



(11) *Número de Publicação:* **PT 799896 E**

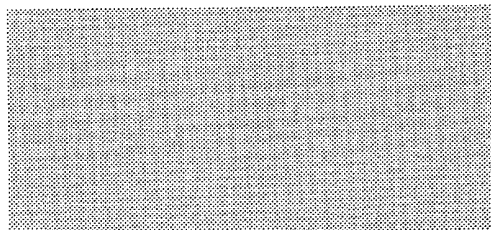
(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C12Q001/54 A G01N033/52 B

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de depósito: 1997.04.03	(73) Titular(es): LIFESCAN, INC. 1000 GIBRALTAR DRIVE MILPITAS CALIFORNIA 95035 US
(30) Prioridade: 1996.04.04 US 627530	
(43) Data de publicação do pedido: 1997.10.08	(72) Inventor(es): YEUNG S. YU US JOHN L. SMITH US
(45) Data e BPI da concessão: 2001.09.12	(74) Mandatário(s): JOSÉ LUÍS FAZENDA ARNAUT DUARTE RUA DO PATROCÍNIO, 94 1350 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* REAGENTE EM TIRA TESTE PARA A DETERMINAÇÃO DE GLUCOSE NO SANGUE

(57) *Resumo:*



PTE 799896

f. l. A

DESCRIÇÃO

"REAGENTE EM TIRA TESTE PARA A DETERMINAÇÃO DE GLUCOSE NO SANGUE"

ESTADO DA TÉCNICA

a) Área da Invenção

A presente invenção refer-se a uma tira teste seca para a medição da concentração de um analito num fluido biológico; mais particularmente uma tira teste que mede colorimetricamente a concentração da glucose no sangue inteiro.

b) Descrição do Estado da Técnica

Muitos aparelhos de teste visual foram desenvolvidos para medir a concentração de certos analitos nos fluidos biológicos. Estes aparelhos têm, por exemplo, medido glucose, colesterol, proteínas, cetonas, fenilalanina, ou enzimas no sangue, urina, ou saliva.

Tiras reagentes de fase seca incorporando formulações baseadas em enzimas são extensivamente utilizadas em hospitais, laboratórios clínicos, consultórios médicos, e em casa para avaliar a concentração de glucose em amostras de fluidos biológicos. De facto, as tiras reagentes tornaram-se numa necessidade diária para vários milhões de diabéticos. Dado que a diabetes pode causar anomalias perigosas na química sanguínea, pode contribuir para a perda de visão, falha renal, e outras consequências graves. Para minimizar o risco destas consequências, ensinamentos correntes têm vindo a aconselhar as pessoas com diabetes para medir o seu nível

de glucose no sangue de duas a sete vezes por dia, dependendo da natureza e gravidade dos seus casos individuais. Com base no padrão observado nos níveis da glucose medida, o doente e o médico em conjunto fazem ajustamentos à dieta, exercício e toma de insulina para melhor controlar a doença. É claro que esta informação deve ser disponibilizada ao doente imediatamente, através da utilização de um sistema de tira e medidor simples de usar que seja rápido, barato e rigoroso.

Conhecem-se tiras reagentes que contêm um indicador que muda de cor ou tonalidade dependendo da concentração de glucose num fluido biológico que foi aplicado na tira. Embora algumas destas tiras utilizem químicas de redução, elas envolvem mais usualmente um corante oxidável ou par de corantes. Algumas das tiras incluem uma enzima, tal como a glucose oxidase, que é capaz de oxidar a glucose a ácido glucónico e peróxido de hidrogénio. Também contém um corante oxidável e uma substância possuidora de actividade peroxidativa, a qual é capaz de catalizar selectivamente a oxidação do corante oxidável em presença de peróxido de hidrogénio.

