

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

(21) **PI0609633-6 A2**



(22) Data de Depósito: 07/04/2006
(43) Data da Publicação: 20/04/2010
(RPI 2050)

(51) *Int.Cl.:*
C12Q 1/00 (2010.01)

(54) Título: **ESPÉCIES OXIDÁVEIS COMO UMA REFERÊNCIA INTERNA EM SOLUÇÕES DE CONTROLE PARA BIOSSENSORES**

(30) Prioridade Unionista: 08/04/2005 US 60/669.729

(73) Titular(es): BAYER HEALTHCARE LLC

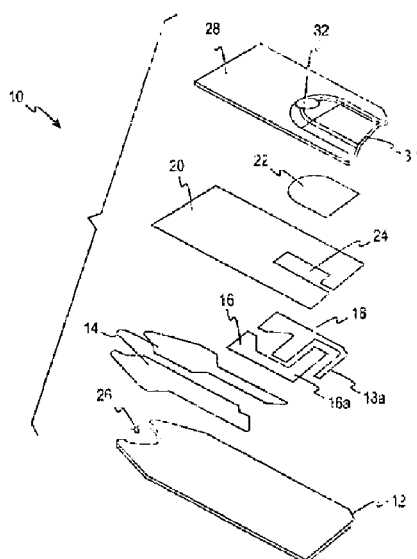
(72) Inventor(es): Greg P. Beer, Huan-Ping Wu

(74) Procurador(es): Nellie Anne Daniel Shores

(86) Pedido Internacional: PCT US2006012940 de 07/04/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/110504 de 19/10/2006

(57) Resumo: ESPÉCIES OXIDÁVEIS COMO UMA REFERÊNCIA INTERNA EM SOLUÇÕES DE CONTROLE PARA BIOSSENSORES. O teste do desempenho de um medidor eletroquímico, usado para medir a presença de um analito em uma amostra biológica, particularmente, glicose em sangue integral, inclui a introdução de uma solução de controle contendo uma proporção predeterminada do analito e uma proporção predeterminada de um composto de referência interna. O composto de referência interna é selecionado de modo que seja oxidado a um potencial superior do que aquele usado para oxidar o analito, possibilitando distinguir a solução de controle de uma amostra biológica.





PI0609633-6

"ESPÉCIES OXIDÁVEIS COMO UMA REFERÊNCIA INTERNA EM
SOLUÇÕES DE CONTROLE PARA BIOSSENSORES"

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção é dirigida, de uma maneira geral, ao
5 campo de dispositivos médicos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Mais especificamente, esta invenção se refere a biossensores, que são usados para medir a proporção de analisados em fluidos corpóreos. Os métodos ópticos são frequentemente usados para fazer essas medidas, mas a presente invenção se refere a aperfeiçoamentos em biossensores eletroquímicos. Ainda que o método descrito aqui possa ser aplicado à medida de outros analisados, incluindo colesterol, uréia, creatinina e creatina, a medida de glicose em sangue
10 integral é de particular interesse. Embora a descrição aqui vá enfatizar a aplicação da invenção na medida de glicose, deve-se entender que a invenção tem aplicações mais amplas.

A invenção se refere a um instrumento eletroquímico no qual um potencial é aplicado a eletrodos em contato
20 com uma amostra biológica e reagentes. A corrente resultante é medida, enquanto o analisado está reagindo com os reagentes, e depois correlacionada com a proporção de um analisado na amostra. Esses instrumentos são referidos como amperométricos, em contraste com os instrumentos colorimétricos, que
25 medem a carga total em coulombs, produzidos da reação da amostra por integração da corrente por todo o tempo de medida. Os instrumentos amperométricos têm uma vantagem pelo fato de que eles são menos dependentes de volume e tempo. Não

esperam que todo o volume do analisado seja reagido, mas apenas fazem medidas no analisado por amostragem da taxa de reação a um tempo predeterminado.

Muitos projetos para esses biossensores foram descritos na técnica, por exemplo, no pedido de patente U.S. 2001/0042683. Os eletrodos são descritos de uma maneira geral como o eletrodo de trabalho e como o contra-eletrodo. Os eletrodos ficam em contato com uma camada sólida contendo reagentes, que oxidam o analisado na amostra, tal como glicose oxidase, e mediadores que reoxidam a enzima reduzida. O próprio mediador reduzido é oxidado no eletrodo de trabalho, que produz uma corrente mensurável. Essa corrente é usada para calcular a proporção de glicose na amostra sendo testada, uma vez que é uma medida indireta da oxidação de glicose na amostra. as reações podem ser descritas pelas seguintes etapas:

$$\text{Glicose} + \text{E}_{\text{oxid}} \rightarrow \text{E}_{\text{red}} + \text{produto (ácido glucônico, gluconolactona)}$$

$$\text{E}_{\text{red}} + \text{Med}_{\text{oxid}} \rightarrow \text{Med}_{\text{red}} + \text{E}_{\text{oxid}}$$

$$\text{Med}_{\text{red}} \rightarrow \text{Med}_{\text{oxid}} + \text{ne}^{-},$$

em que E_{oxid} e E_{red} são as formas oxidada e reduzida do centro de oxirredução da enzima e Med_{oxid} e Med_{red} são as formas oxidada e reduzida do mediador.

Para medir glicose, a enzima pode ser glicose oxidase e o mediador ferricianeto. A medida de outros analisados vai empregar enzimas e mediadores adequados. As combinações típicas de enzima, mediador e analisado são listadas na Tabela 1.

TABELA 1 - Sistemas de substratos, enzimas e mediadores

Analísado	Enzima	Mediador
glicose	glicose oxidase	ferricianeto
glicose	glicose desidrogenase	ferricianeto
colesterol	colesterol oxidase	ferricianeto
lactato	lactato oxidase	ferricianeto
ácido úrico	uricase	ferricianeto
álcool	álcool oxidase	fenilenodiamina

Para garantir medidas precisas, soluções de controle contendo proporções conhecidas de glicose são usadas para verificar que o instrumento está funcionando adequadamente. A composição das soluções de controle foi objeto de várias patentes e publicações. São representativas as patentes U.S. 3.920.580, 4.572.899, 5.028.542 e 5.605.837, os pedidos de patentes internacionais WO 93/21928, 95/13535 e 95/13536. Ainda que as soluções de controle contendo soro de sangue tenham sido usadas, as patentes mais recentes se preocuparam com a substituição das soluções de controle à base de soro com soluções isentas de soro, uma vez que as soluções isentas de soro são mais consistentes e estáveis do que aquelas contendo soro. A solução de controle deve conter uma concentração conhecida de glicose em uma matriz similar a soro, para determinar a precisão de ambos o biossensor enzimático e o medidor do potenciômetro. Vai ser evidente que a composição deve ser estável por períodos mais longos de armazenamento, antes de uso.

As soluções de controle devem servir para a finalidade de checar o funcionamento do sistema de monitoramento de glicose, mas devem ser, ao mesmo tempo, identificadas e separadas das leituras das amostras de sangue reais. Isso é porque as soluções de controle contêm proporções conhecidas de glicose e proporcionam leituras que não têm qualquer fim terapêutico. Se as soluções de controle não podem ser identificadas e as suas respostas separadas daquelas das amostras de sangue pelo medidor de teste, as leituras de glicose das soluções de controle vão ser incluídas na história das medidas de glicose, o que pode levar a uma interpretação errada de uma condição diabética de paciente. Ou, se uma solução de controle for substituída por uma amostra de sangue, pode ser considerada erroneamente por um médico como indicando uma necessidade para mudança de tratamento. Além do mais, uma vez que a resposta de temperatura das soluções de controle é diferente daquela das amostras de sangue, a compensação de temperatura para as medidas feitas em temperaturas diferentes de 25°C vai ser menos precisa, se um medidor de teste não puder distinguir entre as amostras de sangue e as soluções de controle. Portanto, é altamente desejável que o sistema de monitoramento de glicose detecte e identifique, automaticamente, as soluções de controle, para separar as leituras de glicose das soluções de controle daquelas das amostras de sangue, e proporcione uma compensação de temperatura para ambas as amostras de sangue e as soluções de controle.

Pode haver várias patentes descrevendo métodos de identificação das soluções de controle por vários mecanismos. Na patente U.S. 5.723.284, a medida eletroquímica de glicose no sangue é discutida. A patente '284 proposta para
5 modificar as soluções de controle, alterando a razão das leituras de momento, tomadas dos dois períodos de oxidação separados por um período de repouso. O medidor vai reconhecer que uma solução de controle estava sendo medida e tomar a ação adequada, para impedir que os resultados sejam inclu-
10 ídos nos resultados das amostras de sangue. A patente '284 também ensina que a solução de controle deve ser tamponada em uma faixa de pH de 4,8 a 7,5, para que seja efetiva.

Outro método para determinar se uma solução de controle ou uma amostra de sangue está sendo medida para o
15 seu teor de glicose é descrito no pedido de patente U.S. 2002/0139692A1 publicado. Um índice é determinado que se refere à diminuição de corrente elétrica para a natureza da amostra sendo testada.

As patentes U.S. 5.620.579 e 5.653.863, foram pro-
20 postas para começar o teste de uma amostra ao proporcionar um pulso de potencial positivo inicial por um curto período, para reoxidar qualquer mediador reduzido prematuramente. Esse pulso inicial foi referido como um "período de queima".

Quando um potencial é aplicado pelos eletrodo de
25 trabalho e contra-eletrodo e uma amostra líquida é introduzida no sensor, os reagentes secos são reidratados pela amostra líquida e a corrente começa a escoar, aumentando, tipicamente, a um pico e depois diminuindo pelo "período de

queima", usualmente de uma duração de cerca de dez segundos. Durante esse período, o mediador previamente reduzido é reoxidoado para reduzir a tendência para resultados altamente incorretos. Se uma quantidade total de amostra não estiver
5 presente, um erro adicional pode ser introduzido, uma vez que todos os reagentes podem não ficar disponíveis para a reação, ou os eletrodo de trabalho e contra-eletrodo podem não ficar em contato completo com a amostra, reduzindo, desse modo, a corrente durante o período de "queima".

10 Após o período de queima ter sido completado, um período de repouso é proporcionado a um potencial mais baixo ou sem potencial (circuito aberto). Durante esse período de repouso, a reação de oxidação de glicose continua a ocorrer e o mediador é reduzido. Depois, um potencial constante é
15 aplicado de novo entre os eletrodo de trabalho e contra-eletrodo e a corrente é medida por um curto período, tipicamente em torno de dois a dez segundos. A corrente é inicialmente alta, mas diminui rapidamente na medida em que a difusão do mediador começa a controlar. A um momento predeterminado,
20 a corrente medida é usada para determinar o teor de glicose da amostra.

A adição de um composto de referência interna é uma prática comum em química analítica para proporcionar um sinal de referência quantitativo. Esse princípio operacional
25 tem sido usado em um pedido de patente recém-publicado WO 2005/078118, no qual uma referência interna é adicionada ao sistema reagente para obter alguma formulação fim.

No pedido de patente internacional WO2004/040286A1, propõe-se que a solução de controle inclua uma substância redutora selecionada de ácido úrico, bilirrubina, ácido ascórbico, azul de metileno, bis(2-
5 hidroxietil)iminotris(hidroximetil)metano, ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminometano sulfônico, e acetamidofeno, variando, desse modo, a razão das leituras de corrente tomadas de dois períodos de oxidação separados por um período de repouso e possibilitando a identificação da solução de contro-
10 le.

Os presentes inventores buscaram um método de identificação aperfeiçoado para a distinção de soluções de controle de amostras biológicas. Os seus métodos são descritos em detalhes abaixo.

15 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Esta invenção proporciona um método para distinguir uma solução de controle de uma amostra biológica, durante a operação de um medidor eletroquímico por um índice quantitativo. Em uma modalidade, a invenção é uma solução de controle, que inclui proporções conhecidas de glicose, um sistema tampão com um valor de pH adequado, e um composto de referência interna. O composto de referência interna é adicionado à solução de controle para identificar a solução de controle pelo sistema de monitoramento de glicose. A invenção proporciona um método de detecção da presença do composto de referência interna, cálculo do índice quantitativo e identificação de que a solução de controle está sendo testada.

Em uma modalidade, o analisado na amostra biológica é glicose em sangue integral e o mediador é ferricianeto de potássio. O composto de referência interna é oxidável a um potencial mais alto do que o potencial necessário para oxidar o mediador, que é usado para medir a oxidação do analisado. A referência interna tem uma concentração determinada na solução de controle, juntamente com uma concentração predeterminada de glicose. O mediador relacionado com glicose e a referência interna são oxidados seletivamente no eletrodo por diferentes potenciais (baixos e altos). Quando a glicose é o analisado, o composto de referência interna deve ser oxidável a um potencial de pelo menos 100 mV mais alto do que o potencial usado para reoxidar o mediador reduzido.

Os compostos de referência interna, úteis para medir glicose em soluções de controle, incluem quaisquer espécies oxidáveis no eletrodo a um potencial adequado, tais como compostos organometálicos, compostos de coordenação e compostos de aminas orgânicas. A proporção do composto de referência interna usada é relacionada com a proporção de glicose na solução de controle. De preferência, a proporção do composto de referência interna é selecionada de modo que a solução de controle possa ser reconhecida, quando a glicose na solução de controle for o máximo necessário para testar o medidor de glicose eletroquímico. Alternativamente, a proporção do composto de referência interna pode ser variada em relação à proporção de glicose.

As medidas comparativas feita em potenciais baixos e altos proporcionam um método para detectar o composto de referência interna e, desse modo, a solução de controle. Quando o protocolo de medida emprega dois períodos separados por um período de repouso, as voltagens alta e baixa podem ser aplicadas em qualquer um ou em ambos os períodos. Um potencial é aplicado a um sensor, que recebeu a solução de controle. A corrente produzida a um potencial capaz de oxidar o composto de referência interna é comparada com a corrente produzida, quando de um potencial capaz de oxidar apenas o analisado (por exemplo, glicose), mas não o composto de referência interna. A razão entre as duas correntes medidas, designada o Índice Diferencial (DI), proporciona um meio para distinguir a solução de controle de uma amostra líquida desprovida do composto de referência interna.

$$DI = i_{\text{alta volt.}} / i_{\text{baixa volt.}}$$

em que $i_{\text{alta volt.}}$ e $i_{\text{baixa volt.}}$ são as correntes medidas em alta e baixa voltagens. Na voltagem mais alta, ambos o composto de referência interna e o mediador reduzido são oxidados, enquanto que na voltagem mais baixa apenas o mediador é oxidado.

