra contido numa câmara de formação de jacto de um elemento descartável de formação de jacto (25) munido de um bico (5) pré-embalado pelo fabricante caracterizado por a câmara de formação de jacto (4) ter um elemento de aquecimento (11) em contacto térmico com o líquido por meio do qual se pode evaporar um volume parcial do líquido analítico (6) e expandir durante um curto período a fim de ejectar uma quantidade do líquido analítico (6) através do bico (5) e existir um elemento de fixação (27) e contactos eléctricos (25a) no exterior do elemento do bico (25) para ligação intercambiável mecânica e eléctrica do elemento do bico a um analisador.

- 21 -

A requerente reivindica a prioridade  
do pedido de patente alemã apresentado em 2 de Agosto de  
1990, sob o Nº. P 40 24 545.4.

Lisboa, 31 de Julho de 1991  
O AGENTE GENCIAL DA PROCURADORIA INDUSTRIAL

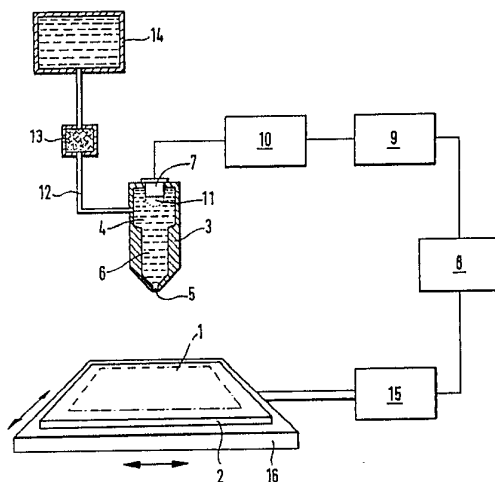
A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and horizontal strokes, positioned below the typed text.



## RESUMO

"PROCESSO E DISPOSITIVO PARA A APLICAÇÃO QUANTIFICADA DE UM LÍQUIDO ANALÍTICO BIOQUÍMICO A UM ALVO"

A invenção refere-se a um processo para a aplicação quantificada de um líquido analítico bioquímico a um alvo em que o líquido é ejectado em pequenas quantidades sobre o alvo através de um bico de uma câmara de formação de jacto em que se evapora um volume parcial do líquido na câmara de formação de jacto e expande durante um curto período a fim de ejectar cada quantidade do líquido através de um bico.