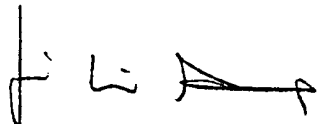
A Patente E.U.nº 4 935 346, concedida em 19 de Junho de 1990 a R. Phillips et al., descreve um medidor, tira e método para determinar a concentração de glucose numa amostra de sangue inteiro (ver também a Pat. E. U. 5 304 468). O método envolve simplesmente a aplicação de uma amostra de sangue inteiro a uma primeira superfície ("amostra") de uma matriz porosa inerte que está impregnada com um reagente. A amostra migra em direcção à superfície "teste" oposta, à medida que a glucose interacciona com o reagente para produzir um produto de reacção que absorve luz. Uma leitura da reflectância da superfície teste indica

a concentração de glucose. As medidas da reflectância são efectuadas a dois comprimentos de onda diferentes de modo a eliminar interferências. Um circuito de tempo é limitado por uma diminuição inicial na reflectância causada pelo humedecimento da superfície teste pela passagem da amostra pela matriz.

A Patente E.U. nº 5 306 623, concedida em 26 de Abril de 1994 a Kiser et al., descreve um teste visual de tira para a glucose no sangue que envolve a aplicação de uma amostra de sangue inteiro contendo glucose num dos lados da tira e ver a leitura do resultado no lado oposto, após os glóbulos vermelhos serem separados e a amostra ter reagido com um reagente na tira. Uma membrana anisotrópica de polisulfona revelou ser especialmente útil como matriz de camada única para a tira.

A Patente E.U. nº 5 453 360, concedida em 26 de Setembro de 1995 a Y.S. Yu, descreve um par corante útil em tiras de reagente seco para a detecção de analitos, tais como glucose, em fluidos analíticos. O par corante compreende 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona e 8-anilino-1-naftalenosulfonato e é usado como um indicador numa reacção em cascata produzindo um forte agente oxidante, tal como peróxido de hidrogénio. Uma vantagem do par é a de que é solúvel em solução aquosa, mas torna-se insolúvel por acoplação oxidativa, minimizando assim a descoloração e permitindo um ponto final de viragem estável.

Um medidor que se tornou largamente utilizado para o autocontrolo da glucose no sangue é o medidor One Touch® II, que utiliza uma tira que é descrita nas Pats. E.U. nºs 4 935 346 e 5 304 468, descritas acima. O medidor e a tira permitem ao utilizador medir rapidamente a concentração da



glucose numa amostra de sangue inteiro fácil e rigorosamente. A amostra é aplicada numa superfície da tira e a medição faz-se na superfície oposta. Uma porção da amostra de sangue inteiro penetra desde a superfície da amostra até à superfície teste, e a cor do sangue pode ser observada na superfície teste.

Sumário da Invenção

A presente invenção descreve uma tira teste reagente para utilização num aparelho para a determinação de uma concentração de glucose numa amostra de sangue inteiro, de acordo com o descrito nas reivindicações anexas.

Na presente especificação e reivindicações anexas, referência ao facto de "amostra que é visível a partir da superfície teste não absorve luz em nenhuma extensão apreciável a cerca de 700 nm", significa que 700 nm de absorvância pela amostra, conforme visto através da superfície teste, é menor que cerca de 20% dos 700 nm de absorvância causada pela reacção da amostra com o reagente.

A presente invenção descreve uma tira teste reagente que é adequada para utilização no medidor de glucose no sangue inteiro One Touch®. Dado que a estrutura da tira retarda selectivamente a passagem dos glóbulos vermelhos através da matriz e minimiza a sua lise, a determinação da glucose é menos dependente do hematócrito da amostra de sangue inteiro.

Breve Descrição do Desenho

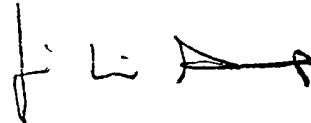
A Fig. 1 é uma vista em perspectiva de uma forma de realização de uma tira teste de acordo com a presente invenção.

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção descreve um método rápido e simples, que utiliza um aparelho fiável e fácil de usar, para a determinação da glucose no sangue inteiro. O método envolve a aplicação a uma das superfícies (a superfície "amostra") de uma matriz porosa inerte, uma pequena amostra de sangue inteiro, suficiente para saturar a matriz. A matriz é tipicamente apresentada num aparelho medidor da reflectância quando se aplica o sangue. Pelo menos uma porção da amostra líquida penetra a matriz, resultando numa alteração inicial da reflectância na superfície ("teste") oposta. A glucose na amostra reage com um ou mais reagentes ligados à matriz para formar um produto que muda a reflectância da matriz. Uma leitura é então efectuada a um ou mais tempos após a alteração inicial da reflectância para relacionar a alteração da reflectância na superfície teste ou na matriz, com a concentração de glucose na amostra.