Um valor de DI de cerca de 1 indica que a amostra é desprovida do composto de referência interna e presume-se que seja uma amostra biológica, enquanto que um valor DI significativamente superior a 1, de preferência, pelo menos cerca de 1,5, indica que a amostra é uma solução de controle.

Em outra modalidade, a invenção é um composto de referência interna, adequado para indicar a presença de uma solução de controle, que está sendo usada para testar a precisão de um sistema biossensor eletroquímico / potenciômetro. Quando o analisado é glicose em sangue integral, o composto de referência interna pode ser um composto organometálico oxidável, um composto de coordenação ou uma amina orgânica.

Uma consequência da presente invenção é o aperfeiçoamento da consistência da corrente medida e da precisão da análise resultante. Se potenciais alto e baixo são aplicados durante o mesmo período de oxidação, tais como os períodos de queima e leitura usados na oxidação de glicose, é menos provável que fatores externos, tais como o movimento da amostra ou a temperatura ambiental, afetem o Índice Diferencial. As leituras múltiplas da corrente desenvolvida a voltagens alta e/ou baixa podem aperfeiçoar a precisão dos resultados. Também, quando a presença de uma solução de controle foi determinada, um algoritmo de correção de temperatura particular para a solução de controle pode ser aplicado. Por uso de diferentes algoritmos de temperatura para a solução de controle e a amostra biológica (por exemplo, sangue integral), os resultados clínicos podem ser aperfeiçoados e valores de faixas de controle mais estreitas podem ser atribuídos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é uma vista detalhada de um biossensor de acordo com uma modalidade.

A Figura 2 é uma vista montada do biossensor da Figura 1.

A Figura 3 é uma representação gráfica de potencial versus tempo para um período de queima.

5 A Figura 4 é uma representação gráfica de corrente versus tempo para o potencial aplicado como a Figura 3.

A Figura 5 é um curva corrente - potencial cíclica descrita no Exemplo 1.

10 A Figura 6 é um curva corrente - potencial cíclica descrita no Exemplo 2.

A Figura 7 é um curva corrente - potencial cíclica descrita no Exemplo 3.

A Figura 8 é um curva corrente - potencial cíclica descrita no Exemplo 4.

15 As Figuras 9A - E ilustram as seqüências de potenciais descritas no Exemplo 5.

As Figuras 10a - b são curvas corrente - potencial cíclicas descritas no Exemplo 6.

20 A Figura 11 é uma representação gráfica de corrente versus tempo obtida no Exemplo 7.

A Figura 12 é uma representação gráfica de corrente versus tempo obtida no Exemplo 8.

DESCRIÇÃO DETALHADA DOS DESENHOS

Descrição das modalidades preferidas

25 A invenção vai ser descrita abaixo como aplicada à medida de teor de glicose de sangue integral, um método de interesse comercial. No entanto, o método da invenção tem outras aplicações nas quais outros analisados, tais como co-

lesterol, uréia, creatinina e creatina, são encontrados em fluidos biológicos, tais como urina, saliva e fluido intersticial, e quando soluções de controle são usadas para checar a precisão de medidores eletroquímicos.

5 Biossensores eletroquímicos

A presente invenção não é limitada a um projeto de biossensor particular entre os muitos que foram descritos na técnica. Um exemplo de um biossensor, que pode ser usado, é descrito na patente U.S. 6.531.040, que é ilustrada nas Fi-
10 guras 1 e 2.

O biossensor 10 é mostrado em uma vista detalhada na Figura 1. Compreende uma base isolante 12, na qual se imprime em seqüência (tipicamente por técnicas de impressão em tela), um modelo de condutor elétrico 14, um modelo de ele-
15 trodo (partes 16 e 18), um modelo isolante (dielétrico) 20 e uma camada de reação 22, e completada por uma camada de cobertura 28. O capilar 30, formado entre a camada de cobertura 28 e a camada de reagente 22, proporciona um caminho de escoamento para a amostra de teste fluida. O biossensor é
20 mostrado na Figura 2, na qual todos os elementos na base são mostrados no mesmo plano.

A função da camada de reação 22 é promover uma reação química com glicose, ou outro analisado na amostra de teste fluida, e produzir uma corrente elétrica, que é medida
25 e correlacionada com a proporção do analisado presente. A camada de reação 22 contém tipicamente uma enzima ou enzimas e um acceptor de elétrons. A enzima reage com o analisado para produzir elétrons, que são transportados para a superfí-

cie do eletrodo de trabalho por um acceptor de elétrons. O acceptor de elétrons, também referido como um mediador, que tem sua resposta reduzida à reação entre o analisado e a enzima. A enzima na camada de reação pode ser combinada com um polímero hidrofílico, tal como poli (óxido de etileno). Uma
5 enzima, que pode ser usada para reagir com glicose, é glicose oxidase, e o mediador pode ser um sal de ferricianeto, usado com um tampão mantendo um pH de cerca de 5 - 7. Outra enzima, que pode ser usada, é glicose desidrogenase, juntamente com um co-fator, tal como pirroloquinolina quinona (PQQ), usado com um tampão mantendo um pH de cerca de 6 - 8.
10

As duas partes 16, 18 do modelo do eletrodo proporcionam os respectivos eletrodo de trabalho e contra-eletrodo, necessários para a determinação eletroquímica da
15 concentração do analisado. Um aspecto do projeto mostrado é que os eletrodo de trabalho e contra-eletrodo são configurados de modo que a grande parte do contra-eletrodo seja localizada a jusante (em termos da direção de escoamento de fluido ao longo do caminho de escoamento), a partir da parte
20 exposta do eletrodo de trabalho 16a.

O sub-elemento contra-eletrodo 18a, no entanto, é posicionado a montante do elemento superior eletrodo de trabalho 16a, de modo que, quando uma quantidade da amostra de fluido de teste (por exemplo, uma amostra de sangue integral), inadequada para cobrir completamente o eletrodo de
25 trabalho, entra no espaço capilar, uma conexão elétrica se forma entre o sub-elemento contra-eletrodo 18a e a parte exposta do eletrodo de trabalho 16a, devido à condutividade da

amostra de sangue integral. A área do contra-eletrodo, no entanto, que é disponível para contato pela amostra de sangue integral, é tão pequena que apenas uma corrente muito fraca pode passar entre os eletrodos e, desse modo, pelo detector de corrente. Quando o sinal recebido estiver abaixo de um certo nível predeterminado, o dispositivo sensor informa ao usuário que sangue insuficiente entrou na cavidade do sensor e que outro teste deve ser conduzido, ou que mais sangue deve ser adicionado. Ainda que as dimensões particulares dos eletrodos não sejam críticas, a área do subelemento contra-eletrodo 18a é tipicamente menor do que cerca de 10% do que daquela do eletrodo operacional e, mais especificamente, inferior a cerca de 6%.

Os eletrodo de trabalho e contra-eletrodo são geralmente impressos usando tinta de eletrodo, que é de uma espessura de geralmente cerca de 14 μm (0,00055') e contém, tipicamente, carvão eletroquimicamente ativo. Os componentes da tinta condutora podem ser uma mistura de carvão e prata, que é selecionada para proporcionar um caminho de resistência condutiva baixa entre os eletrodos e o medidor, com o qual estão em conexão operante, por contato com o modelo condutor em uma extremidade de rabo de peixe 26 do sensor. O contra-eletrodo pode ser compreendido de prata / cloreto de prata, embora carvão seja o preferido. Para melhorar a reprodutibilidade da leitura do medidor, o modelo dielétrico isola os eletrodos das amostra de teste de fluido, exceto em uma área definida próxima ao centro do modelo do eletrodo 24. Com referência à Figura 2, uma área definida é importan-

te nesse tipo de determinação eletroquímica, porque a corrente medida depende não apenas da concentração do analisado e da área da camada de reação 22, mas também da área do eletrodo de trabalho 16a, que é exposta à amostra de teste contendo analisado.

Uma camada dielétrica típica 20 compreende um monômero, oligômero ou polímero modificado com acrilato curado por UV, e é de uma espessura de cerca de 10 μm (0,0004'). A camada dielétrica também pode ser curável por umidade ou curável termicamente. Uma tampa ou cobertura 28 é adaptada para conformar-se com a base, para formar um espaço para receber a amostra de teste de fluido, no qual os eletrodo de trabalho e contra-eletrodo estão situados. A tampa 28 proporciona um espaço côncavo 30, e é formada tipicamente por estampagem em relevo de uma folha plana de material deformável. A tampa 28 é perfurada para proporcionar uma ventilação de ar 32 e unida à base 12 em uma operação de vedação. A tampa e a base podem ser unidas por soldagem sônica, na qual a base 12 e a tampa 28 são primeiro alinhadas e depois comprimidas conjuntamente entre um elemento de vedação térmica vibratório ou corneta e um mordente estacionário. O contato é feito apenas com as regiões não estampadas, planas da tampa. A energia ultra-sônica de um cristal ou outro transdutor é dissipada como calor na junta polimérica, propiciando a ligação dos materiais termoplásticos. A tampa e a base estampadas também podem ser unidas por uso de um material adesivo no lado inferior da tampa. O método de união da tampa e

da base é descrito mais detalhadamente na patente U.S. 5.798.031.

Os materiais adequados para a base isolante 12 incluem policarbonato, poli (tereftalato de etileno), polímeros acrílicos e de vinila dimensionalmente estáveis, e misturas poliméricas tal como policarbonato / poli (tereftalato de etileno), e estruturas de folhas metálicas (por exemplo, um laminado de náilon / alumínio / poli (cloreto de vinila). A também é tipicamente fabricada de um material de folha polimérica deformável, tal como policarbonato, ou um grau estampável de poli (tereftalato de etileno), poli (tereftalato de etileno) modificado com glicol, ou uma composição de folha metálica (por exemplo, uma estrutura de folha de alumínio).

Outros projetos de sensores eletroquímicos podem ser usados na presente invenção. Os exemplos de um sensor eletroquímico, que pode ser usado para medir concentrações de glicose, são aqueles usados nos sistemas HealthCare's Ascensia[®] DEX[®] e ELITE[®] da Bayer. Mais detalhes desses sensores eletroquímicos podem ser encontrados nas patentes U.S. 5.120.420 e 5.320.732. Outros sensores eletroquímicos, que podem ser usados em um sistema de monitoramento amperométrico, são descritos na patente U.S. 5.429.735.

Os sensores eletroquímicos podem ser localizados em um instrumento de dispensação de sensor de glicose no sangue, portando uma pluralidade de sensores ou elementos de teste. Um exemplo de um grupo de sensores, colocado em um

instrumento de dispensação de sensor, é descrito na patente U.S. 5.660.791.

Medida de glicose em sangue integral

Em um biossensor típico para medida do teor de glicose de sangue integral, os eletrodo de trabalho e contra-eletrodo são revestidos com uma camada única de reagente por co-impressão ou co-deposição. A camada de reagente vai incluir tipicamente alguns polímeros e os ingredientes reativos, isto é, uma enzima que oxida a glicose na amostra de sangue, e um mediador, isto é, um composto de oxirredução que reoxida a enzima, após ela ter sido reduzida por oxidação de glicose. O mediador reduzido conduz elétrons da reação enzimática de oxidação de glicose para o eletrodo de trabalho e é reoxidado na superfície do eletrodo. O diferencial de voltagem aplicado entre os dois eletrodos resulta no mediador passando elétrons para o eletrodo de trabalho, criando uma corrente mensurável que é proporcional à quantidade de glicose na amostra. O biossensor também pode compreender múltiplas camadas de reagentes, ou pode compreender diferentes camadas de reagentes múltiplas em cada eletrodo, os eletrodo de trabalho e contra-eletrodo.

Como descrito acima, os sensores amperométricos aplicam um potencial fixo pelos eletrodos e a corrente produzida é medida por um período de tempo predeterminado, que pode ser muito curto, isto é, de 5 a 10 segundos, para corrigir a tendência que pode apresentar devido à redução prematura do mediador. Em um sistema preferido, um potencial é aplicado por dois períodos de tempo, separados por um perío-

do de repouso. Uma representação gráfica representativa do potencial versus tempo para o primeiro ou "período de queima" é apresentada na Figura 3. A Figura 4 mostra uma representação gráfica representativa da corrente versus tempo que resulta. A corrente aumenta a um pico, enquanto que a amostra está reidratando a camada de reagente, permitindo que as reações de oxidação e redução ocorram, e depois diminui na medida em que a difusão começa controlar. Após esse breve período, o potencial aplicado é removido ou pelo menos reduzido, durante um período de repouso, enquanto que a oxidação de glicose e a redução do mediador continuam. Depois, o potencial é reaplicado por um segundo período e a corrente medida pelo período de "leitura" (por exemplo, dez segundos). Uma vez que o mediador reduzido está presente em consequência da oxidação concomitante da enzima, a corrente produzida inicialmente é alta, mas depois diminui rapidamente e se aproxima de uma condição controlada por difusão em estado constante. A corrente registrada ao final do curto período de "leitura" é usada para determinar o teor de glicose da amostra de sangue, por uma correlação obtida previamente entre a corrente ao final do período de leitura e a glicose contida nas amostras de teste tendo concentrações conhecidas.

Soluções de controle

Como discutido acima, várias abordagens foram consideradas para garantir que uma solução de controle proporcione leituras precisas e que possa ser distinguida de uma amostra biológica. A presente invenção emprega uma espécie

oxidável (isto é, uma referência interna), que é oxidável apenas em voltagens mais altas do que aquelas usadas para medidas de glicose (ou outro analisado). Isso significa que a um baixo potencial, adequado para oxidar inteiramente o mediador relacionado com a glicose, mas não o composto de referência interna, apenas a glicose vai ser medida. No entanto, quando o potencial é suficientemente alto para oxidar o composto de referência interna adicionado, tanto a glicose quanto o composto de referência interna vão ser oxidados. Embora a glicose seja oxidada no potencial mais alto, a medida feita a uma voltagem mais baixa já é limitada por difusão e não depende da quantidade total de glicose oxidada pela enzima. É viável, no entanto, adicionar essa espécie de referência interna a uma solução de controle e usá-la para identificar a solução como um controle e não como uma amostra biológica.

A diferença entre as correntes medidas nas voltagens alta e baixa pode ser comparada para indicar a presença da característica de referência interna da solução de controle. O Índice Diferencial (DI) seguindo os componentes de corrente relativos à glicose e ao composto de referência interna é:

$$DI = (i_{\text{alta volt.}} / i_{\text{baixa volt.}}) = [(i_{\text{ref. int}} + i_{\text{glicose}}) / i_{\text{glicose}}] = 1 + (i_{\text{ref. int}} / i_{\text{glicose}})$$

em que: $i_{\text{alta volt.}}$ é a corrente medida na voltagem mais alta e $i_{\text{baixa volt.}}$ é a corrente medida na voltagem mais baixa.