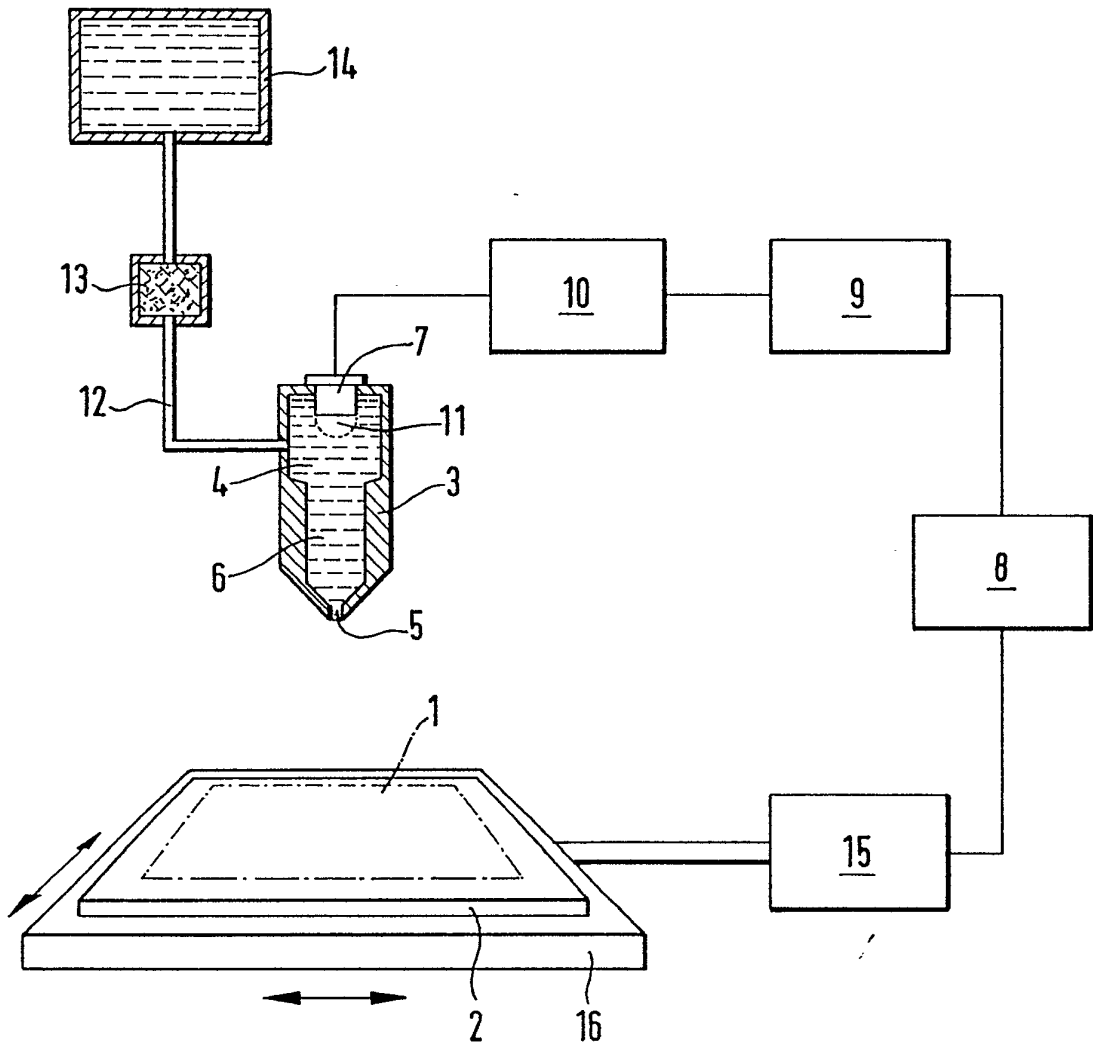


Fig. 1

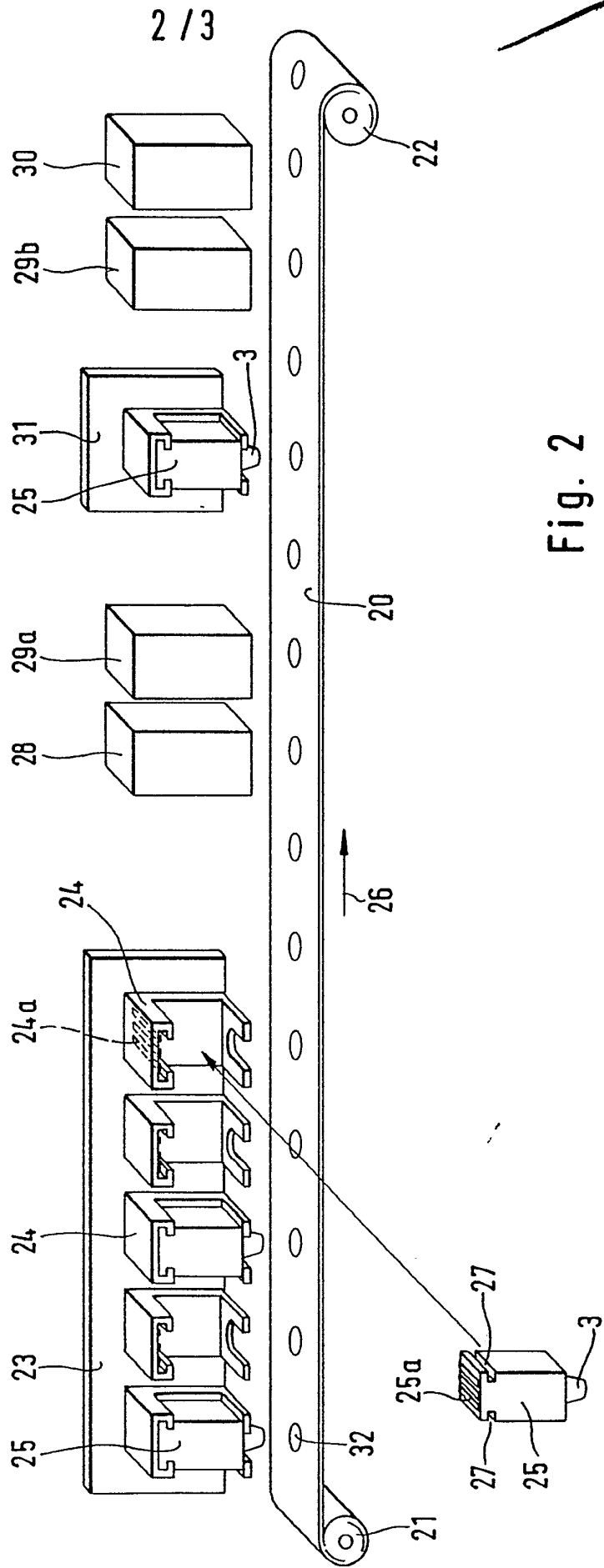


Fig. 2

