



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112014028850-0 B1



(22) Data do Depósito: 21/05/2013

(45) Data de Concessão: 09/11/2021

(54) Título: MÉTODO DE MONITORAMENTO DE NÍVEL DE UM ANALITO EM UM SUJEITO

(51) Int.Cl.: A61B 5/145.

(30) Prioridade Unionista: 21/05/2012 GB 1208950.4.

(73) Titular(es): DERMAL DIAGNOSTICS LIMITED.

(72) Inventor(es): DEWAN FAZLUL HOQUE CHOWDHURY.

(86) Pedido PCT: PCT GB2013051322 de 21/05/2013

(87) Publicação PCT: WO 2013/175196 de 28/11/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 19/11/2014

(57) Resumo: MEDIÇÃO CUMULATIVA DE UM ANALITO. A presente invenção refere-se a um método de monitoramento do nível de um analito tal como glicose em um sujeito que compreende etapas repetidas de extração de uma quantidade do analito do sujeito para uma amostra, por exemplo, usando iontoforese reversa, então medindo a concentração do analito com um método que esgota o analito. Embora métodos conhecidos objetivem esgotar o analito completamente entre as etapas de extração para acumular com cada ciclo e alterações sucessivas de medição na concentração. A presença de concentrações mais altas permite a realização de medições mais confiáveis. A amostra pode ser preparada com uma quantidade inicial do analito.

"MÉTODO DE MONITORAMENTO DE NÍVEL DE UM ANALITO EM UM SUJEITO"

CAMPO DA TÉCNICA

[001] A presente invenção refere-se a métodos e dispositivos para monitorar o nível de um analito em um sujeito, por exemplo, para medir alterações no nível de glicose no sangue ou fluido intersticial de um paciente durante um período de tempo. É particularmente útil quando as concentrações de analito que podem ser extraídas do sujeito são baixas, que é tipicamente o caso quando é usada iontoforese reversa como método de extração.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] Os dispositivos de monitoramento de glicose contínuo usam a técnica de iontoforese reversa para extrair o analito de glicose do fluido intersticial de um paciente com a finalidade de medir as alterações nos níveis de glicose. Tais dispositivos tomam a forma de um emplastro preso em contato íntimo com a pele de um paciente e compreendem uma câmara de percepção que contém sensores eletroquímicos que são dispostos para formar parte de um circuito elétrico. A câmara é preenchida com um meio fluido ou um gel o analito pode difundir ou ser transportado da pele para os sensores. Qualquer meio ou uma superfície dos sensores é impregnado com uma enzima que reage com o analito para converter o mesmo em uma forma diferente (ácido glucônico no caso de um analito de glicose) e para produzir elétrons no processo. Os elétrons podem fluir ao redor do circuito para criar uma corrente, cuja magnitude corresponde à concentração do analito no meio que circunda o sensor. Contudo, a magnitude da corrente é tipicamente de apenas de dezenas ou centenas de nano ampères de modo que é um desafio medir a mesma com precisão e distinguir o sinal da corrente do ruído elétrico de fundo. Além disso,

os sensores podem não operar em uma maneira linear e confiável em baixas concentrações do analito na amostra.

[003] Os dispositivos conhecidos são operados para realizar um período inicial de iontoforese reversa para extração de analito, seguida por um período de percepção que é frequentemente de 2 a 3 vezes mais longo do que o período de extração, de modo a assegurar que todo o analito tenha sido extraído da matéria durante o período precedente tenha tempo para reagir com os sensores. Um dispositivo de monitoramento de glicose que foi disponibilizado comercialmente sob a marca *Glucowatch* operado com um período de iontoforese de 3 minutos seguido por um período de percepção de 4 a 5 minutos. O ciclo é repetido em intervalos, cada vez é requerida uma nova leitura do nível de glicose do sujeito, e em cada ocasião o período de percepção é longo o suficiente para esgotar substancialmente toda a glicose extraída na amostra.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[004] A invenção fornece um método de monitorar o nível de um analito em um sujeito, que compreende as etapas de:

- (a) medir a concentração do analito em uma amostra;
- (b) introduzir na amostra uma quantidade do analito que é representativo do nível de analito no sujeito;
- (c) medir novamente a concentração do analito na amostra;
- (d) determinar o nível do analito no sujeito com base na diferença entre a medição de concentração na etapa (c) e a medição de concentração anterior; e
- (e) repetir as etapas (b) a (d) em intervalos para gerar uma sequência de determinações ao longo do tempo.