Segue-se que se a referência interna não estiver presente (tal como nas amostras de sangue), $i_{ref\ int}$ deve ser zero e a $i_{alta\ volt.}$ vai ser substancialmente igual à $i_{baixa\ volt.}$. Desse modo, o valor de DI vai se aproximar de 1. Quando a

5 referência interna estiver presente, o valor de DI vai ser maior do que 1, dependendo da proporção do composto de referência relativa à proporção de glicose. Se a proporção de referência interna adicionada à solução de controle proporcionar uma corrente similar àquela da oxidação do mediador

10 relacionado com glicose, o valor de DI pode ser cerca de 2. A referência interna pode ser incluída em uma proporção adequada para controlar as soluções correspondentes a uma alta concentração de glicose. É típico usar várias soluções de controle correspondentes às concentrações baixa, normal e

15 alta de glicose, para testar um medidor de glicose. Se, por exemplo, a proporção da referência interna for selecionada de modo que o valor de DI seja igual ou superior a 1,75 para a concentração de glicose mais alta na solução de controle, a corrente da referência interna vai ser relativamente gran-

20 de, comparada com a corrente para a glicose na solução de controle de menor teor de glicose. Então, a mesma proporção da referência interna usada com uma solução de controle tendo uma baixa concentração de glicose vai proporcionar um valor de DI ainda maior. Esses valores de DI ainda maiores vão

25 proporcionar uma confiança mais alta na presença de uma solução de controle, em vez de uma amostra biológica, tal como sangue integral. Claramente, um índice quantitativo, tal como o valor de DI, tem uma vantagem em relação aos métodos

mais qualitativos com base na forma da curva de corrente versus tempo nos períodos de queima ou leitura, como sugerido em outras patentes. A adição de uma referência interna oxidada a uma voltagem mais alta proporciona um resultado
5 que é independente da reação enzimática e da composição da solução de controle.

Em uma modalidade, a proporção do composto de referência interna adicionada à solução de controle é relacionada com a proporção de glicose presente. Isto é, a proporção da referência interna na solução de controle é proporcional à concentração de glicose, para manter um valor DI
10 aproximadamente constante. Um processo é usar o suficiente da referência interna para proporcionar um DI igual ou superior a cerca de 1,5, quando a proporção máxima de glicose, a cerca de 300 mg/dL, é usada. Então, a proporção da referência interna é reduzida, de modo que as soluções de controle
15 contendo concentrações mais baixas de glicose mantêm um valor de DI igual ou superior a 1,5.

A adição de uma referência interna para controlar as soluções possibilita distinguir facilmente entre as soluções de controle e as amostras biológicas e proporciona uma
20 precisão aperfeiçoada da análise. Os compostos de referência interna podem ser qualquer composto oxidável eletroquimicamente a um potencial desejável. É importante entender que nem todos os compostos oxidáveis quimicamente são oxidáveis
25 eletroquimicamente a um potencial adequado, ou a qualquer potencial oxidável. As espécies oxidáveis quimicamente (por exemplo, em uma solução homogênea) podem não ser oxidáveis

eletroquimicamente a um potencial adequado, porque a barreira de cinética de transferência de elétrons no eletrodo tem que ser superada. Desse modo, um agente redutor por natureza química pode não ser oxidável eletroquimicamente no eletrodo. Dependendo do potencial de oxirredução do mediador no sistema sensor de reagente, os compostos de referência interna com diferentes potenciais de oxirredução vão ser necessários. Por exemplo, se o mediador no sistema reagente for hexamina de rutênio ($\text{Ru}(\text{NH}_3)_{6+3}$), o composto de coordenação de ferrocianeto de potássio ou os compostos organometálicos de ferroceno e os seus derivados podem ser usados como a referência interna na solução de controle. Por outro lado, se o mediador for ferricianeto no sistema reagente, então outros compostos, tal como bis-tris ou 4-aminobenzonitrila, podem ser usados como a referência interna na solução de controle. Em cada caso, o composto de referência interna vai ter um potencial de oxirredução que seja pelo menos 100 mV mais alto do que o potencial de oxirredução do mediador.

Os exemplos dos compostos de referência interna incluem, mas não são limitados a, aminas orgânicas, tais como ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico (MOPS), ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(2-etano sulfônico) (HEPES), ácido 2-(hidróxi-1,1-bis (hidroximetil) etilamino) etano sulfônico (TES), ácido 2-morfolinoetano sulfônico (MES), bis (2-hidroxietil) amino-tris (hidroximetil) metano (Bis-Tris), 4-aminobenzonitrila, ácido 4-aminobenzóico e 4-iodoanilina. Nos exemplos abaixo, Bis-Tris e vários outros compostos são

mostrados como sendo uma referência interna útil para uso em soluções de controle contendo glicose.

Embora Bis-Tris possa ser usado como uma referência interna, também pode servir como um tampão. O pH da solução de controle é um fator importante na reação na qual a glicose é oxidada por uma enzima, tal como glicose oxidase. Para a medida de glicose, um pH de cerca de 5 a 7 é preferido, quando glicose oxidase é usada, enquanto que um pH de cerca de 6 - 8 é preferido quando se usa glicose desidrogenase. Um tampão é usualmente proporcionado para garantir que a oxidação de glicose prossegue na taxa esperada. Uma vantagem da presente invenção é que o composto de referência e o tampão podem ser separados, cada um servindo a uma função diferente, propiciando, desse modo, a otimização de cada função (tampão e referência interna) separadamente. Os tampões podem ser selecionados daqueles compatíveis com o reagente enzimático. Os exemplos incluem, mas não são limitados a, tampão de citrato e tampão de fosfato.

Os materiais poliméricos usados para reproduzir as propriedades fluidificantes do sangue podem incluir poli (óxido de etileno), poli (metacrilato de hidroxietila), polivinilpirrolidona (PVP), goma xantana, em proporções de 12 a 20% em peso. A glicose está tipicamente presente nas soluções de controle nas proporções equivalentes a cerca de 30 a 400 mg/dL, uma faixa que abrange o teor de glicose esperado das amostras de sangue.

Outros aditivos podem incluir sais, tampões, corantes, agentes antimicrobianos, polímeros, agentes espessantes e tensoativos.

Modo de operação da solução de controle

5 Vai ser óbvio que a introdução de um material de referência interna, oxidável a uma voltagem mais alta do que a usada para oxidar o mediador relacionado com glicose, via tornar necessária a aplicação da voltagem mais alta em algum ponto, durante o protocolo de medida. Quando dois períodos
10 são usados como descrito acima, isto é, os períodos de "queima" e "leitura", várias combinações de etapas potenciais dentro e por ambos os períodos de queima e leitura podem ser usadas, para proporcionar tanto um valor de DI identificando a solução de controle e uma corrente, das quais o teor
15 de glicose da solução de controle pode ser determinado. No método mais simples, uma alta voltagem é aplicada durante o período de queima e uma baixa voltagem é aplicada durante o período de leitura. Desse modo, o Índice Diferencial é:

$$DI = (i_{\text{queima}} / i_{\text{leitura}})$$

20 Quando a referência interna está presente, a corrente medida durante o período de queima vai incluir a corrente resultante da oxidação da referência interna mais a corrente resultante do mediador relacionado com a glicose. A corrente medida durante o período de leitura vai ser apenas
25 aquela resultante da oxidação da glicose, uma vez que a voltagem vai ser muito baixa para oxidar a referência interna. Desse modo, a razão da corrente de queima para a corrente de

leitura reflete o valor da corrente de referência interna contra a corrente da medida de glicose.

Alternativamente, ambas as voltagens alta e baixa podem ser aplicadas durante o período de queima, para detectar a presença da referência interna, enquanto que apenas uma baixa voltagem é usada durante o período de leitura. Essa combinação de etapas potenciais vai ainda manter o princípio operacional de considerar a razão da corrente de uma alta voltagem para aquela de uma baixa voltagem. Uma variação distinta na corrente vai ser observada, quando uma variação é feita de uma baixa voltagem para uma alta voltagem, ou vice-versa. A "baixa" voltagem não precisa ser idêntica àquela usada no período de leitura, para medir a glicose. A voltagem comparativa pode ser meramente mais baixa do que a necessária para oxidar a referência interna. Uma vez que o período de queima corresponde a um tempo no qual a amostra está hidratando os reagentes, a corrente pode variar durante o período de queima, como sugerido no diagrama genérico da Figura 4. Conseqüentemente, pode haver uma vantagem para se fazer mais de uma excursão entre as voltagens alta e baixa, para garantir que os valores de DI não sejam afetados pelas variações na disponibilidade de reagente, durante o período de queima.

Em outro método alternativo, uma alta voltagem (isto é, uma que oxida a referência interna) é usada durante uma parte do período de leitura. Desse modo, o DI pode ser determinado durante o período de leitura por medida das correntes alta e baixa, apenas durante o período de leitura.

Esse método pode proporcionar uma vantagem pelo fato de que qualquer variação na disponibilidade de reagente observada no período de queima seja evitada. De novo, o uso de mais de uma excursão entre as voltagens baixa e alta pode ser vantajoso.

Em outra modalidade da invenção, a ciclização frequente de potencial entre as voltagens alta e baixa é usada para afetar a forma da corrente versus tempo, durante o período de leitura, que é mostrada genericamente na Figura 4. A curva mostra tipicamente um rápido decaimento da corrente provocada pela depleção do mediador reduzido na ou próximo da superfície do eletrodo. Desse modo, o teor de glicose total é determinado por correlação com a corrente limitada por difusão, em vez de medida da glicose total na solução de controle. É evidente que o tempo selecionado como uma medida da glicose é importante, se medidas consistentes e precisas vão ser obtidas.

Em geral, as soluções de controle da invenção vão conter um composto, que pode ser oxidado eletroquimicamente a um maior potencial do que aquele necessário para oxidar glicose. Uma vez que a oxidação do mediador relacionado com a glicose (por exemplo, ferricianeto de potássio) requer um potencial de 200 mV relativo ao potencial no contra-eletrodo de ferricianeto, o potencial de oxidação para o composto de referência interna deve ser pelo menos 400 mV, relativo ao mesmo contra-eletrodo. Por exemplo, usando-se Bis-Tris como a referência, o potencial de oxidação é cerca de 600 mV, se o contra-eletrodo for suportado pela redução de ferriciane-

to. Outros exemplos incluem 4-aminobenzonitrila, ácido 4-aminobenzóico, 4-iodoanilina, que podem ser oxidados em uma faixa de potencial de + 400 a + 600 mV, relativa ao potencial no contra-eletrodo suportado pela redução do ferricianeto.

Um método de examinar o efeito da adição de uma referência interna às soluções de controle é o uso de voltametria cíclica. Em vez de aplicar um potencial fixo, uma voltagem variável é usada, varrendo de negativa à positiva relativa ao contra-eletrodo. Os exemplos apresentados a seguir ilustram o conceito e a aplicação de referência interna e o seu método de autodetecção de soluções de controle.

Exemplo 1

Uma solução aquosa contendo NaCl 50 mM foi comparada com outra solução contendo NaCl 50 mM e Bis-Tris 50 mM, como uma referência interna. Um segundo conjunto de amostras contendo a mesma composição, mas incluindo 350 mg/dL de glicose, foi testado. Nenhuma enzima ou mediador foi incluído, de modo que a oxidação de glicose não ocorreu. A Figura 5 mostra corrente versus potencial, na medida em que a diferença de potencial foi alternada entre - 400 mv e + 1.200 mV a 25 mV/s versus um eletrodo de referência de prata / cloreto de prata, usando a estação de trabalho eletroquímica da CH Instrument Co. Pode-se notar que a corrente não começou a escoar entre os eletrodos, até que fosse atingida uma diferença de potencial de + 600 mV. Para as amostras não contendo Bis-Tris, a corrente de oxidação é substancialmente zero por toda a faixa de potencial. Por outro lado, quando Bis-

Tris estava presente, houve uma corrente significativa a + 800 mV, começando a cerca de +600 mV. Pode-se concluir que a oxidação de biossensores é a mesma com e sem glicose presente, quando nenhuma enzima e mediador estão presentes. Quando da comparação das correntes volumétricas a + 800 mV entre os curvas corrente - potencial com e sem Bis-Tris na Figura 5, as soluções contendo Bis-Tris 50 mM foram claramente distinguidas.

Exemplo 2

10 Nesse exemplo, os testes do Exemplo 1 foram repetidos, como mostrado na Figura 6, exceto que o contra-eletrodo era de carbono com uma camada de ferricianeto de potássio, em vez do contra-eletrodo de Ag / AgCl₂ usado no Exemplo 1. A oxidação do Bis-Tris não é afetada pela presença ou ausência de glicose, quando não estão incluídos enzima e mediadores. No entanto, a corrente de oxidação começa a aumentar após + 400 mV e atinge um valor significativo a + 600 mV. Desse modo, comparadas com os aspectos voltamétricos na Figura 5, as correntes de fundo se mantêm substancialmente iguais a zero, sem a referência interna. A única diferença é o aumento da corrente de oxidação a um potencial mais baixo. Essa diferença é inteiramente devido ao contra-eletrodo diferente. É significativo que não haja nenhuma corrente de oxidação abaixo de + 400 mV. Desse modo, o Bis-Tris pode ser observado como sendo claramente distinto da oxidação de glicose, que começa logo acima do potencial zero, como vai ser observado no exemplo seguinte.

Exemplo 3

Os Exemplos 1 e 2 apresentados nas Figuras 5 e 6 mostram a presença da referência interna (Bis-Tris) em soluções com ou sem glicose, mas na ausência da glicose oxidase e do mediador necessários para detectar a presença de glicose. No exemplo mostrado na Figura 7, as soluções dos Exemplos 1 e 2 foram usadas, mas a glicose oxidase e o ferricianeto de potássio (mediador) são incluídos, de modo que quando glicose está presente, é oxidada como é nos sensores eletroquímicos de glicose. Comparando-se a Figura 7 com a Figura 6, as características voltamétricas observadas nos curvas corrente - potencial cíclicos (modelos de corrente versus potencial) diferem significativamente. Os picos na corrente de oxidação ocorrendo em torno de zero volt indicam que a glicose está sendo oxidada. Quando nenhuma glicose estava presente, apenas uma pequena corrente foi produzida acima de 0 mV, devido a alguma atividade de fundo. Quando glicose, a 350 mg/dL, está presente, uma quantidade de corrente significativa é produzida com os picos característicos acima e abaixo de 0 mV. Uma condição de estado constante foi atingida a cerca de + 400 mV, que pode ser usado para correlacionar-se com a proporção de glicose presente. A ambos os níveis de glicose de 0 e 350 mg/dL, as correntes de oxidação antes de 400 mV são iguais, com e sem a adição do composto de referência interna. Quando o potencial atinge + 600 mV, a corrente observada com as soluções contendo Bis-Tris é sempre mais alta do que aquela sem Bis-Tris, se a concentração de glicose foi igual a 0 ou 350 mg/dL. Desse modo, a solução

de controle, que contém o composto de referência interna, pode ser identificada.