A FIG.1 mostra uma forma de realização de acordo com a presente invenção. Uma placa fina de matriz reagente hidrofílica 11 é posicionada numa ponta de um suporte plástico 12 através de um adesivo 13, o qual liga directa e firmemente a placa reagente ao suporte. O suporte, que é opcional, proporciona forma física e rigidez à tira. Um orifício 14 está presente no suporte plástico 12 na zona à qual a placa reagente 11 está ligada, de modo a que a amostra possa ser aplicada através do orifício 14 ao lado amostra da placa reagente e a luz reflectida do outro lado teste.

Uma amostra de sangue inteiro para ser analisada é aplicada à placa 11. Em geral, a área de superfície da placa reagente é cerca de 10 mm² a 100 mm², especialmente 10 mm² a



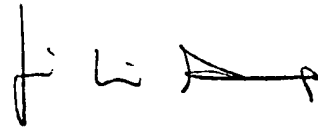
50 mm², o que normalmente permite um volume em que 5-10μl de amostra sobresatura.

Detalhes adicionais referentes à estrutura da tira aparecem nas patentes E.U. acima referenciadas N^{os} 4 935 346 ('346) e 5 304 468 ('468).

O método de análise da presente invenção depende de uma variação na absorvância, medida por reflectância difusa, a qual está dependente da concentração da glucose presente numa amostra a ser testada. Esta variação pode ser determinada medindo a variação da reflectância durante um ou mais intervalos de tempo.

Quando em utilização, as fitas teste são primeiro montadas num aparelho de leitura da absorvância da luz; ou seja, intensidade da cor por reflectância, antes da aplicação da amostra. Em seguida, uma amostra de sangue contendo glucose - obtida por exemplo com uma lanceta - é aplicada na matriz da tira teste. Preferencialmente, a quantidade é superior à necessária para saturar a matriz na zona onde a reflectância vai ser medida (ou seja, cerca de 5-10μl). Após a aplicação da amostra, o tempo da medição inicia-se automaticamente quando o fluido penetra na matriz, e o aparelho detecta a variação resultante na reflectância da superfície teste. A variação da reflectância durante um tempo pré-determinado, como resultado da formação do produto da reacção, é em seguida relacionada com a concentração de glucose na amostra. Reflectância refere-se nesta especificação e nas reivindicações anexas, tanto à gama de comprimento de onda visível, como à radiação de infravermelho e ultravioleta.

Um aparelho adequado, tal como um fotómetro de reflectância difusa com software adequado, pode ser feito



para ler automaticamente a reflectância num ou mais intervalos de tempo, calcular a variação de reflectância, e, utilizando factores de calibração, dar o resultado da concentração de glucose na amostra de sangue. Detalhes de tal aparelho, incluindo a metodologia utilizada pelo aparelho para converter unidades de reflectância em concentrações de glucose no sangue, são descritos em '346 e '468. Em particular, medidores OneTouch® disponíveis comercialmente são adequados para utilizar em combinação com a tira reagente de acordo com a presente invenção, para medir concentrações de glucose em amostras de sangue inteiro. Estes medidores leem a reflectância da superfície teste da tira a cerca de 635 nm e cerca de 700 nm.

A matriz de acordo com a presente invenção é preferencialmente uma membrana que separa eficazmente os glóbulos vermelhos e a hemoglobina de uma amostra de sangue inteiro, para ficar o plasma contendo a glucose. A separação tem lugar à medida que a amostra se move através da membrana desde a superfície amostra para a superfície teste. Para garantir essa separação, uma membrana pode ter poros que retenham os glóbulos vermelhos, geralmente poros de tamanho na gama desde cerca de 0,1 μm até cerca de 5 μm . Preferencialmente, a membrana é anisotrópica, com uma gama de tamanhos de poro; mais preferencialmente, uma gama larga de tamanhos de poro. Quando a matriz compreende uma membrana anisotrópica, o lado da amostra é preferencialmente o lado de poro grande. Por exemplo, um gradiente de tamanhos de poro desde cerca de 0,1 μm até cerca de 150 μm pode estender-se por toda a membrana. No lado do poro grande, o tamanho do poro está preferencialmente na gama desde cerca de 30 μm até cerca de 40 μm . No lado da membrana onde o poros são menores (ou seja, a superfície teste), o volume morto é relativamente pequeno, e o material da membrana é