[005] Esta invenção difere do estado da técnica em que o método não depende da medição do valor absoluto da concentração de analito na amostra, mas da diferença entre a concentração após intervalos de extração sucessivos do sujeito. Essa concentração de analito na amostra pode ser permitida a construir ao longo de intervalos sucessivos e a magnitude do sinal dos sensores também aumenta, permitindo medição mais precisa e exata.

[006] No caso onde o processo usado para medir a concentração de analito na amostra esgota o analito na amostra, a medição na etapa (c) pode ser controlada de maneira que cada medição esgote apenas uma pequena parte do analito, para assegurar que a concentração de analito na amostra aumente ao longo de sucessivos intervalos. Se necessário, a determinação do nível de analito na etapa (d) pode empregar um algoritmo que permita o esgotamento do analito devido ao processo de medição. A etapa de determinação pode também permitir o esgotamento do analito durante os intervalos entre as medições sucessivas. Alternativamente, se houver um período restante entre cada etapa de medição (c) e a etapa de introdução que sucede (b), então o método pode compreender uma etapa adicional de tomada de uma medição provisória da concentração do analito na amostra após o resto do período, imediatamente antes de cada etapa de introdução (b), a medição provisória a ser usada como a medição de concentração anterior na etapa de determinação (d).

[007] Uma variante preferida do método de acordo com a invenção inclui uma etapa inicial de introduzir na amostra uma quantidade de analito antes da primeira etapa de medição (a), preferivelmente de uma fonte que não seja o sujeito. A quantidade inicial do analito assegura que mesmo na primeira etapa de medição, a concentração de analito seja suficiente para a realização

de uma medição precisa.

[008] A iontoporese reversa é uma técnica preferida para a etapa (b) de introduzir na amostra uma quantidade do analito que é representativo do nível de analito no sujeito. Contudo, podem ser usadas outras técnicas, por exemplo, simplesmente adicionado uma gota de sangue ou outro fluido na amostra (com devida permissão sendo feita ao medir a concentração de analito para qualquer mudança resultante no volume da amostra).

[009] O analito é preferivelmente glicose, mas outras moléculas, íons ou partículas são alvos possíveis, por exemplo, lactato, uréia, potássio, fenilalanina, prostaglandina E2 e drogas que incluem, mas não estão limitadas a, fenitoína, cafeína, teofilina e lítio.

[010] Se o nível determinado de analito se desviar de uma variação predeterminada de valores aceitáveis, pode ser gerado um sinal de alerta.

DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[011] A Figura 1 é uma seção transversal esquemática através de um emplastro para iontoporese reversa na qual a presente invenção pode ser realizada.

[012] A Figura é um gráfico de medições de corrente contra o tempo a partir de um sensor de glicose colocado em contato com (a) glicose extraída cumulativamente de pele de porco e (b) uma solução tampão.

[013] A Figura 3 é um gráfico das diferenças entre as medições de corrente sucessivas do gráfico (a) da Figura 2.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[014] A Figura 1 (não em escala) ilustra esquematicamente parte de um emplastro para iontoporese reversa 2, que é aplicado à superfície da pele de um sujeito. O emplastro 2 pode ser preso contra a pele 4 por qualquer meio,

por exemplo, por uma camada adesiva (não ilustrada) que forma parte do emplastro 2 ou sendo preso por uma faixa elástica ou algum outro dispositivo de restrição mecânica adequado. O emplastro inclui uma câmara de anodo 6 e uma câmara de catodo 7, cada contendo um líquido condutivo ou outro meio 8 que esteja em contato com a superfície da pele 4, seja diretamente ou através de uma membrana permeável (não ilustrada). No caso onde o meio condutivo é armazenado como um líquido antes do uso, as câmaras 6, 7 podem ser providas de orifícios de entrada.10, através dos quais o líquido 8 pode ser distribuído a partir de uma fonte fora do emplastro 2. Uma vez que o líquido tenha entrado na câmara, o mesmo pode permanecer como um meio condutivo líquido ou pode reagir para formar um meio do tipo gel viscoso, onde necessário pela reação com um agente adequado, em forma seca ou semissólida, tal como um agente de aumento de viscosidade ou agente tipo ligação cruzada que é pré-armazenado dentro da câmara de anodo e/ou de catodo; esse método aumenta a estabilidade dos sensores impedindo o contato de líquido ou superfície de sensor em armazenamento. No caso de sensores baseados em enzima, a enzima é suscetível a ser degradada quando em contato com líquidos por períodos prolongados.