Exemplo 4

O Bis-Tris foi usado como um composto de referência nos Exemplos 1 - 3. Nesse exemplo, vários outros compostos de referência interna são apresentados. A Figura 8 mostra curvas corrente - potencial cíclicos de três compostos de referência interna adicionais, ácido 4-aminobenzóico, 4-aminobenzonitrila e 4-iodoanilina. Esses três curvas corrente - potencial cíclicos foram obtidos de tiras de sensores de glicose comerciais da Ascensia AUTODISC® (DEX). As três espécies de referência interna foram adicionadas individualmente a uma solução equivalente à de controle de polímero PVP a 20 - 24%, pH 5 - 5,5 em tampão de citrato, mas sem glicose. As concentrações de ácido 4-aminobenzóico, 4-aminobenzonitrila e 4-iodoanilina foram de cada um deles de 50 mM. Pode-se notar da Figura 8, que, enquanto que os primeiros picos de oxidação à direita depois do zero são substancialmente idênticos, as correntes após + 0,3 volt diferem, dependendo do composto de referência interna incluído. Na Figura 8, o potencial entre 0,1 V e 0,3 V é considerado como baixo potencial, que é usado para medir glicose por oxidação apenas do mediador. O potencial partindo de + 0,4 volt a 0,8 volt é considerado o potencial alto, responsável por oxidação de ambos o mediador e a referência interna. Na região de potenciais de + 0,3 a + 0,8, todas as correntes são mais altas quando uma referência interna estava presente

do que quando nenhuma referência interna tinha sido adicionada à solução de controle.

Exemplo 5

Há muitos modos de combinar os potenciais alto e baixo para oxidar e medir a referência interna, para detectar a presença de uma solução de controle, enquanto ainda medindo a concentração de glicose. As Figuras 9A - E mostram algumas das seqüências de potenciais (formas de onda) para combinação dos potenciais alto e baixo. Em cada caso, um período de queima é seguido por um período de espera, e depois por um período de "leitura", como descrito acima. A Figura 9A mostra uma seqüência de potenciais para a seqüência de potenciais Queima - Espera - Leitura simples. A Figura 9B mostra uma seqüência de potenciais com a baixa voltagem na primeira metade do período de Queima, seguido por uma alta voltagem no mesmo período de Queima. Na Figura 9C, uma seqüência de potenciais, com a voltagem alta na primeira metade do período de Queima, é seguida por uma baixa voltagem no mesmo período de Queima. A Figura 9D mostra uma seqüência de potenciais, com a voltagem alta na primeira metade do período de Leitura, seguida por uma baixa voltagem no mesmo período de Leitura. Na Figura 9E, uma seqüência de potenciais similar é mostrada com a baixa voltagem na primeira metade do período de Leitura, seguida por uma alta voltagem no mesmo período de Leitura.

Exemplo 6

As Figuras 10a - b ilustram o efeito do aumento da concentração da referência interna, nesse caso o Bis-Tris.

Na Figura 10a, a solução equivalente à de controle (isto é, sem glicose) contendo NaCl 50 mM mostra o efeito do aumento da concentração de referência interna de 0 a 50 mM e a 100 mM de Bis-Tris (com NaCl 100 mM). A presença de Bis-Tris é
5 claramente visível e o aumento na concentração aumenta ainda mais a corrente a + 600 mV. Na Figura 10B, glicose a 350 mg/dL está presente na solução de controle da mesma composição, como indicado pelos fortes picos logo acima de 0 mV. Uma vez que a corrente de glicose é ainda notável em torno
10 de + 600 mV, a detecção da presença de Bis-Tris requer uma maior quantidade do que quando nenhuma glicose está presente. Desse modo, a concentração da referência interna deve ser tal que uma indicação clara da sua presença pode ser detectada, quando a solução de controle contém uma alta con-
15 centração de glicose. Então, quando a solução de controle contém uma concentração de glicose mais baixa, a presença da referência interna vai ser ainda mais evidente.

Exemplo 7

Para esse exemplo, os testes foram conduzidos por
20 comparação das soluções de controle com e sem adição de Bis-Tris, como a referência interna, e uma amostra de sangue integral. Em todos os três casos, as amostras foram tiras de teste comerciais Ascensia AUTODISC®. A sequência do teste foi a de aplicar um potencial de + 400 mV por 4 segundos,
25 depois + 600 mV por 4 segundos, repouso em circuito aberto (sem potencial aplicado ao eletrodo) por 5 segundos, e depois aplicação de + 200 mV por 5 segundos. Os perfis de corrente para os três tipos de amostras são apresentados na Fi-

gura 11. O Índice Diferencial (DI) foi calculado para duas comparações. Caso I-a: a corrente medida a 8 segundos do período de queima é comparada com a corrente a 4 segundos do período de queima. Caso I-b: a corrente medida a 8 segundos do período de queima é comparada com a corrente a 2 segundos do período de leitura. Nenhuma glicose foi adicionada à solução de teste de NaCl 100 mM e Bis-Tris 100 mM ou à amostra de sangue integral. O caso I-a é equivalente à sequência da Figura 9B, enquanto que o caso I-b é equivalente à Figura 9A. Os valores de DI e as variações relativas dos valores de DI desses testes são apresentados na Tabela 2. Em ambos os casos, o valor de DI da solução de controle, com a referência interna Bis-Tris, é da ordem de 500% dos valores de DI encontrados quando a solução de controle e a amostra de sangue integral não continham qualquer referência interna. Esses resultados indicam que a solução de controle com a referência interna pode ser facilmente detectada, comparada com uma solução de controle ou sangue integral carente do composto de referência.

20 Tabela 2 - Valores de DI e % de variação de valor de DI a 0 de glicose.

	Solução de teste		
	com Bis-Tris	sem Bis-Tris	sangue integral
B8/B4, DI (Caso I-a)	5,5	0,8	0,8
desvio padrão	0,6	0,1	0,08
% C.V.	11,4	10,1	10,0
% de variação versus refe-	-	563	603

rência interna			
B8/B4, DI (Caso I-b)	10,7	1,7	1,8
desvio padrão	1,5	0,23	0,13
% C.V.	14,1	13,6	7,5
% de variação versus referência interna	-	522	503

Exemplo 8

Os testes do Exemplo 7 foram repetidos, mas a solução de controle continha 350 mg/dL de glicose e a amostra de sangue integral 400 mg/dL de glicose. A mesma sequência de potenciais foi usada para esse teste. Os perfis de corrente típicos para as três amostras são apresentados na Figura 12 para altas concentrações de glicose. Os valores de DI e a variação relativa dos valores de DI são registrados na Tabela 3. Os valores de DI na Tabela 2, para os casos II-a e II-b, são iguais àqueles do Exemplo 7 e são, desse modo, as variações relativas dos valores de DI com a referência interna àquele sem a referência interna e as amostras de sangue integral. Para a alta concentração de glicose de 350 mg/dL, o valor de DI para a solução de controle com a referência interna é da ordem de 100% mais alto do que aquele das amostras de sangue integral. A diferença de DI garante que a solução de controle com uma referência interna pode ser distinguida de uma solução de controle carente da referência interna e da amostra de sangue integral.

Tabela 3 - Valores de DI e percentuais de variação de valores de DI a um alto teor de glicose.

	Solução de teste		
	com Bis-Tris	sem Bis-Tris	sangue integral
B8/B4, DI (Caso II-a)	2,3	1,2	1,0
desvio padrão	0,26	0,13	0,07
% C.V.	11,6	11,0	7,0
% de variação versus referência interna	-	96	127
B8/B4, DI (Caso II-b)	1,7	0,9	0,9
desvio padrão	0,09	0,03	0,03
% C.V.	5,5	3,9	3,1
% de variação versus referência interna	-	95	78

Protocolos para teste da solução de controle

A comparação das correntes produzidas durante os períodos de queima e leitura podem ser feitas de muitos modos. Algumas seqüências de teste são ilustradas no Exemplo 5 e na Figura 9. Na alternativa mais simples, uma medida é feita no potencial necessário para oxidar o composto de referência interna, e outra medida é feita no potencial mais baixo usado para oxidar o analisado. Depois, o Índice Diferencial é calculado e, com base nos resultados, o medidor eletroquímico registra que ou uma solução de controle ou que uma amostra biológica está sendo testada. De preferência, a primeira medida é feita durante a parte posterior do período de queima e a segunda durante o período de leitura, mas ambas as medidas podem ser feitas durante o período de queima

ou durante o período de leitura. O período de tempo necessário para obter leituras de corrente pode ser variado, por exemplo, entre cerca de 1 e 10 segundos. No entanto, desde que as leituras de corrente sejam suficientemente longas para representar adequadamente a presença do composto de referência interna ou a glicose, qualquer período de tempo pode ser usado.

Para confiabilidade adicional nos resultados, mais de um período pode ser usado para ambos os potenciais alto e baixo. Isto é, o potencial para oxidação da referência interna, isto é, + 600 mV para o Bis-Tris, e o potencial para oxidação de glicose, isto é, + 200 - 400 mV, podem ser aplicados mais de uma vez durante o período de queima ou o período de leitura.

É também viável aplicar potenciais que são mais altos do que os que são necessários para a oxidação do analisado ou da referência interna. Isto é, se o potencial de oxidação for para o mediador de glicose é + 200 mV, por exemplo, depois um potencial de + 200 mV e o mais alto pode ser usado, com o limite sendo no potencial no qual a referência interna é oxidada.

Em uma modalidade, variações múltiplas nos potenciais aplicados são usadas para proporcionar uma indicação mais consistente nos potenciais alto e baixo. Além do mais, a alternância dos potenciais tem a vantagem de uniformizar as curvas de corrente versus tempo e aperfeiçoar a precisão. Por exemplo, o potencial aplicado pode ser alternado entre

os valores alto e baixo a cada 1 segundo, durante os períodos de queima e/ou leitura.

Processo alternativo A

Um método de distinguir uma solução de controle de
5 uma amostra biológica, durante operação de um sensor eletroquímico medindo a proporção de um analisado na dita solução de controle e na dita amostra biológica, o método compreendendo os atos de:

(a) adicionar à dita solução de controle um composto de referência interna, o dito composto sendo adaptado
10 para ser oxidado eletroquimicamente a um potencial mais alto do que o potencial necessário para medir a oxidação do dito analisado, o dito composto de referência interna sendo adicionado em uma proporção relativa a uma proporção predeterminada de analisado na dita solução de controle, suficiente
15 para indicar a presença do dito composto de referência interna na solução de controle;

(b) introduzir a dita solução de controle contendo o dito composto de referência interna e a dita proporção
20 predeterminada do dito analisado a um sensor eletroquímico, o dito sensor tendo eletrodos de trabalho e de referência, e uma camada de reação contendo os reagentes para oxidação do dito analisado;

(c) pelo menos por uma vez aplicação de um potencial aos ditos eletrodos do dito sensor eletroquímico, suficiente para oxidar o dito composto de referência interna e o
25 dito analisado e medir a corrente elétrica resultante;

(d) pelo menos por uma vez aplicação de um potencial ao dito sensor eletroquímico mais baixo do que o potencial de (c), o dito potencial sendo suficiente para medir a oxidação do dito analisado e não suficiente para oxidar o
5 dito composto de referência interna e medir a corrente elétrica resultante;

(e) calcular um Índice Diferencial (DI) definido como $DI = (i_{\text{alta volt.}} / i_{\text{baixa volt.}})$, em que: $i_{\text{alta volt.}}$ é a corrente medida em (c) e $i_{\text{baixa volt.}}$ é a corrente medida em (d);

10 (f) determinar que uma solução de controle está presente quando o Índice Diferencial de (e) é suficientemente maior do que 1, para distinguir o composto de referência interna da proporção predeterminada de analisado; e

(g) determinar que uma amostra biológica está presente quando o Índice Diferencial de (e) é cerca de 1.
15

Processo alternativo B

O método do processo alternativo A, em que o dito Índice Diferencial determinado em (f) é igual ou superior a 1,5.

20 Processo alternativo C

O método do processo alternativo A, no qual o dito composto de referência interna é adicionado em uma proporção proporcional à proporção do analisado na dita solução de controle.

25 Processo alternativo D

O método do processo alternativo C, no qual o dito composto de referência interna é adicionado em uma proporção de modo que o Índice Diferencial é igual ou superior a 1,5,

quando a proporção do analisado é o máximo usado na dita solução de controle.

Processo alternativo E

O método do processo alternativo A, no qual o potencial de (c) é aplicado antes do potencial de (d) ser aplicado.

Processo alternativo F

O método do processo alternativo A, no qual o potencial de (d) é aplicado antes do potencial de (c).

10 Processo alternativo G

O método do processo alternativo A, no qual os potenciais de (c) e (d) são aplicados mais de uma vez.

Processo alternativo H

O método do processo alternativo A, no qual o dito analisado é medido por aplicação de um primeiro potencial suficiente para oxidar o dito analisado, por um primeiro período de tempo predeterminado, seguida pela aplicação de um segundo potencial insuficiente para oxidar o dito analisado e inferior àquele do dito primeiro potencial, por um segundo período de tempo predeterminado, e seguida por aplicação de um terceiro potencial mais alto do que o dito segundo potencial e suficiente para oxidar o dito analisado, por um terceiro período de tempo predeterminado.

Processo alternativo I

25 O método do processo alternativo H, no qual o dito potencial de (c) é aplicado durante o dito primeiro período de tempo predeterminado, e o dito potencial de (d) é aplicado durante o dito terceiro período de tempo predeterminado.

Processo alternativo J

O método do processo alternativo H, no qual ambos o dito potencial de (c) e o dito potencial de (d) são aplicados durante o dito primeiro período de tempo predeterminado.

Processo alternativo K

O método do processo alternativo H, no qual ambos o dito potencial de (c) e o dito potencial de (d) são aplicados durante o dito terceiro período de tempo.

10 Processo alternativo L

O método do processo alternativo H, no qual o dito potencial de (d) é aplicado durante o dito primeiro período de tempo predeterminado, e o dito potencial de (c) é aplicado durante o dito terceiro período de tempo predeterminado.