f L A

geralmente bastante denso, numa camada que pode tipicamente constituir até 20% da espessura da membrana. Nesta camada, o tamanho do poro está preferencialmente na gama desde cerca de 0,1 até cerca de 0,8 μm , com um tamanho de poro nominal preferencialmente de cerca de 0,3 μm .

Quando a amostra de sangue inteiro é aplicada no lado da amostra, a amostra encontra poros de tamanho cada vez menor à medida que penetra na membrana. Eventualmente, sólidos tais como glóbulos vermelhos atingem uma posição na membrana, geralmente próximo da superfície amostra, onde não podem penetrar mais. A membrana, não só retém os glóbulos vermelhos próximo da superfície amostra, como também minimiza a lise das células, de modo a que qualquer porção da amostra que seja visível da superfície teste não absorva luz numa extensão apreciável a 700 nm. O equilíbrio da amostra, ainda contendo a glucose dissolvida, penetra até ao lado teste. À medida que passa através da membrana, a glucose na amostra reage com o reagente, dando origem à formação de um corante absorvente de luz próximo do lado teste, afectando assim substancialmente a reflectância da superfície teste. A natureza anisotrópica da membrana e/ou a utilização de um componente de separação (discutido em seguida) permite taxas de fluxo relativamente rápidas através da membrana, mesmo enquanto decorre a separação dos sólidos.

A matriz é uma membrana porosa hidrofílica, à qual reagentes podem ser ligados por ligações covalentes ou não-covalentes. A matriz permite o fluxo de um meio aquoso através dela. Também permite a ligação de formulações proteicas à matriz sem afectar apreciavelmente de forma adversa a actividade biológica da proteína, por exemplo, a actividade enzimática de uma enzima. Dependendo da extensão

com que as proteínas vão ser ligadas covalentemente, a matriz terá pontos activos para a ligação covalente ou pode ser activada por meios conhecidos do estado da técnica. A formulação da matriz é reflectiva, e tem espessura suficiente para permitir a formação de um corante absorvente de luz no volume morto ou sobre a superfície para afectar substancialmente a reflectância da matriz. A matriz pode ser de uma formulação uniforme ou um revestimento num substrato fornecendo a estrutura necessária e propriedades físicas, tais como hidrofiliçidade.

Polissulfonas e poliamidas (nylons) são exemplos de materiais adequados a matriz. Outros polímeros de propriedades comparáveis podem também ser utilizados. Os polímeros podem ser modificados para introduzir outros grupos funcionais que disponibilizam estruturas carregadas, de modo a que as superfícies da matriz possam ser neutras, positivas ou negativas.

Um método preferido para a preparação do material poroso que constitui a matriz é formar o polímero sem um núcleo de suporte. Tal matriz é, por exemplo, a membrana anisotrópica de polisulfona disponível pela Memtec, Inc., Timonium, MD. Os termos "matriz" e "membrana" são utilizados indiferentemente daqui em diante. Cada termo é compreendido de forma não limitada a uma camada simples e pode incluir, por exemplo, uma camada absorvente. Uma matriz com menos do que cerca de 500 μm de espessura é normalmente utilizada, sendo preferível com cerca de 115 a 155 μm . Uma espessura de cerca de 130 a 140 μm é a mais preferível, particularmente quando a matriz é de nylon ou polisulfona anisotrópica. A matriz geralmente não deforma com o molhar, mantendo assim a sua conformação e tamanho original e tem suficiente

f. L. A.

resistência à humidade para permitir a manufactura de rotina.