[015] As câmaras respectivas 6, 7 contêm um par de eletrodos de trabalho, a saber, um anodo 14 e um catodo 15, cada um dos quais é imerso no líquido 8. Durante a operação do dispositivo para realizar a iontopforese reversa, os eletrodos de trabalho 14, 15 são controlados por circuitos microeletrônicos 16 dentro do emplastro 2 para induzir um fluxo de íons 18 da pele 4 do sujeito para o catodo 15 e um fluxo de equilíbrio de íons na pele 4 a partir do anodo 14. O fluxo de íons 18 fora da pele 4 transporta analitos a partir do fluido intersticial do sujeito para o líquido 8 na câmara de catodo 7, onde se

dispersa e torna-se disponível para ser detectado pelos sensores 22, 24. O sensor 22 pode ser um eletrodo sensor que é provido de um revestimento que reage eletroquimicamente com um analito alvo no líquido 8, por exemplo, glicose, para gerar uma corrente mensurável a partir do eletrodo 22 que indica a taxa de reação e, portanto, a concentração do analito alvo no líquido 8. Um eletrodo sensor similar 24 pode ser usado para medir a concentração de um analito diferente em uma maneira similar. Cada dos eletrodos sensores 22, 24 pode requerer um eletrodo contrário correspondente (não ilustrado) em contato com o líquido 8 para completar um circuito elétrico. O eletrodo contrário pode ser um eletrodo dedicado ou pode ser um dos eletrodos de trabalho 14, 15 conforme conhecido na técnica. O sensor para detectar e medir a espécie de teste e analito pode ser substituído por alternativas adequadas amplamente estabilizadas como estado corrente na técnica, incluindo sensores fluorescentes, sensores do tipo eletrodo seletivo de íon, sensores baseados em DNA/RNA e sensores baseados em anticorpos.

[016] O propósito do emplastro 2 é fornecer uma medida da concentração do analito alvo no fluido intersticial do sujeito. O emplastro e é operado para realizar iontoporese reversa por um determinado período de tempo. Durante a iontoporese reversa, a taxa de retirada de analito da pele 4 é ditada principalmente pela intensidade da corrente que esteja fluindo através da pele e pela concentração dos analitos dentro da pele. Para um determinado projeto do emplastro a intensidade da corrente é substancialmente constante, de maneira que, no término do período de operação, a quantidade de analito que foi acumulada na câmara deve ser um reflexo verdadeiro da concentração de analito no fluido intersticial do sujeito.

[017] Será agora descrito um método preferido de operação de

dispositivo de acordo com a presente invenção para monitorar níveis de glicose no sangue de um sujeito. Um dos eletrodos sensores 22 possui uma enzima glicose-oxidase imobilizada em sua superfície, que é capaz de oxidar glicose presente dentro da câmara de amostra 7, levando à produção de elétrons na presença de um mediador adequado. Os elétrons são coletados pelo eletrodo sensor 22 para gerar uma corrente pequena, que pode ser detectada pelos circuitos 16 para medir a concentração de moléculas de glicose na câmara 7.

[018] Em um estágio inicial, a amostra de fluido na câmara 7 é preparada com uma quantidade de glicose suficiente para a concentração na amostra a ser medida com confiabilidade. Em concentrações baixas, a corrente gerada pode ser difícil de distinguir do ruído elétrico de fundo no circuito. Ainda, apesar de poder ser produzido um sensor com sensibilidade muito alta, isto é, alta resolução para baixo de nano ampères ou concentrações de glicose submicromolar, o limite de quantificação (o ponto a partir do qual o sensor se comporta em uma maneira linear) é muito mais alto, a saber, em torno de 5 a 10 micro mols. A quantidade inicial de glicose usada para preparar a câmara deve ser escolhida para criar pelo menos uma concentração limite na câmara que seja suficiente para superar esses problemas. A quantidade inicial de glicose pode ser fornecida proveniente do sujeito pela operação do processo de iontoporese reversa por um período suficientemente longo, mas é preferível que seja introduzida na câmara a partir de uma fonte independente, opcionalmente, no momento de fabricação. Considerando também que a glicose age como combustível para micróbios, pode ser preferível arrastar a glicose dentro da câmara de sensor em uma forma que não afete a estabilidade do sensor, tal como um filme seco, pó, particulado, ou forma semissólida, em vez de incorporar no eletrólito. Isso dissolveria e dispersaria

dentro do eletrólito líquido que é transportado para a câmara de sensor imediatamente antes do uso do emplastro e dispositivo. É então feita uma medição inicial da concentração de glicose na câmara 7.