15 Processo alternativo M

O método do processo alternativo H, no qual os ditos potenciais de pelo menos um de (c) e (d) é aplicado mais de uma vez.

Processo alternativo N

20 O método do processo alternativo A, no qual o dito analisado é glicose e a dita amostra biológica é sangue integral.

Processo alternativo O

25 O método do processo alternativo A, no qual o dito composto de referência interna é um composto organometálico oxidável, um composto de coordenação ou um composto de amina orgânica.

Processo alternativo P

O método do processo alternativo O, no qual o dito composto de referência interna é o dito composto de amina orgânica, o dito composto de amina orgânica sendo ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico, ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(2-etano sulfônico), ácido 2-(hidróxi-1,1-bis(hidroximetil) etilamino) etano sulfônico, ácido 2-morfolinoetano sulfônico, bis (2-hidroxietil) amino-tris(hidroximetil) metano (Bis-Tris), 4-aminobenzonitrila, ácido 4-aminobenzóico ou 4-iodoanilina.

10 Processo alternativo Q

O método do processo alternativo P, no qual o dito composto de referência interna é Bis-Tris.

Processo alternativo R

15 O método do processo alternativo O, no qual o dito composto de referência interna é o dito composto organometálico oxidável, o dito composto organometálico oxidável sendo ferroceno ou derivados de ferroceno.

Processo alternativo S

20 O método do processo alternativo O, no qual o dito composto de referência interna é o dito composto de coordenação, o dito composto de coordenação sendo ferrocianeto de potássio.

Processo alternativo T

25 O método do processo alternativo N, no qual a glicose é oxidada por glicose oxidase, e no qual a dita solução de controle contém um tampão capaz de manter um pH entre 5 e 7.

Processo alternativo U

O método do processo alternativo N, no qual a glicose é oxidada por glicose desidrogenase, e no qual a dita solução de controle contém um tampão capaz de manter um pH entre 6 e 8.

5 Modalidade alternativa V

Uma solução de controle para uso em teste de um sistema eletroquímico para medir a proporção de um analisado em uma amostra biológica, a solução de controle compreendendo:

10 (a) uma proporção predeterminada do dito analisado; e

(b) uma proporção predeterminada de um composto de referência interna, o dito composto de referência interna sendo adaptado para ser oxidado a um potencial mais alto do que o potencial requerido para oxidar o dito analisado, a dita proporção predeterminada do dito composto de referência interna sendo proporcional à dita proporção predeterminada de analisado, de modo que a presença do dito composto de referência interna é detectável.

20 Modalidade alternativa W

A solução de controle da modalidade alternativa V, na qual o dito analisado é glicose e a dita amostra biológica é sangue integral.

Modalidade alternativa X

25 A solução de controle da modalidade alternativa W, na qual o dito composto de referência interna é um composto organometálico oxidável, um composto de coordenação ou um composto de amina orgânica.

Modalidade alternativa Y

A solução de controle da modalidade alternativa X, na qual o dito composto de referência interna é o dito composto de referência interna é o dito composto de amina orgânica, o dito composto de amina orgânica sendo ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico, ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(2-etano sulfônico), ácido 2-(hidróxi-1,1-bis (hidroximetil) etilamino) etano sulfônico, ácido 2-morfolinoetano sulfônico, bis (2-hidroxietil) amino-tris (hidroximetil) metano (Bis-Tris), 4-aminobenzonitrila, ácido 4-aminobenzóico ou 4-iodoanilina.

Modalidade alternativa Z

A solução de controle da modalidade alternativa Y, na qual a dita referência interna é Bis-Tris.

15 Modalidade alternativa AA

A solução de controle da modalidade alternativa Y, na qual o dito composto de referência interna é o dito composto organometálico oxidável, o dito composto organometálico oxidável sendo ferroceno ou derivados de ferroceno.

20 Modalidade alternativa BB

A solução de controle da modalidade alternativa X, na qual o dito composto de referência interna é o dito composto de coordenação, o dito composto de coordenação sendo ferrocianeto de potássio.

25 Modalidade alternativa CC

A solução de controle da modalidade alternativa W, na qual a glicose é oxidada por glicose oxidase, e um tampão é incluído para manter o pH entre 5 e 7.

Modalidade alternativa DD

A solução de controle da modalidade alternativa W, na qual a glicose é oxidada por glicose desidrogenase, e um tampão é incluído para manter o pH entre 6 e 8.

5 Modalidade alternativa EE

Um composto de referência interna para adição a uma solução de controle, usada para testar um medidor eletroquímico de glicose, a dita referência interna compreendendo um composto químico que é oxidável a um potencial mais
10 alto do que aquele necessário para medir a oxidação de glicose.

Modalidade alternativa FF

A referência interna da modalidade alternativa EE, em que a dita referência interna é oxidável a um potencial
15 pelo menos 100 mV maior do que o potencial necessário para medir a oxidação de glicose.

Modalidade alternativa GG

A referência interna da modalidade alternativa EE, em que o dito composto de referência interna é um composto
20 organometálico oxidável, um composto de coordenação ou um composto de amina orgânica.

Modalidade alternativa HH

A referência interna da modalidade alternativa GG, na qual o dito composto de referência interna é ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico, ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(2-etano sulfônico), ácido 2-(hidróxi-1,1-bis (hidroximetil) etilamino) etano sulfônico, ácido 2-morfolinoetano sulfônico, bis (2-hidroxietil) amino-tris
25

(hidroximetil) metano (Bis-Tris), 4-aminobenzonitrila, ácido 4-aminobenzóico e 4-iodoanilina.

Modalidade alternativa II

A referência interna da modalidade alternativa HH,
5 na qual o dito composto de referência interna é Bis-Tris.

Modalidade alternativa JJ

A referência interna da modalidade alternativa GG,
na qual o dito composto de referência interna é o dito com-
posto organometálico oxidável, o dito composto organometáli-
10 co oxidável sendo ferroceno ou derivados de ferroceno.

Modalidade alternativa KK

A referência interna da modalidade alternativa GG,
na qual o dito composto de referência interna é o dito com-
posto de coordenação, o dito composto de coordenação sendo
15 ferrocianeto de potássio.

Ainda que a invenção seja suscetível a várias mo-
dificações e formas alternativas, as modalidades específicas
são mostradas por meio de exemplo nos desenhos e descritos
em detalhes. Deve-se entender, no entanto, que não se tem
20 intenção de limitar a invenção às formas particulares des-
critas, mas, ao contrário, a invenção é cobrir todas as mo-
dificações, equivalentes e alternativas incluídas nos espí-
rito e âmbito da invenção, como definido pelas reivindica-
ções em anexo.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de distinguir uma solução de controle de uma amostra biológica, durante operação de um sensor eletroquímico medindo a proporção de um analisado na dita solução de controle e na dita amostra biológica, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende os atos de:

(a) adicionar à dita solução de controle um composto de referência interna, o dito composto sendo adaptado para ser oxidado eletroquimicamente a um potencial mais alto do que o potencial necessário para medir a oxidação do dito analisado, o dito composto de referência interna sendo adicionado em uma proporção relativa a uma proporção predeterminada de analisado na dita solução de controle, suficiente para indicar a presença do dito composto de referência interna na solução de controle;

(b) introduzir a dita solução de controle contendo o dito composto de referência interna e a dita proporção predeterminada do dito analisado a um sensor eletroquímico, o dito sensor tendo eletrodos de trabalho e de referência, e uma camada de reação contendo os reagentes para oxidação do dito analisado;

(c) pelo menos por uma vez aplicação de um potencial aos ditos eletrodos do dito sensor eletroquímico, suficiente para oxidar o dito composto de referência interna e o dito analisado e medir a corrente elétrica resultante;

(d) pelo menos por uma vez aplicação de um potencial ao dito sensor eletroquímico mais baixo do que o potencial de (c), o dito potencial sendo suficiente para medir a

oxidação do dito analisado e não suficiente para oxidar o dito composto de referência interna e medir a corrente elétrica resultante;

(e) calcular um Índice Diferencial (DI) definido como $DI = (i_{\text{alta volt.}} / i_{\text{baixa volt.}})$, em que: $i_{\text{alta volt.}}$ é a corrente medida em (c) e $i_{\text{baixa volt.}}$ é a corrente medida em (d);

(f) determinar que uma solução de controle está presente quando o Índice Diferencial de (e) é suficientemente maior do que 1, para distinguir o composto de referência interna da proporção predeterminada de analisado; e

(g) determinar que uma amostra biológica está presente quando o Índice Diferencial de (e) é cerca de 1.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito Índice Diferencial determinado em (f) é igual ou superior a 1,5.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito composto de referência interna é adicionado em uma proporção proporcional à proporção do analisado presente na dita solução de controle.

20 4. Método, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito composto de referência interna é adicionado em uma proporção de modo que o Índice Diferencial é igual ou superior a 1,5, quando a proporção do analisado é o máximo usado na dita solução de controle.

25 5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o potencial de (c) é aplicado antes do potencial de (d) ser aplicado.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o potencial de (d) é aplicado antes do potencial de (c).

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, **5 CARACTERIZADO** pelo fato de que os potenciais de (c) e (d) são aplicados mais de uma vez.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito analisado é medido por aplicação de um primeiro potencial suficiente para oxidar o
10 dito analisado, por um primeiro período de tempo predeterminado, seguida pela aplicação de um segundo potencial insuficiente para oxidar o dito analisado e inferior àquele do dito primeiro potencial, por um segundo período de tempo predeterminado, e seguida por aplicação de um terceiro potencial
15 al mais alto do que o dito segundo potencial e suficiente para oxidar o dito analisado, por um terceiro período de tempo predeterminado.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito potencial de (c) é aplicado durante o dito primeiro período de tempo predeterminado, e o dito potencial de (d) é aplicado durante o dito
20 terceiro período de tempo predeterminado.

10. Método, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que ambos o dito potencial de (c)
25 e o dito potencial de (d) são aplicados durante o dito primeiro período de tempo predeterminado.

11. Método, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito potencial de (c) e o

dito potencial de (d) são aplicados durante o dito terceiro período de tempo.

12. Método, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito potencial de (d) é aplicado durante o dito primeiro período de tempo predeterminado, e o dito potencial de (c) é aplicado durante o dito terceiro período de tempo predeterminado.

13. Método, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os ditos potenciais de pelo menos um de (c) e (d) é aplicado mais de uma vez.

14. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito analisado é glicose e a dita amostra biológica é sangue integral.

15. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito composto de referência interna é um composto organometálico oxidável, um composto de coordenação ou um composto de amina orgânica.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito composto de referência interna é o dito composto de amina orgânica, o dito composto de amina orgânica sendo ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico, ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(2-etano sulfônico), ácido 2-(hidróxi-1,1-bis (hidroximetil) etilamino) etano sulfônico, ácido 2-morfolinoetano sulfônico, bis (2-hidroxietil) amino-tris (hidroximetil) metano (Bis-Tris), 4-aminobenzonitrila, ácido 4-aminobenzóico ou 4-iodoanilina.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito composto de referência interna é Bis-Tris.

18. Método, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito composto de referência interna é o dito composto organometálico oxidável, o dito composto organometálico oxidável sendo ferroceno ou derivados de ferroceno.

19. Método, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito composto de referência interna é o dito composto de coordenação, o dito composto de coordenação sendo ferrocianeto de potássio.

20. Método, de acordo com a reivindicação 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a glicose é oxidada por glicose oxidase, e no qual a dita solução de controle contém um tampão capaz de manter um pH entre 5 e 7.

21. Método, de acordo com a reivindicação 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a glicose é oxidada por glicose desidrogenase, e no qual a dita solução de controle contém um tampão capaz de manter um pH entre 6 e 8.

22. Solução de controle para uso em teste de um sistema eletroquímico para medir a proporção de um analisado em uma amostra biológica, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende:

(a) uma proporção predeterminada do dito analisado; e

(b) uma proporção predeterminada de um composto de referência interna, o dito composto de referência interna

sendo adaptado para ser oxidado a um potencial mais alto do que o potencial requerido para oxidar o dito analisado, a dita proporção predeterminada do dito composto de referência interna sendo proporcional à dita proporção predeterminada de analisado, de modo que a presença do dito composto de referência interna é detectável.

23. Solução de controle, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito analisado é glicose e a dita amostra biológica é sangue integral.

10 24. Solução de controle, de acordo com a reivindicação 23, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito composto de referência interna é um composto organometálico oxidável, um composto de coordenação ou um composto de amina orgânica.

15 25. Solução de controle, de acordo com a reivindicação 24, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito composto de referência interna é o dito composto de referência interna é o dito composto de amina orgânica, o dito composto de amina orgânica sendo ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico, ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(2-etano sulfônico), ácido 20 do 2-(hidróxi-1,1-bis (hidroximetil) etilamino) etano sulfônico, ácido 2-morfolinoetano sulfônico, bis (2-hidroxietil) amino-tris (hidroximetil) metano (Bis-Tris), 4-aminobenzonitrila, ácido 4-aminobenzóico ou 4-iodoanilina.

25 26. Solução de controle, de acordo com a reivindicação 25, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita referência interna é Bis-Tris.

27. Solução de controle, de acordo com a reivindicação 24, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito composto de

referência interna é o dito composto organometálico oxidável, o dito composto organometálico oxidável sendo ferroceno ou derivados de ferroceno.

28. Solução de controle, de acordo com a reivindicação 24, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito composto de referência interna é o dito composto de coordenação, o dito composto de coordenação sendo ferrocianeto de potássio.

29. Solução de controle, de acordo com a reivindicação 23, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a glicose é oxidada por glicose oxidase, e um tampão é incluído para manter o pH entre 5 e 7.

30. Solução de controle, de acordo com a reivindicação 23, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a glicose é oxidada por glicose desidrogenase, e um tampão é incluído para manter o pH entre 6 e 8.

31. Composto de referência interna para adição a uma solução de controle, usada para testar um medidor eletroquímico de glicose, a dita referência interna **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende um composto químico que é oxidável a um potencial mais alto do que aquele necessário para medir a oxidação de glicose.

32. Referência interna de acordo com a reivindicação 31, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita referência interna é oxidável a um potencial pelo menos 100 mV maior do que o potencial necessário para medir a oxidação de glicose.

33. Referência interna de acordo com a reivindicação 31, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito composto de

referência interna é um composto organometálico oxidável, um composto de coordenação ou um composto de amina orgânica.