A membrana tem impregnada nos seus poros um reagente teste que é capaz de reagir com a glucose para dar origem a um produto absorvente da luz. A membrana pode ser tratada com reagente por imersão numa mistura dos componentes, saturando desta forma a membrana. O excesso de reagente pode ser removido por processos mecânicos tais como, por exemplo, faca pneumática, bisturi ou vareta de vidro. A membrana é então seca. O reagente tende a concentrar-se próximo do lado da membrana com poros pequenos (teste). Outros métodos que são adequados para aplicação do reagente à membrana surgirão rapidamente a qualquer conhecedor da área.

O reagente teste compreende um componente para converter a glucose em peróxido de hidrogénio e um componente para detectar peróxido de hidrogénio. O reagente pode opcionalmente compreender ainda um componente de separação que faz com que sólidos, como os glóbulos vermelhos, fiquem retidos na matriz, removendo eficazmente os sólidos do sangue inteiro. Componentes adicionais podem também ser incluídos conforme se descreve em seguida.

Componentes preferidos para converter a glucose em peróxido de hidrogénio incluem a glucose oxidase, uma enzima que é usualmente obtida a partir do *Aspergillus niger* ou do *Penicillium*. A glucose oxidase reage com a glucose e oxigénio para produzir gluconolactona e peróxido de hidrogénio. A concentração óptima da glucose oxidase depende da composição do sistema indicador; no entanto, a glucose oxidase na gama de desde cerca de 500-10000 U/ml é geralmente adequada, mais preferencialmente desde cerca de 700-2000 U/ml. Em geral, concentrações mais elevadas de

glucose oxidase fazem com que a reacção se proceda mais rapidamente, e concentrações mais baixas, menos rapidamente. A concentração óptima pode ser determinada por experimentação de rotina.

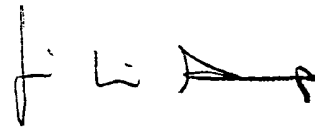
O peróxido de hidrogénio assim produzido reage com o componente para detectar o peróxido de hidrogénio, o qual compreende uma peroxidase que cataliza selectivamente uma reacção entre o peróxido de hidrogénio e um indicador. A peroxidase utiliza o peróxido de hidrogénio como um oxidante que é capaz de remover átomos de hidrogénio de vários substratos. Uma peroxidase adequada pode conter ferriprotoporfirina, uma hemina vermelha obtida de plantas. As peroxidases obtidas de animais, por exemplo de glândulas da tiróide de animais, são também adequadas. A peroxidase do rábano, (HRPO) é especialmente preferida como um constituinte do componente para detectar peróxido de hidrogénio. O peróxido de hidrogénio, preferencialmente catalizado por uma peroxidase, reage quer directa quer indirectamente para formar um corante indicador que reduz 635 nm de reflectância na superfície teste. A reflectância da superfície teste é medida a dois comprimentos de onda - cerca de 635 nm e cerca de 700 nm.

Determinações de reflectância são feitas numa sequência temporizada. A sequência é iniciada pela redução de reflectância a 635 nm que resulta da chegada de uma porção da amostra à superfície teste. Designa-se esta iniciação de tempo por "reflectância de switching". A reflectância a 700 nm é medida 15 segundos mais tarde. Nessa altura, o sangue terá saturado a placa reagente, e a interacção da amostra de sangue contendo glucose com a membrana contendo reagente terá causado uma redução na reflectância a 700 nm que é substancialmente equivalente à redução produzida pela cor do

sangue visível na superfície teste. Assim, embora qualquer amostra que seja visível da superfície teste não absorva luz em qualquer extensão apreciável a 700 nm, o medidor detecta a redução a 700 nm reflexão que ele associa com absorvância pela cor do sangue, e que faz com que ele então faça medições de reflectância a cerca de 635 nm. A concentração de glucose na amostra é calculada a partir da reflectância a 635 nm, usando a reflectância a 700 nm para calcular um factor de correcção. Notar que uma vez que o sangue absorbe a 635 nm, então também deve absorver o simulador de sangue absorvente a 700 nm. Idealmente, o material simulador de sangue deve ter a mesma razão de absorvância a 700 nm para absorvância a 635 nm como o sangue inteiro, mas para abreviar refere-se à absorvância do material simulador de sangue apenas a 700 nm. Detalhes dos cálculos, incluindo a correcção para a reflectância a 700 nm do "sangue", encontra-se na patente acima mencionada '346.