[019] Em seguida, os eletrodos de trabalho 14, 15 do dispositivo são operados para realizar iontoforese reversa por um período de tempo necessário para extraír uma quantidade mensurável de glicose do sujeito e distribuí-la para a câmara de amostra 7. Isso pode ser um período mais curto do que na técnica porque a quantidade de glicose extraída não precisa alcançar o nível limite para medição confiável, que foi alcançada pela preparação inicial da amostra. A quantidade extraída precisa ser apenas suficiente para permitir uma diferença na concentração na amostra a ser detectada, conforme descrito abaixo. O período de extração pode variar de 1 a 15 minutos.

[020] Imediatamente após o período de extração, o eletrodo sensor 22 é operado para tomar a medição de um “ponto” da concentração de glicose na câmara de amostra 7.

[021] A operação do eletrodo envolve oxidação de glicose para ácido glucônico, desse modo esgotando a concentração de glicose mensurável na câmara. Enquanto no estado da técnica o objetivo era medir e, portanto, esgotar toda a glicose na câmara, de acordo com a presente invenção é desejável minimizar tal esgotamento, de modo que a concentração de glicose deva ser construída durante sucessivos intervalos de operação. Portanto, a etapa de medição deve ser realizada por período de tempo o mais curto possível, suficiente para determinar um valor de concentração preciso, por exemplo, 1 ou 2 minutos. Em um exemplo, são feitas 10 leituras durante 120 segundos, e a corrente de pico é avaliada sobre uma região estável para

fornecer a leitura de corrente para aquele ponto de tempo específico.

[022] Tipicamente, segue então um retardo antes de um ciclo adicional de extração e então a medição é realizada, dependendo da frequência das medições que é requerida para o sujeito em questão.

[023] O método de operação do dispositivo de acordo com a invenção não esgota toda a concentração de glicose na câmara de amostra, portanto, o nível de glicose acumula-se ao longo do tempo e é registrado um perfil de glicose cumulativo conforme ilustrado na Figura 2. O gráfico rotulado Dev001 mostra sinais medidos a partir da extração cumulativa de glicose durante um período de 5 horas usando pele de porco banhada em uma solução de glicose de 10mM. A pele foi submetida a iontoporese reversa em uma densidade de corrente de $0,3\text{mA cm}^{-2}$ por 5 minutos, o sensor foi então ligado por dois minutos e foram tomadas leituras periodicamente durante esse tempo. Os leitores de sensor de uma região plana estável foram mediados para derivar o valor registrado. Isso foi seguido por um período de repouso de 8 minutos antes da repetição do ciclo, durante um período total de 5 horas nesse caso. O gráfico marcado Dev004 representa uma amostra de controle de pele de porco banhadas em tampão sozinha, que foi submetida a iontoporese da mesma maneira.

[024] O declínio inicial observado na corrente que aparece nos gráficos na Figura 2 está relacionado ao umedecimento do sensor; a conicidade observada no gráfico de glicose é devido ao esgotamento do eletrodo de trabalho usado para iontoporese reversa nesse conjunto de experimentos.

[025] A leitura de glicose no ponto de medição é derivada da diferença entre duas leituras de ponto sucessivas, conforme ilustrado na Figura 3. O gráfico mostra a diferença entre cada leitura de glicose na Figura 2 e a leitura

anterior, representada graficamente contra o tempo durante 4 horas. Foi concluído que a acumulação da concentração de glicose não afeta a habilidade dos sensores para discernir entre as leituras, de maneira que com níveis de glicose diferentes, há uma diferença discernível entre as sucessivas medições de concentração. Os sensores retêm resolução abaixo dos níveis de nanocampo (ou mesmo picoampere) apesar de serem correntes de medição de centenas de nanocampos.