34. Referência interna de acordo com a reivindicação 33, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito composto de
5 referência interna é ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico, ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(2-etano sulfônico), ácido 2-(hidróxi-1,1-bis (hidroximetil) etilamino) etano sulfônico, ácido 2-morfolinoetano sulfônico, bis (2-hidroxietil) amino-tris (hidroximetil) metano (Bis-Tris), 4-
10 aminobenzonitrila, ácido 4-aminobenzóico e 4-iodoanilina.

35. Referência interna de acordo com a reivindicação 34, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito composto de referência interna é Bis-Tris.

36. Referência interna de acordo com a reivindicação 33, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito composto de
15 referência interna é o dito composto organometálico oxidável, o dito composto organometálico oxidável sendo ferroceno ou derivados de ferroceno.

37. Referência interna de acordo com a reivindicação 33, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito composto de
20 referência interna é o dito composto de coordenação, o dito composto de coordenação sendo ferrocianeto de potássio.

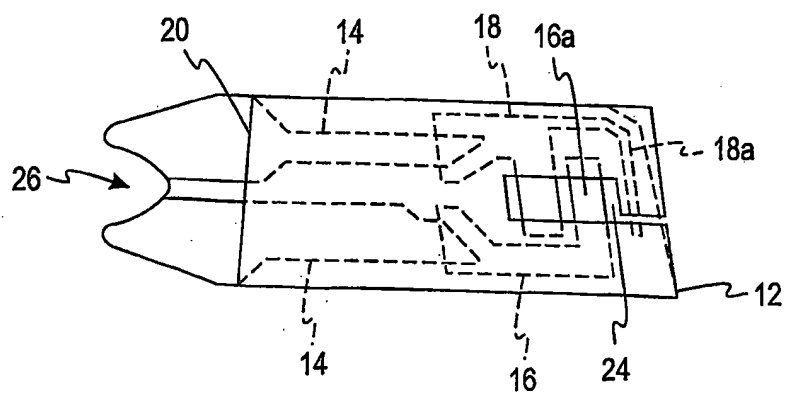
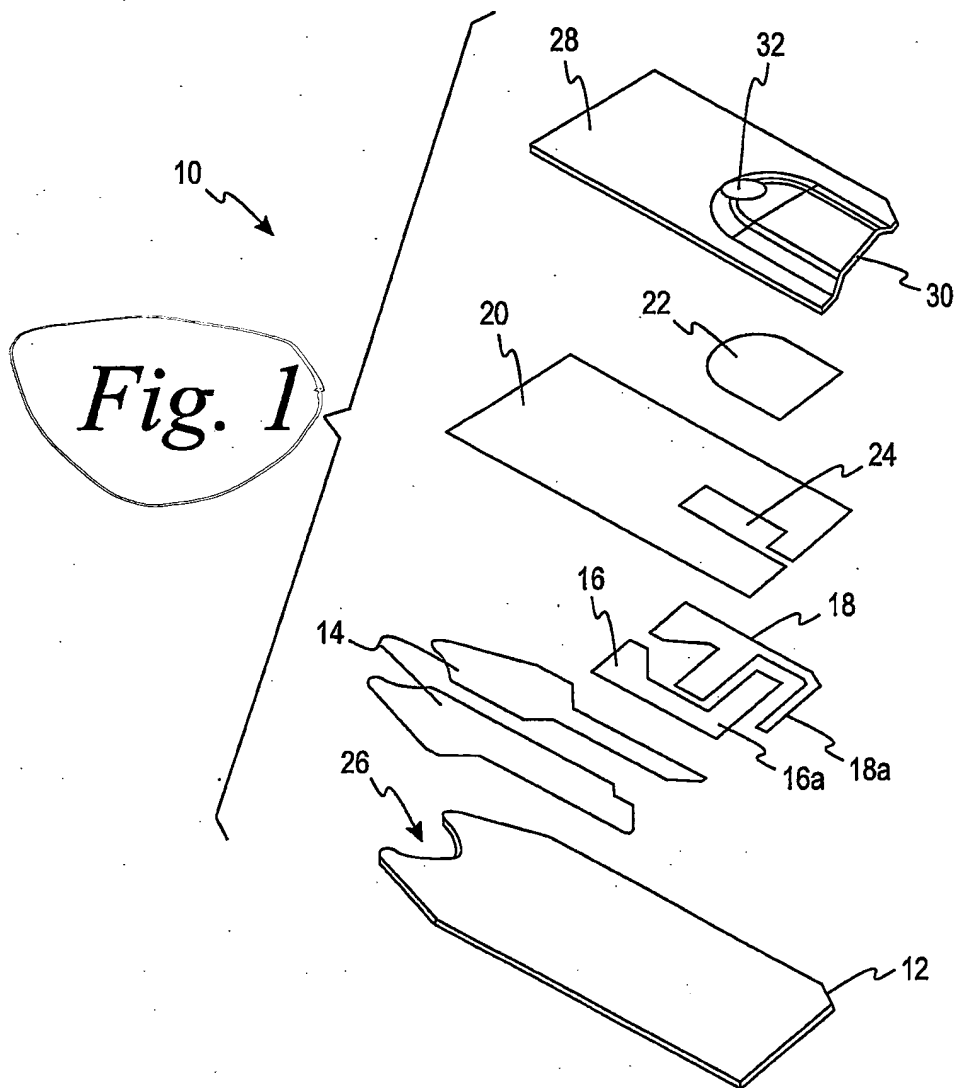
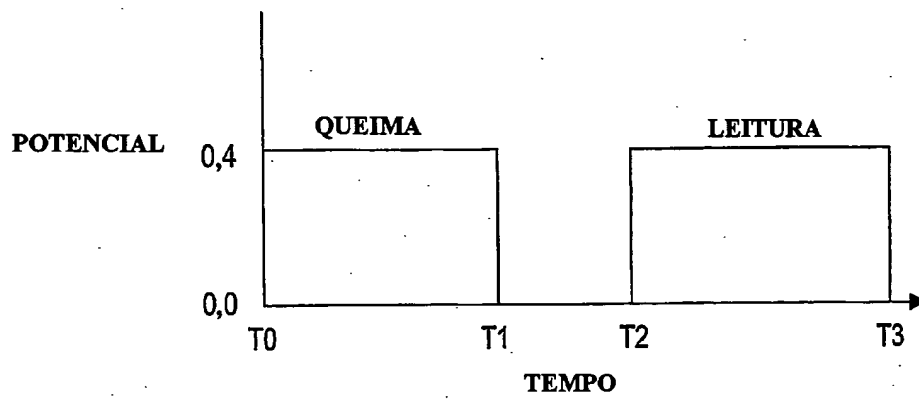
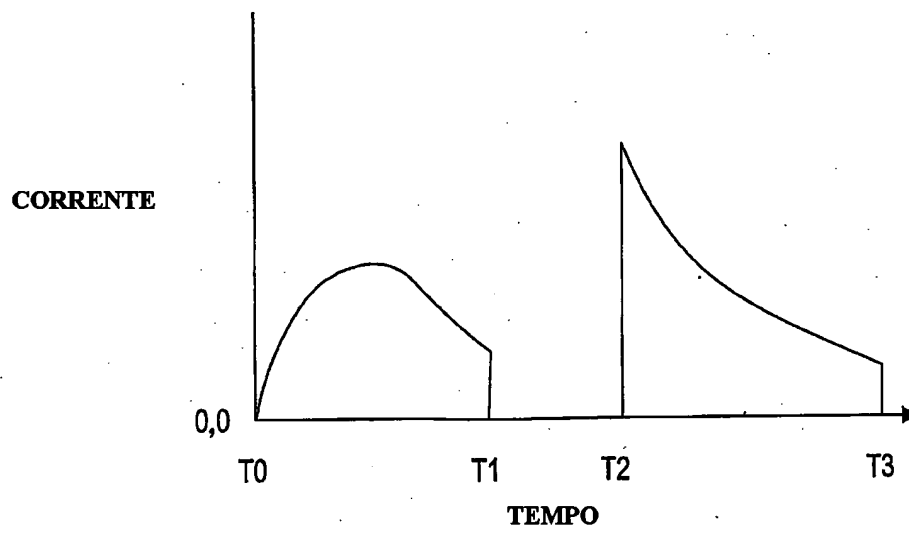


Fig. 2

*Fig. 3**Fig. 4*

CURVA CORRENTE - POTENCIAL CÍCLICA PARA SOLUÇÃO DE CONTROLE COM REFERÊNCIA INTERNA E SENSOR
ZP3-1 COM CONTRA-ELETRODO / ELETRODO DE REFERÊNCIA DE Ag / AgCl (SEM REAGENTE)

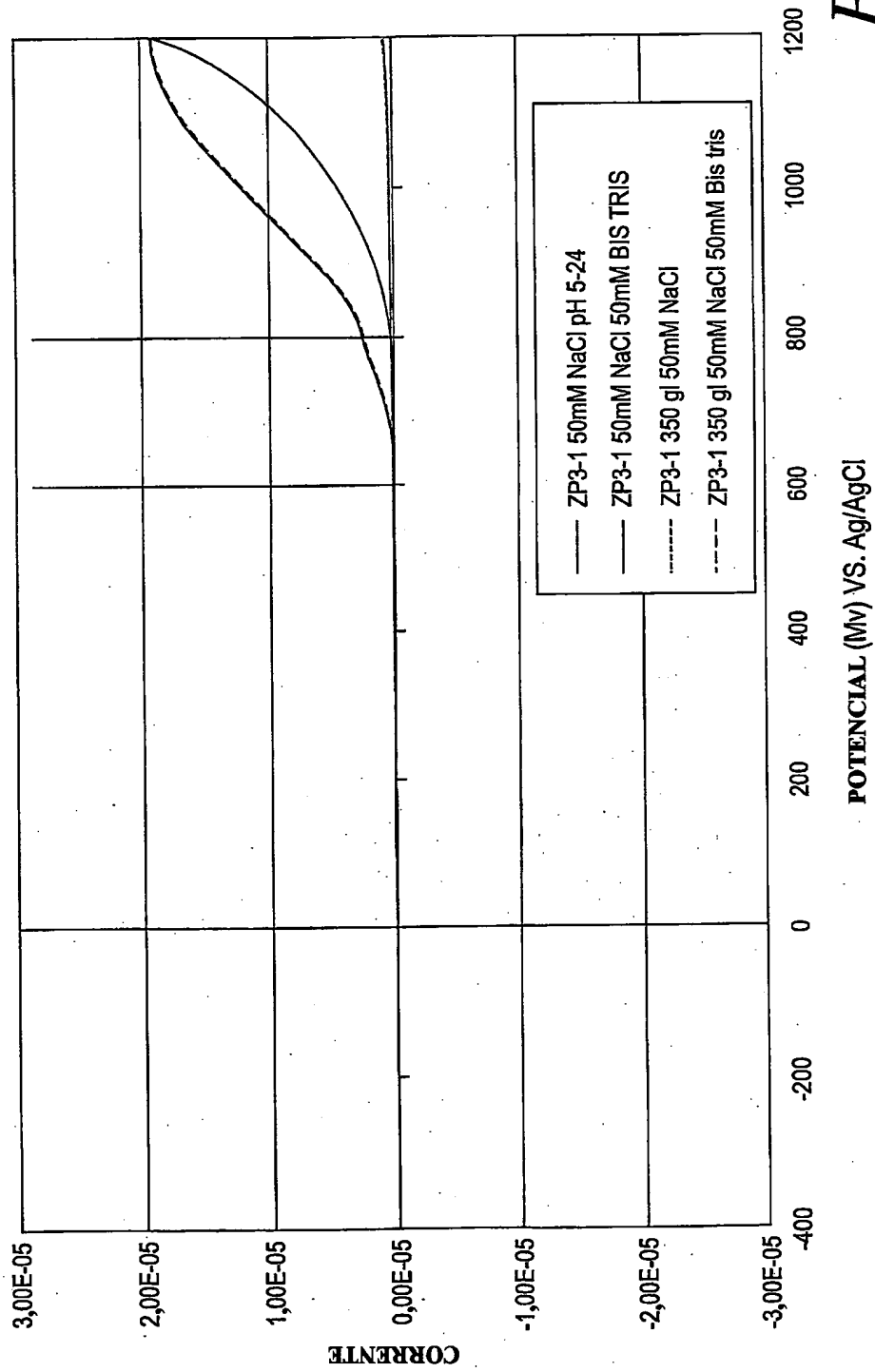


Fig. 5

CURVA CORRENTE - POTENCIAL CÍCLICA PARA SOLUÇÃO DE CONTROLE COM REFERÊNCIA INTERNA E SENSOR ZP3-1 COM CONTRA-ELETRODO / ELETRODO DE REFERÊNCIA DE FERRICIANETO (SEM REAGENTE)