A reflectância reduzida a 700 nm da superfície teste que simula a cor do sangue pode ser efectuada de quatro modos alternativos. Primeiro, a membrana pode conter um componente que absorve a 700 nm de radiação e a superfície teste pode ser substancialmente opaca até que se torne mais transparente a 700 nm de luz quando húmida. O componente que absorve a 700 nm pode ser não-tecido, por exemplo, que não seja visível da superfície teste seca. O componente pode também ser um suporte no qual a membrana é formada, um revestimento na superfície amostra da membrana, ou semelhante.

Segundo, a membrana pode incluir um corante solúvel em água que tem absorvância à luz a 700 nm que é substancialmente aumentada quando o corante entra em solução. Por exemplo, o corante pode inicialmente estar na



forma de cristais solúveis finamente divididos, aplicados à membrana como sólidos dispersos que parecem brancos e não possui absorvância substancial a 700 nm. A amostra aquosa dissolve o corante, que nesse ponto se torna colorido e absorve a 700 nm. Um exemplo de tal corante é ftalocianina de cobre.

Terceiro, a interação entre a glucose e o reagente na membrana pode resultar num cromóforo que absorve luz tanto a 635 nm como a 700 nm, indicando assim a concentração da glucose e, ao mesmo tempo, simulando a presença de sangue.

Finalmente, a interação sangue-reagente pode dar origem a dois cromóforos, um dos quais absorve a 635 nm e o outro absorve a 700 nm. Além disso, dado que apenas suficiente redução de reflectância a 700 nm é necessária para simular a presença da cor do sangue, preferencialmente apenas uma pequena quantidade do cromóforo que absorve a 700 nm está presente. Nos primeiros dois casos, nos quais absorvância a 700 nm (ou seja, reflectância reduzida) resulta de outro componente da membrana, a absorvância a 700 nm não requer um cromóforo.

No terceiro e quarto casos, a redução na reflectância a 700 nm é efectuada por um cromóforo. O terceiro caso requer que a interação glucose-reagente gera um cromóforo cuja absorvância a 700 nm simula o sangue inteiro e cuja absorvância a 635 nm mede adicionalmente a concentração da glucose no sangue. Especificamente, a magnitude da redução na reflectância a 635 nm, ajustada como descrito em '346, num tempo adequado após iniciação da sequência temporal, é uma medida da concentração da glucose na amostra de sangue inteiro. Pares corantes que são adequados como indicadores incluem 4-aminoantipireno (AAP) e ácido cromotrópico; AAP e

f l A

8-anilino-1-naftalenosulfonato (ANS); AAP e N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-m-toluidina (TOOS); hidrocloreto de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) e ANS; e MBTH combinado com a sua azina de formaldeído.

O último caso envolve cromóforos separados, um para indicar a concentração de glucose por desenvolvimento de absorvância a 635 nm que é uma medida da concentração de glucose na amostra de sangue e o outro para simular sangue (por ter a absorvância do sangue inteiro a 700 nm). Um precursor de corante adequado para indicar a concentração de glucose é MBTH combinado com ácido 3-dimetilbenzóico (DMAB).

O corante simulador de sangue pode ser formado de vários modos. Primeiro, pode ser formado por uma reacção de oxiredução, semelhante à que gera a absorvância a 635 nm e que indica a concentração de glucose. Exemplos de tais corantes são MBTH combinado com difosfato de primaquina (PDP), AAP combinado com PDP, e suas combinações. Segundo, o corante simulador de sangue pode ser formado por uma variação de pH. O pH elevado do sangue significa que o pH do reagente aumenta desde cerca de 4,2 a cerca de 7, ou mais, quando o sangue penetra a matriz. Corantes que desenvolvem cor simuladora de sangue em resposta a essa alteração de pH incluem o vermelho de alizarina S (um corante aniónico de antraquinona) e vermelho de fenol (fenolsulfonaftaleína). Terceiro, o corante pode ser formado por uma reacção com um constituinte do sangue de ocorrência natural (outro que não a glucose). Por exemplo, corantes metalocrómicos podem desenvolver cor por complexação com metais presentes no sangue. A fenolftaleína complexona gera cor simuladora de sangue por complexação com cálcio no sangue. A experimentação de rotina pode dar origem ao corante adequado

ou combinação de corantes para simular a absorvância do sangue inteiro a 700 nm.