[026] Com referência à Figura 3, é observada uma fase de retardo inicial enquanto a pele está se equilibrando, de outro modo chamada de fase de aquecimento. Após isso, os resultados mostram claramente estabilização dos níveis de glicose retirados durante sucessivos intervalos, e a concentração em pontos sucessivos é substancialmente constante para uma determinada corrente aplicada à pele durante o processo de iontoporese reversa. O experimento foi realizado com toda a espessura da pele de porco (2 a 3 mm), em um ambiente de laboratório sem qualquer fluxo de sangue capilar, desse modo a glicose estava sendo retirada através de toda a espessura da pele a partir do reservatório com o qual o lado inferior da pele foi colocado em contato. Em um sujeito humano vivo o fluido intersticial estaria presente dentro dos primeiros 0,5-1mm da pele de modo que a fase de aquecimento seria esperada ser substancialmente mais curta.

[027] Em um emplastro feito de acordo com a invenção, a frequência ou duração das etapas de iontoporese pode ser aumentada durante a fase de aquecimento também para encurtar essa fase. O algoritmo de detecção pode ser programado para reconhecer o término da fase de aquecimento na estabilização substancial dos níveis de analito detectados. Similarmente, no início da operação do emplastro a etapa de medição de concentração de

analito na amostra pode ser repetida várias vezes em sucessões rápidas (por exemplo, 15 vezes) para assegurar umedecimento adequado do sensor para fornecer leituras estáveis.

[028] Um algoritmo é usado para determinar o nível de glicose no sangue do sujeito a partir da diferença entre as medições de concentração sucessivas na amostra em cada intervalo. O algoritmo precisa ser calibrado não apenas para a extensão do processo de iontopforese reversa, mas para a eficácia pré-estabelecida do processo na extração de glicose dos sujeitos humanos em geral ou, preferivelmente, do sujeito particular em questão. Por exemplo, o algoritmo pode ser calibrado comparando a diferença entre duas medições sucessivas de concentração de glicose na amostra contra uma medição independente da concentração de glicose da amostra de sangue em uma picada no dedo do sujeito (ou contra uma concentração média de duas amostras de tal picada no dedo tomadas ao mesmo tempo que as medições pelo emplastro).

[029] A transpiração pelo sujeito pode ocasionar um rápido aumento na taxa de extração que não é característica do nível de açúcar no sangue real, portanto, o algoritmo pode ser habilitado para detectar e eliminar tais dados errôneos. Isso envolveria a remoção de leituras de software onde a elevação no nível de açúcar foi mais rápida do que uma taxa limite 'B', onde B é a taxa máxima de elevação do nível de açúcar no sangue tomado através de uma população saudável e/ou diabética média após a ingestão de uma quantidade definida de açúcar em uma bebida líquida (para imitar a ingestão de alimento).

[030] O algoritmo pode também incluir alguma compensação para uma pequena quantidade de glicose que irá esgotar durante a operação do sensor, apesar de preferivelmente de acordo com a invenção essa quantidade ser

muito pequena. Em algumas circunstâncias, o esgotamento do analito pode também continuar entre as etapas de medição enquanto as enzimas presentes na amostra continuam a reagir com o mesmo. Se os períodos entre as leituras forem longos, então isso tornar-se-á mais significante. Uma solução é o algoritmo incluir um fator de “correção” adicional que permita a dedução de um valor da diferença nas leituras, com base em uma constante que seria determinada (durante os estudos experimentais / clínicos) que corresponde a algum esgotamento adicional do analito presente na região de percepção entre as leituras. Isso depende muito do intervalo de tempo entre duas leituras, e onde o intervalo de tempo é apenas alguns minutos não é observado nenhum esgotamento de analito significante que iria precisar do uso de fator de correção / constante, enquanto se o intervalo de tempo for maior do que 5 minutos então a extensão para qual o analito esgota é proporcionalmente mais alta. Outra maneira de contagem para longos períodos de retardo entre as leituras, é tomar uma leitura de ‘base’ em um determinado ponto no tempo no término do retardo, seguida por iontoforese, e então para basear a determinação do nível de analito na diferença entre as duas leituras tomadas imediatamente antes e após a etapa de iontoforese.