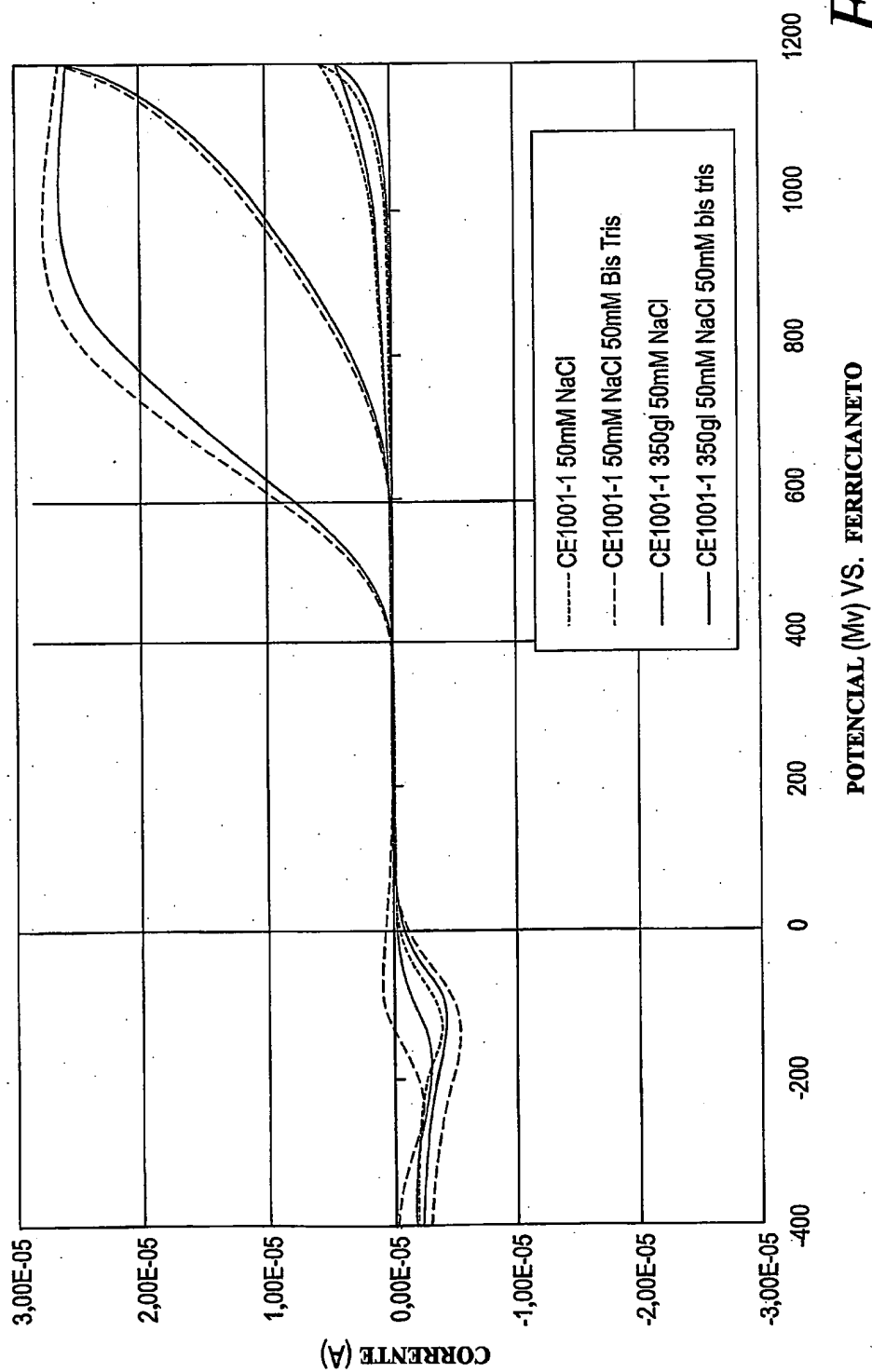


Fig. 6

**CURVA CORRENTE - POTENCIAL CÍCLICA PARA SOLUÇÃO DE CONTROLE COM
REFERÊNCIA INTERNA E SENSOR ASCENSIA DEX LOTE A244AA**

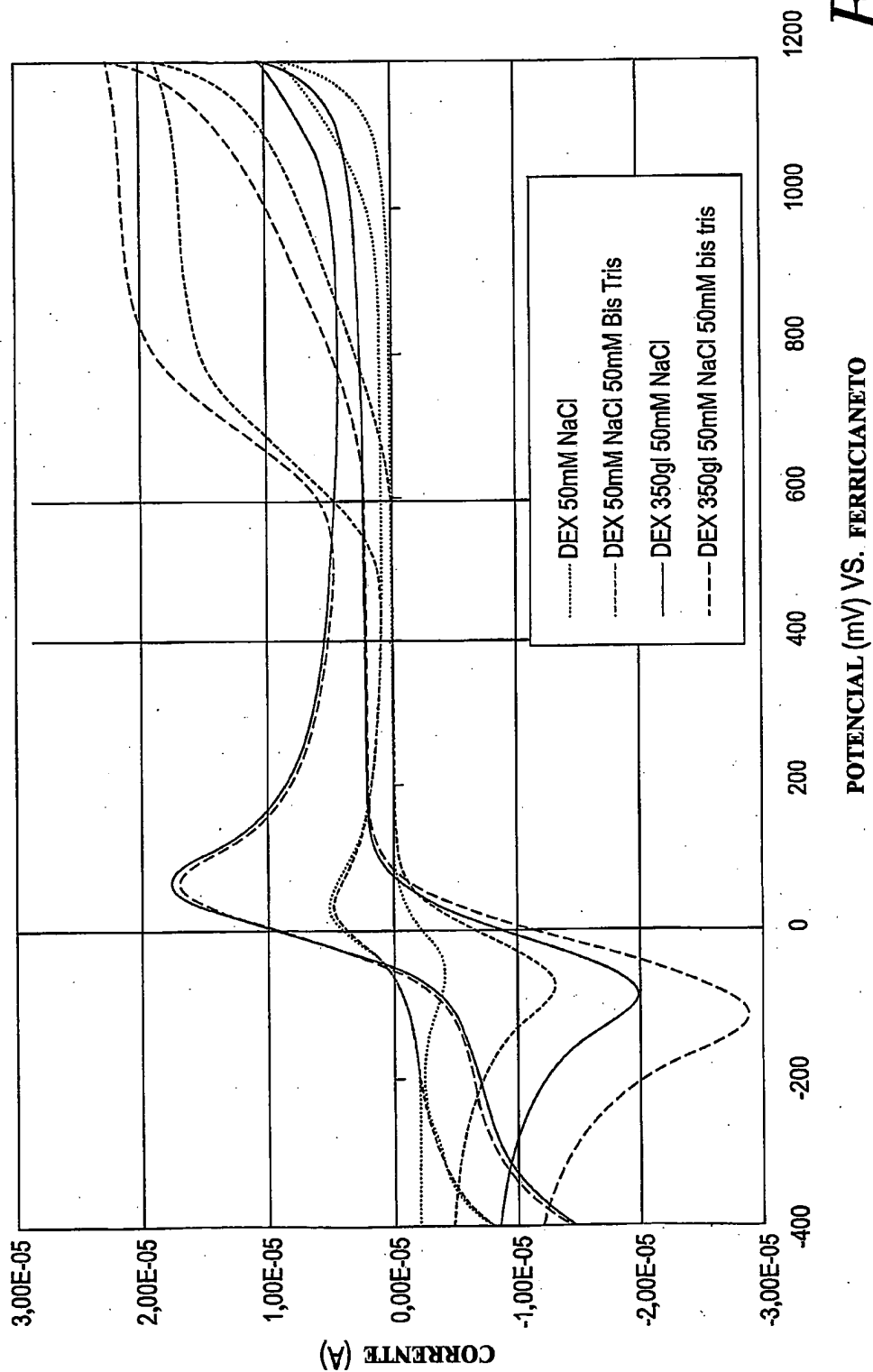


Fig. 7

CURVAS CORRENTE - POTENCIAL DE ESPÉCIES OXIDÁVEIS

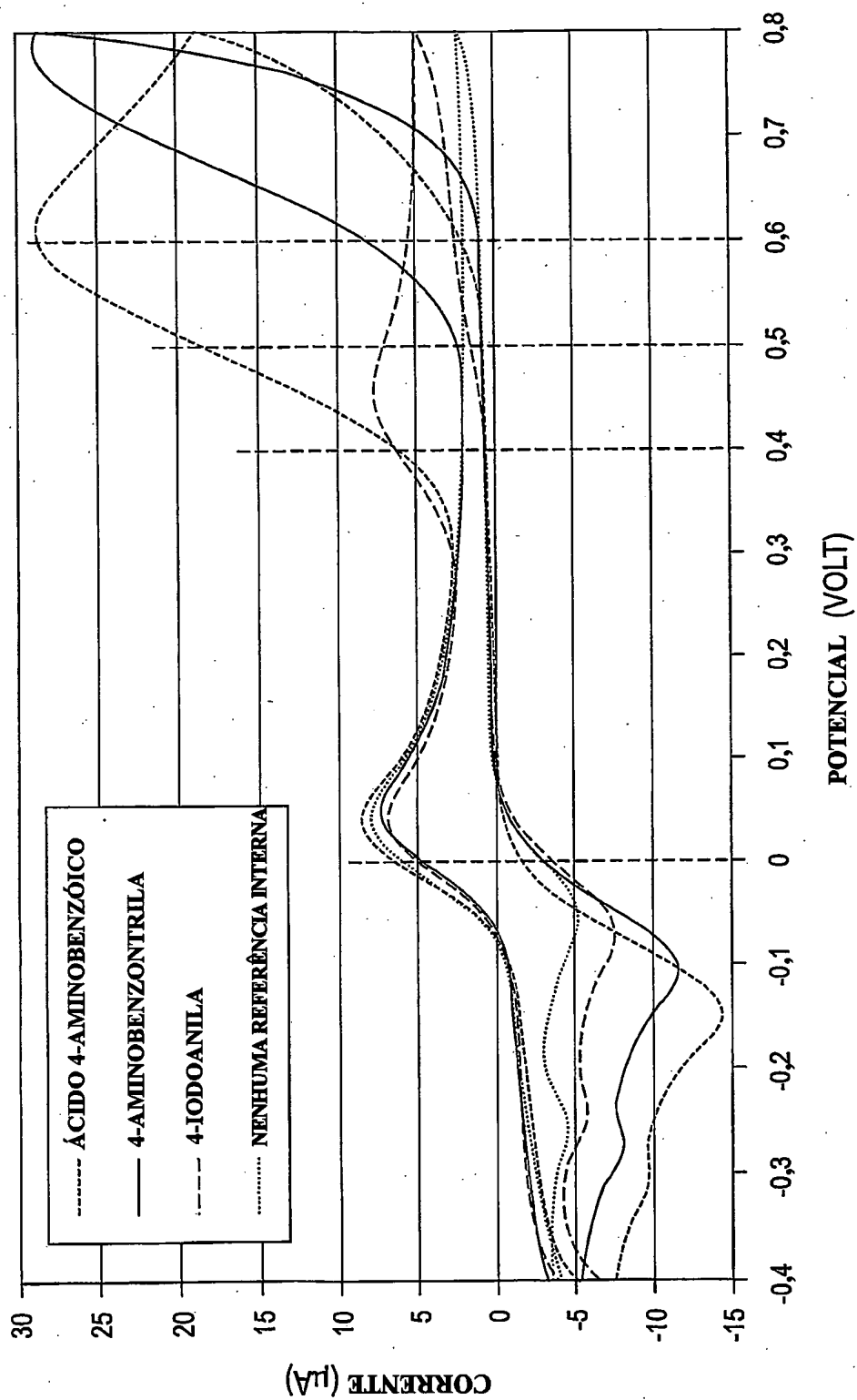


Fig. 8

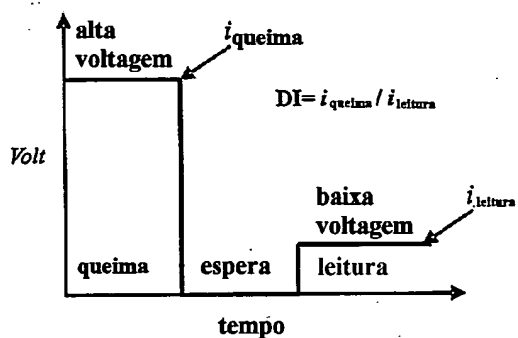


Fig. 9a

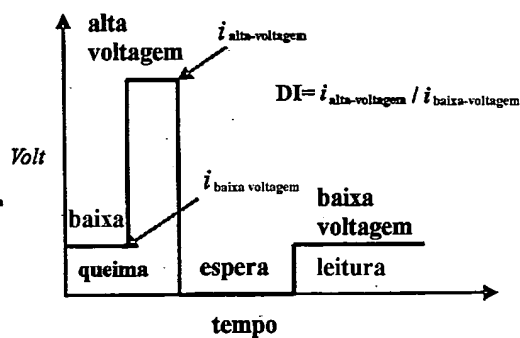


Fig. 9b

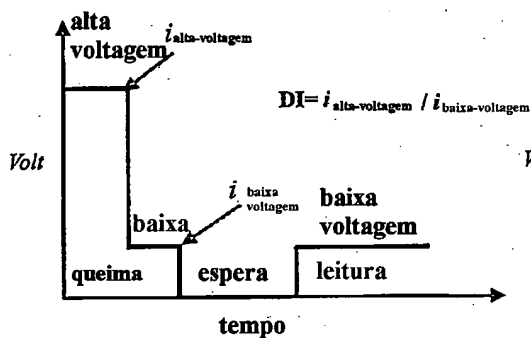


Fig. 9c

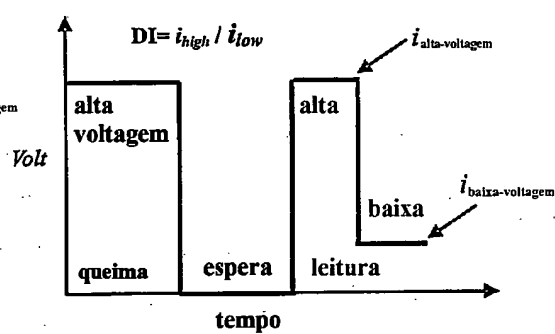


Fig. 9d

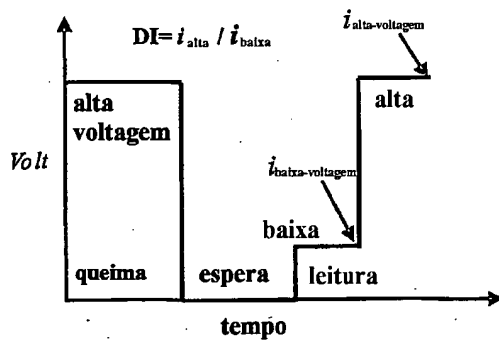


Fig. 9e

CURVAS CORRENTE - POTENCIAL DE REFERÊNCIA INTERNA, SEM GLICOSE

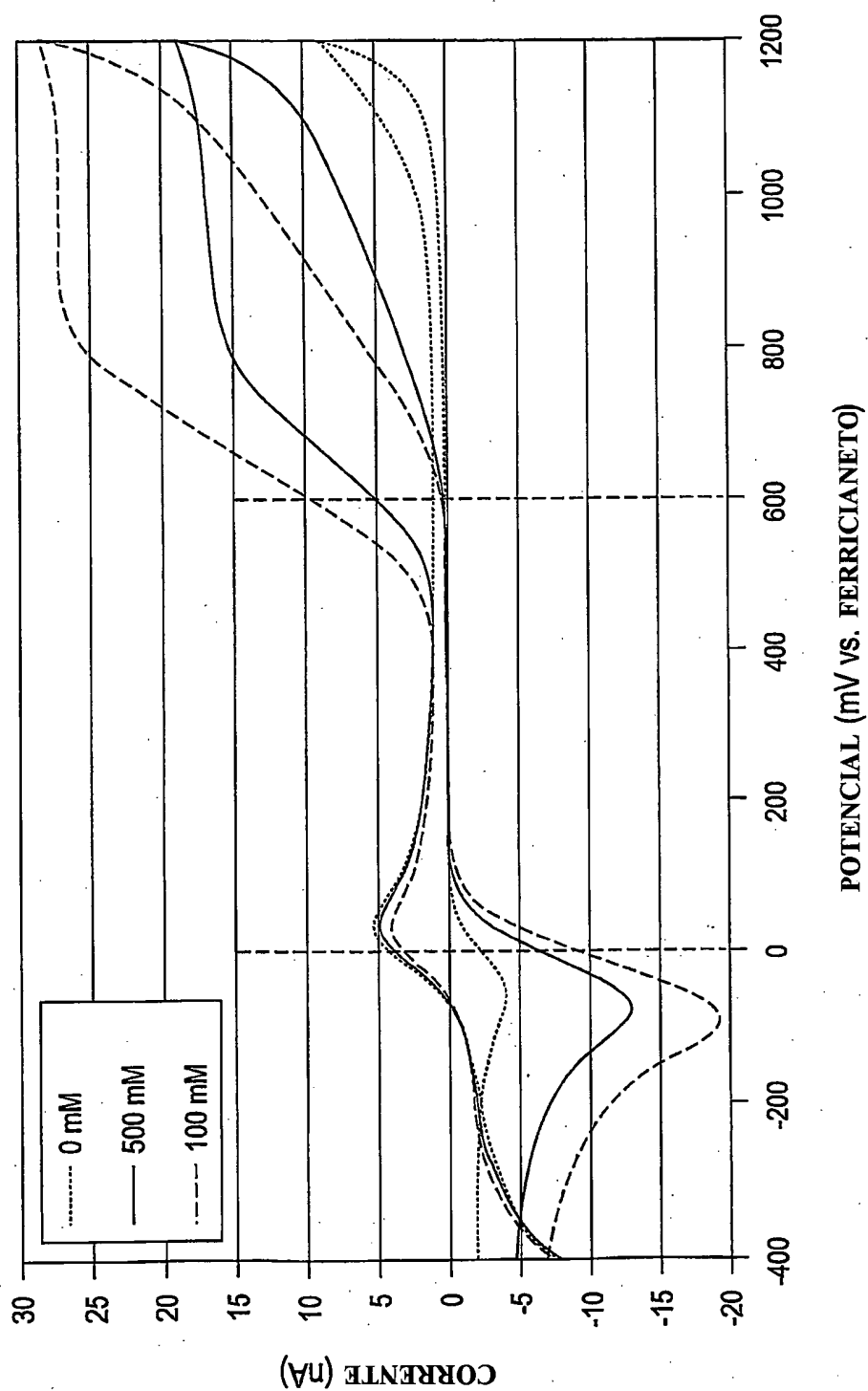
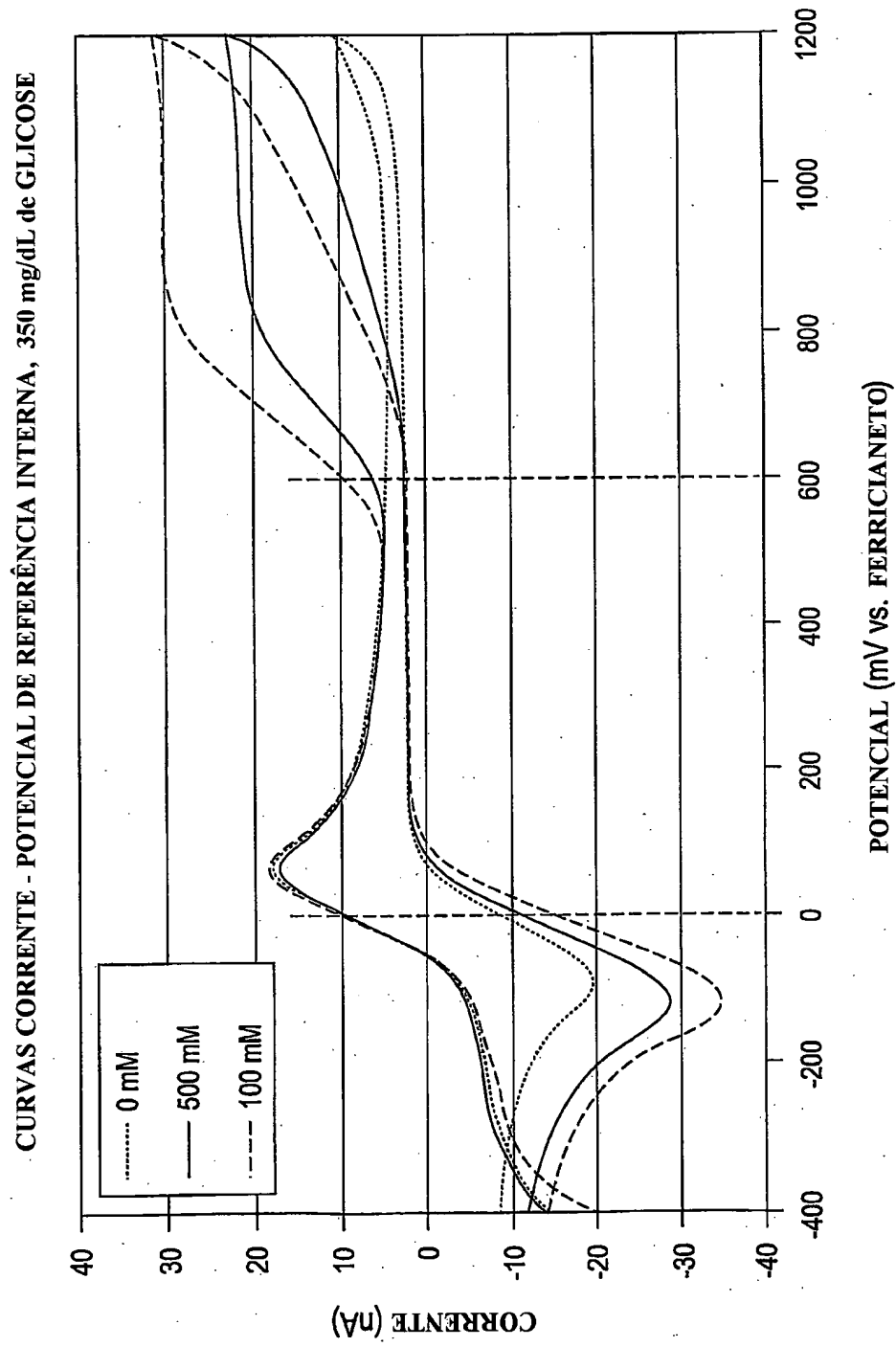


Fig. 10a

*Fig. 10b*

SOLUÇÃO DE CONTROLE, 0 mg/dL DE GLICOSE

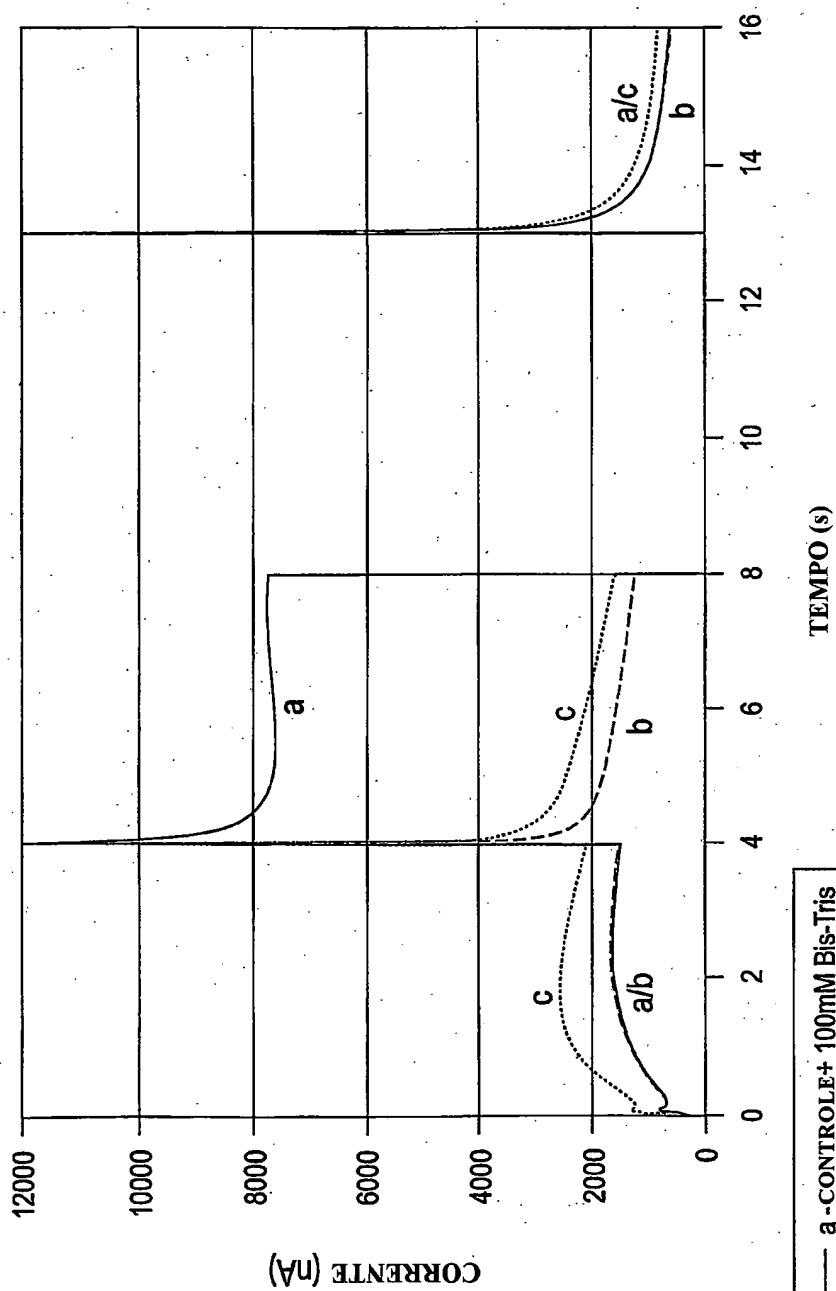