Embora a membrana anisotrópica que é a matriz preferida retenha os glóbulos vermelhos e os mantenha afastados do lado teste, o reagente teste pode opcionalmente também conter um componente de separação (ver, por exemplo, a patente E.U. Nºs 5 306 623 acima mencionada, de Kiser et al.). O componente de separação deve ser capaz de produzir um fluido incolor relativamente transparente a partir do fluido que contém os glóbulos vermelhos, por exemplo, sangue inteiro, por retenção dos glóbulos vermelhos na matriz e, preferencialmente, também por retenção de quaisquer pequenas quantidades de hemoglobina livre. Componentes de separação para utilizar na presente invenção incluem polietilenoglicol, anidrido poli(metilvinil éter/maleico), polipropilenoglicol, ácido poliestireno sulfônico, ácido poliacrílico, álcool polivinílico, e ácido polivinilsulfônico, mas não se limitam a eles, a um pH de cerca de 4,0-8,0. Tais componentes de separação estão presentes na matriz em quantidades que variam dependendo da sua carga e peso molecular, dos outros componentes incluídos na matriz, do pH e do tamanho do poro da matriz, e da humidade residual da matriz após secagem. Tais parâmetros são prontamente determinados por alguém perito na matéria. Por exemplo, quando se utiliza o propilenoglicol como componente de separação (por exemplo, PPG-410 da BASF, Wyandotte, MI), este está preferencialmente presente a cerca de 2-30% de peso em volume (m/v), e mais preferencialmente 8-10% m/v. Outros componentes de separação podem também ser utilizados numa concentração de cerca de 2-30% m/v. Os componentes de separação poliméricos podem ser impregnados ou incluídos na matriz ou formados na membrana durante a manufactura.

Alguns sais solúveis em água podem também afectar a separação do sangue. Entre os sais adequados para a separação dos componentes do sangue estão citratos, formatos, e sulfatos, assim como certos ácidos, tais como ácidos aminados, ácido cítrico, ácido fítico, e ácido málico (ver, por exemplo, Patente E.U. 3 552 928, emitida em 5 de Janeiro de 1971, por M.C.Fetter).

Os componentes de separação são preferencialmente incluídos no reagente teste, devido a eles aumentarem a eficácia da membrana garantindo que não há passagem de nenhuma quantidade apreciável de glóbulos vermelhos. Asseguram assim que a amostra que é visível da superfície teste não absorve luz em nenhuma extensão apreciável a 700 nm.

Outros componentes podem ser incluídos na matriz para realçar a coloração e leitura das tiras reagentes e para conservar a uniformidade e integridade da matriz. Por exemplo, o reagente teste pode incluir sais e/ou tampões para auxiliar na separação do corante na matriz. Tais tampões podem conter por exemplo, citrato, presente em solução a desde cerca de 0,01 M a cerca de 1,0 M, e preferencialmente a cerca de 0,1M. Outros tampões podem igualmente ser utilizados.

Compostos que tornam a matriz hidrofílica ou compostos que podem actuar como estabilizantes, tais como proteínas hidrolizadas, podem também ser utilizados. Tais compostos incluem mas não se limitam a, por exemplo, albumina de soro bovina, polipéptidos e proteína de baixo peso molecular disponível como Crotein SPA (CRODA, Inc. New York, N.Y.). Tais componentes são utilizados a concentrações de por

exemplo cerca de 1 mg/ml a cerca de 100 mg/ml. No caso da Crotein, é preferível cerca de 30 mg/ml.

Outros estabilizantes e conservantes podem também ser incluídos no revestimento para a matriz. Por exemplo ácido etilendiaminatetracético (EDTA), ácido dietilenotriamina pentacético (DTPA) e compostos relacionados podem ser utilizados, por exemplo, a concentrações de cerca de 0,01 mg/ml até cerca de 10 mg/ml.