[031] Embora o método preferido de extração de analito tenha sido descrito como iontoforese reversa, em uma modalidade adicional da invenção o processo de extração pode ser realizado usando micro agulhas para extraer ou amostras de sangue ou fluido intersticial, com ou sem aumentos na extração pela integração com a iontoforese reversa. As micro agulhas podem ser ocas, porosas ou sólidas. Em tal caso, a quantidade de analito extraída seria substancialmente mais alta do que extraída usando iontoforese reversa apenas, e, portanto, a invenção aqui descrita teria benefícios práticos

significativos, principalmente em que para esgotar inteiramente quantidades tão grandes de analito entre cada leitura pode requerer uma quantidade proibitiva de material sensor tal como enzima, tornando o sensor impraticável. No caso de outros tipos de sensores pode ser alcançada uma resolução mais alta tomando a diferença na medição entre cada fase de extração.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de monitoramento de nível de um analito em um sujeito, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender as etapas de:
 - (a) executar um processo de medição para medir a concentração do analito em uma amostra;
 - (b) introduzir na mesma amostra uma quantidade do analito que é representativa do nível de analito no sujeito;
 - (c) executar um processo de medição novamente para medir novamente a concentração do analito na amostra;
 - (d) determinar o nível do analito no sujeito com base na diferença entre a medição de concentração na etapa (c) e a medição de concentração imediatamente anterior; e
 - (e) repetir as etapas (b) a (d) em intervalos na mesma amostra para gerar uma sequência de determinações ao longo do tempo.
2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o processo de medição usado para medir a concentração de analito na amostra esgota parcialmente o analito na amostra.
3. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o processo de medição na etapa (c) é controlado de maneira que cada medição esgota apenas uma pequena proporção do analito, por meio do que a concentração de analito na amostra aumenta durante intervalos sucessivos.
4. Método, de acordo com a reivindicação 2 ou 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a determinação do nível de analito na etapa (d) emprega um algoritmo que permite o esgotamento de analito na amostra devido ao processo de medição.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a determinação do nível de analito na etapa (d) emprega um algoritmo que permite o esgotamento de analito na amostra durante os intervalos entre sucessivas medições.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a etapa (e) compreende adicionalmente, antes de cada repetição das etapas (b) a (d):

esperar por um período de repouso;
executar o processo de medição para medir a concentração do analito na amostra.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionalmente uma etapa inicial de introdução na amostra de uma quantidade de analito antes da primeira etapa de medição (a).

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a quantidade do analito introduzida na amostra na etapa inicial é de uma fonte sem ser o sujeito.

9. Método, de acordo com a reivindicação 7 ou 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a etapa inicial também compreende realizar um conjunto de medições repetidas da concentração do analito na amostra para alcançar operação estável de um sensor usado para realizar as medições.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a etapa de medir (c) compreende tomar uma série de medições e calcular uma média das medições selecionadas na série.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações

anteriores, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a etapa de determinar (d) compreende rejeitar quaisquer medições que deem origem a uma alteração no nível de analito determinado que exceda um valor limite.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a etapa de determinar (d) compreende rejeitar quaisquer medições antes do nível de analito determinado ter estabilizado.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a etapa (b) de introduzir na amostra de uma quantidade do analito que é representativa do nível de analito no sujeito compreende realizar iontoforese reversa para extrair a quantidade de analito de um fluido intersticial do sujeito.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a etapa (b) de introduzir na amostra de uma quantidade do analito que é representativa do nível de analito no sujeito compreende usar micro agulhas para extrair do sujeito um fluido corporal que contenha a quantidade do analito.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o analito é glicose.