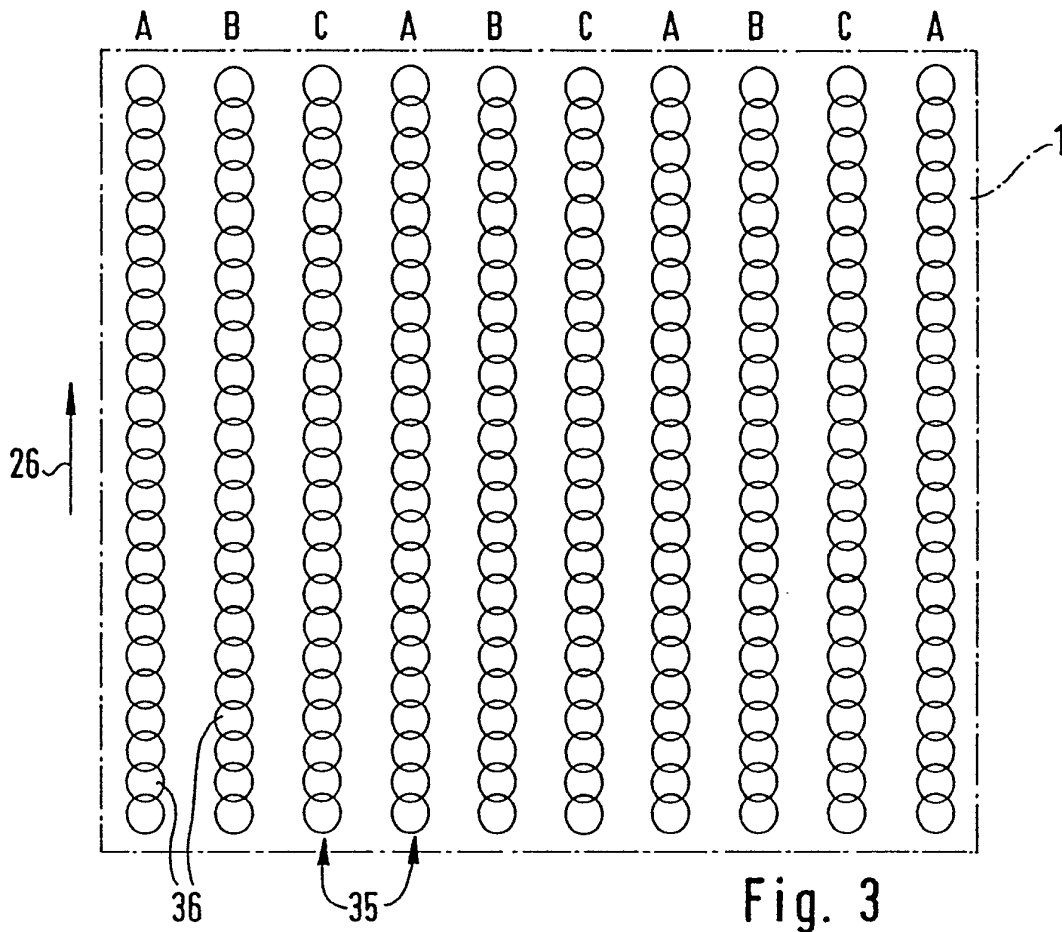


Fig. 3

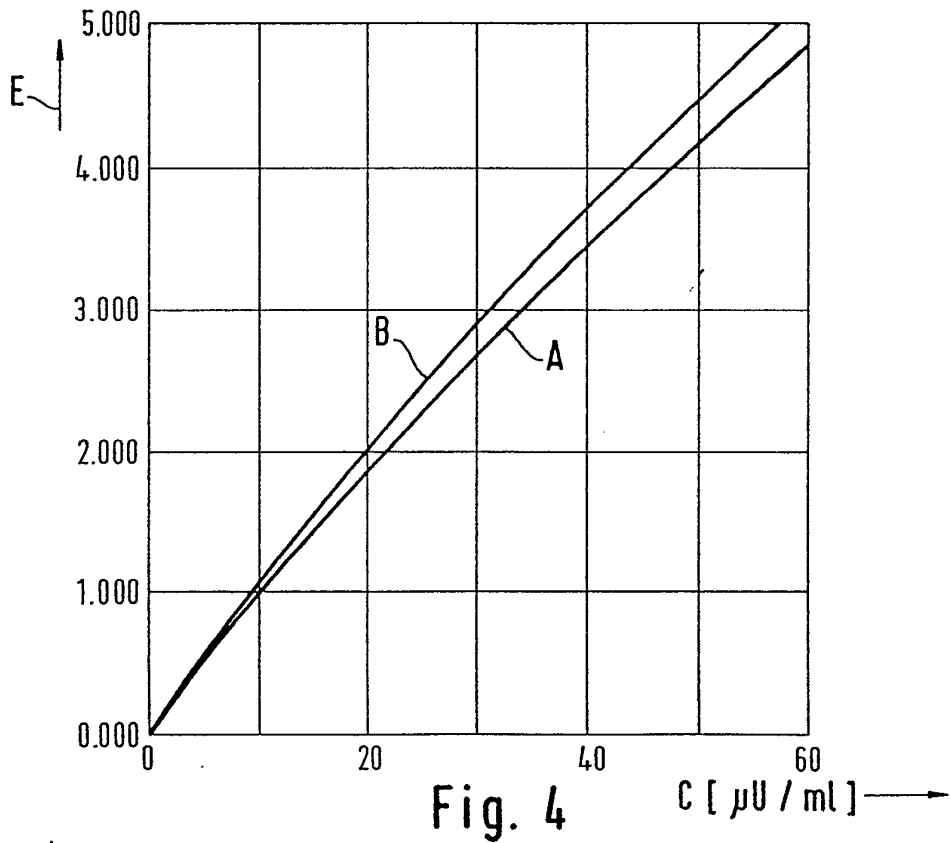


Fig. 4