Lisboa, 13 de Setembro de 2001

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

h = A

REIVINDICAÇÕES

1. Tira teste reagente para utilização num aparelho para a determinação da concentração de glucose numa amostra de sangue inteiro, em que o aparelho compreende meios ópticos para a detecção da intensidade da luz a comprimentos de onda de cerca de 635 nm e cerca de 700 nm reflectida desde pelo menos uma porção de uma matriz disposta perto de uma extremidade da tira, matriz essa que compreende
 - a) uma superfície receptora de uma amostra para receber a amostra de sangue inteiro e deixar passar uma porção da amostra em direcção a uma superfície teste oposta,
 - b) uma estrutura que selectivamente retarda a passagem dos glóbulos vermelhos através da matriz e minimiza a lise das células na matriz, pela qual qualquer porção da amostra que seja visível da superfície de teste não absorva luz em qualquer extensão apreciável a cerca de 700 nm, e
 - c) um reagente para indicar a concentração de glucose criando na superfície teste uma variação na reflectância a cerca de 700 nm que é substancialmente equivalente à produzida pela absorvância da hemoglobina no sangue e uma variação na reflectância a cerca de 635 nm que é indicativa da concentração da glucose,

f L A

tanto a 635 nm como a 700 nm, ou compreende um primeiro precursor de corante que forma um cromóforo cuja absorvância a 635 nm é indicativa da concentração de glucose e um segundo precursor de corante que forma um cromóforo cuja absorvância a 700 nm simula a absorvância do sangue inteiro.

2. Tira de acordo com a reivindicação 1, na qual o precursor de corante que forma o cromóforo que absorve luz apreciavelmente tanto a 635 nm como a 700 nm é seleccionado de entre: pares corantes no grupo que consiste de 4-aminoantipireno (AAP) e ácido cromotrópico; AAP e 8-anilino-1-naftalenossulfona (ANS); AAP e N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-m-toluidina (TOOS); cloridrato de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) e ANS; MBTH combinado com a sua azina de formaldeído, e suas combinações.
3. Tira de acordo com a reivindicação 1, na qual o referido primeiro precursor de corante compreende MBTH combinado com ácido 3-dimetilaminobenzóico (DMAB), e o referido segundo precursor de corante é seleccionado de entre: pares corantes no grupo que consiste de MBTH e difosfato de primaquina (PDP), AAP e PDP, e suas combinações; ou no grupo que consiste de vermelho de alizarina S, vermelho de fenol, e suas combinações; ou de corantes metalocrómicos que podem desenvolver cor por complexação com metais que estão presentes no sangue.
4. Tira de acordo com a reivindicação 3, na qual o corante metalocrómico é fenolftaleína complexona.
5. Tira de acordo com qualquer das reivindicações de 1 a 4, na qual a matriz compreende uma membrana que tem

poros que retêm os glóbulos vermelhos da amostra de sangue inteiro.

6. Tira de acordo com qualquer das reivindicações de 1 a 4, na qual a matriz compreende uma membrana anisotrópica.
7. Tira de acordo com a reivindicação 6, na qual a membrana tem poros que são maiores perto da superfície receptora da amostra e menores perto da superfície teste.
8. Tira de acordo com qualquer das reivindicações de 1 a 4, na qual a matriz compreende uma membrana de polisulfona.

Lisboa, 13 de Setembro de 2001

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

h = A

f l A

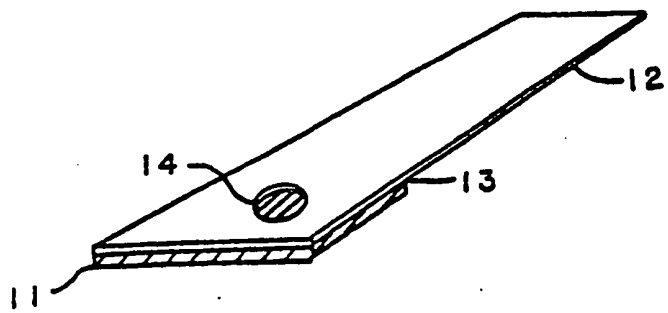


FIG. 1.