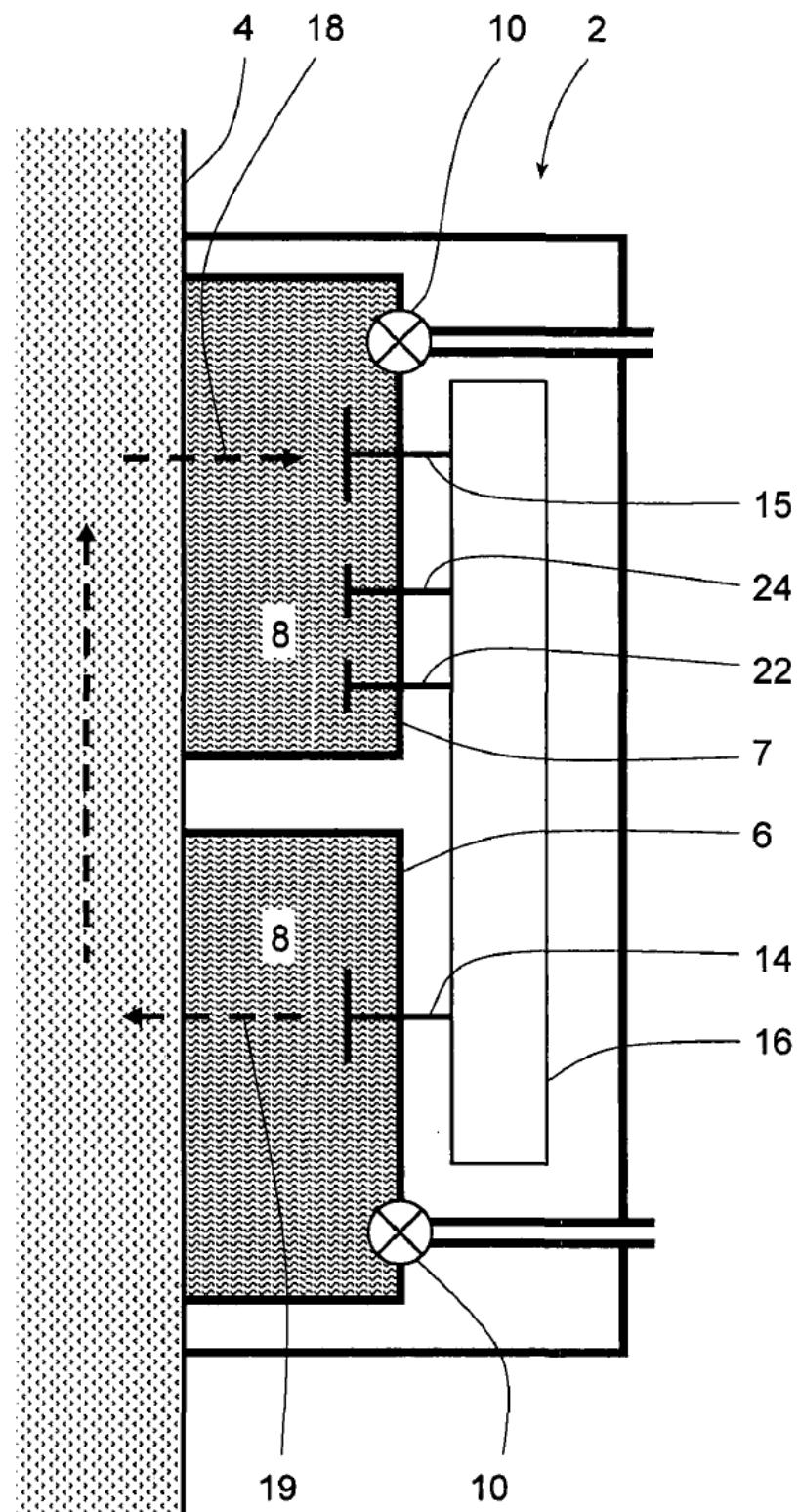
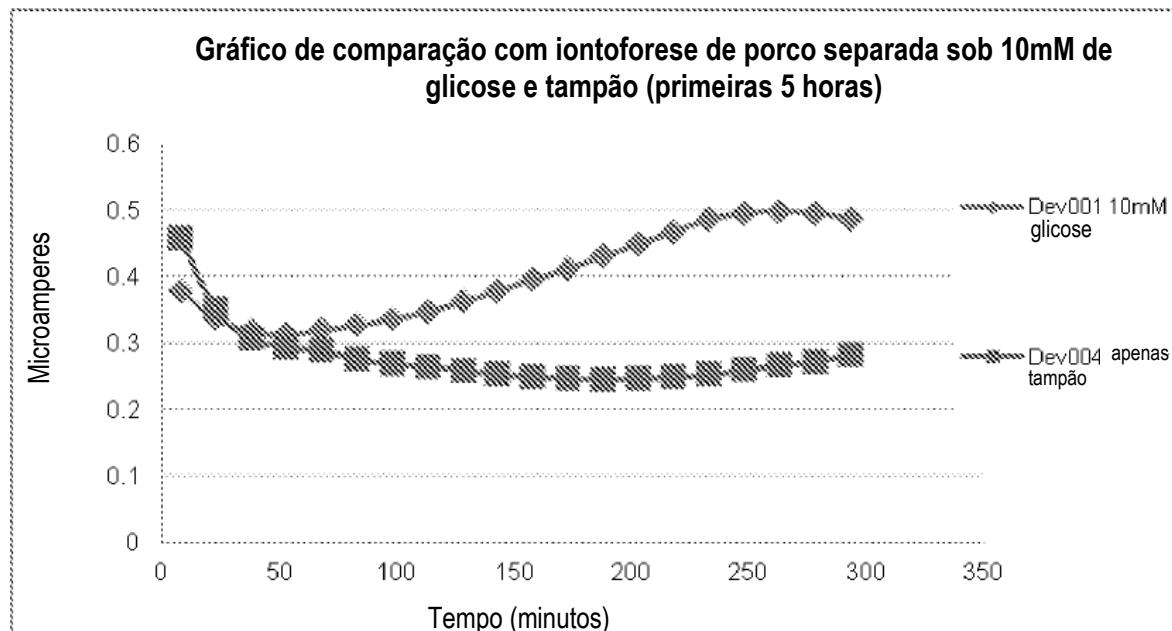
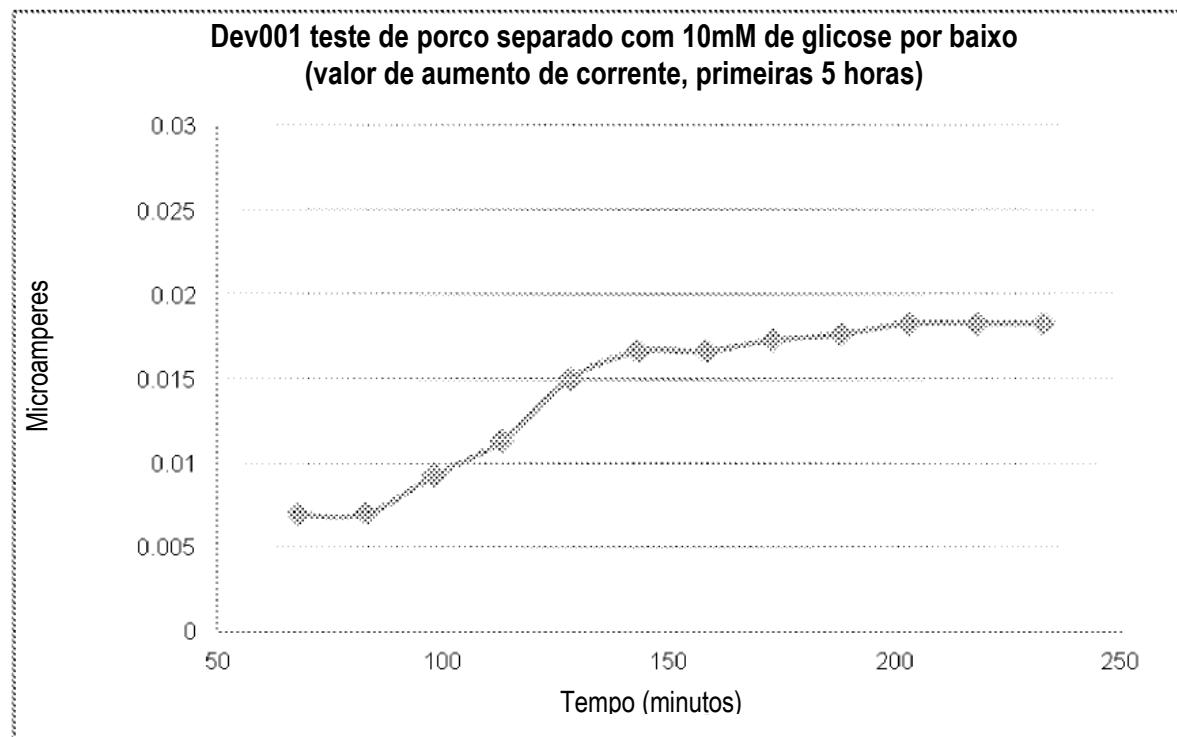


Fig. 1

**Fig. 2****Fig. 3**