Fig. 11

SOLUÇÃO DE CONTROLE, ALTO TEOR DE GLICOSE

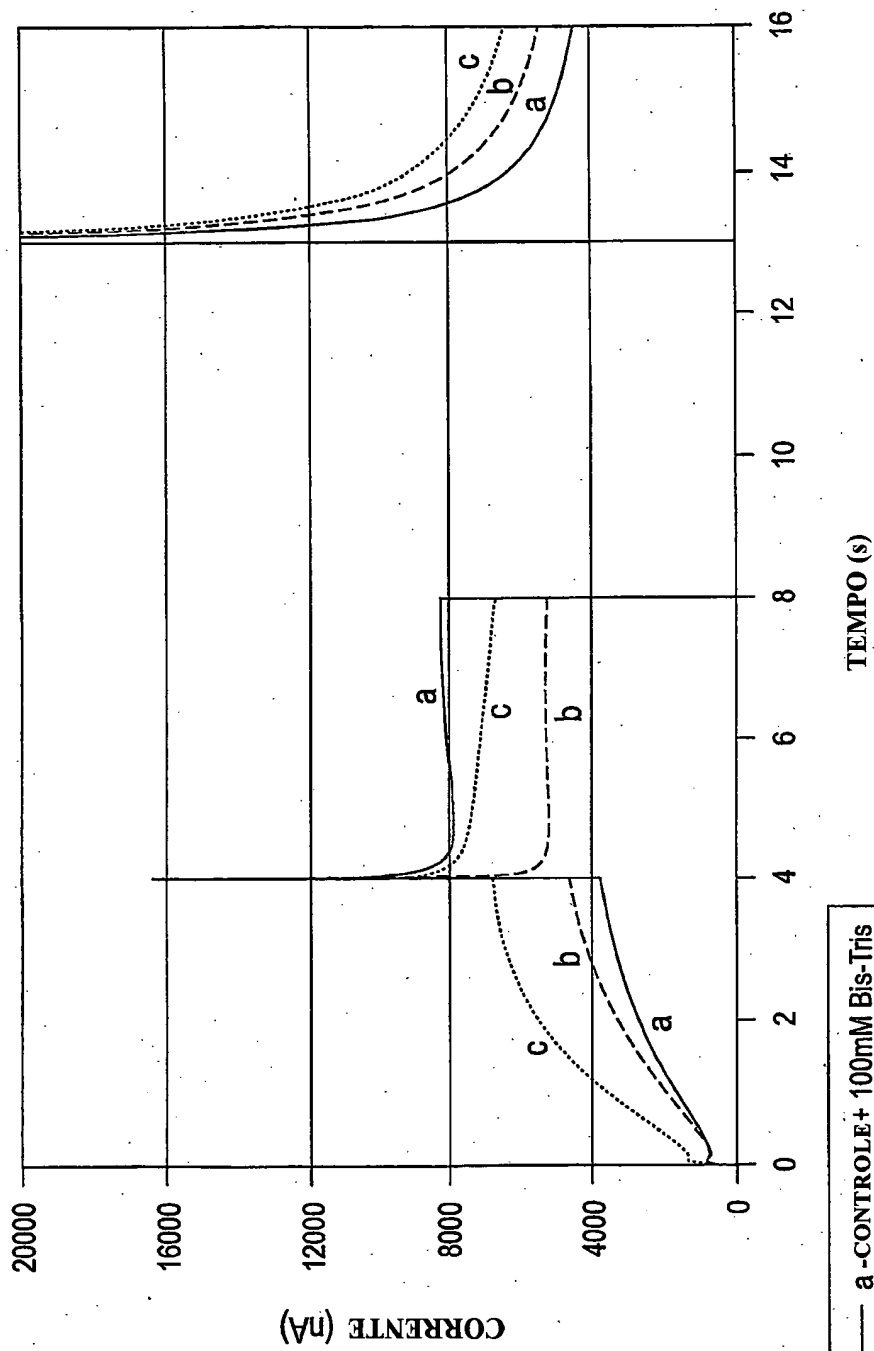


Fig. 12

RESUMO

"ESPÉCIES OXIDÁVEIS COMO UMA REFERÊNCIA INTERNA EM SOLUÇÕES DE CONTROLE PARA BIOSSENSORES"

O teste do desempenho de um medidor eletroquímico,
5 usado para medir a presença de um analisado em uma amostra biológica, particularmente, glicose em sangue integral, inclui a introdução de uma solução de controle contendo uma proporção predeterminada do analisado e uma proporção predeterminada de um composto de referência interna. O composto
10 de referência interna é selecionado de modo que seja oxidado a um potencial superior do que aquele usado para oxidar o analisado, possibilitando distinguir a solução de controle de uma amostra biológica.

"ESPÉCIES OXIDÁVEIS COMO UMA REFERÊNCIA INTERNA EM
SOLUÇÕES DE CONTROLE PARA BIOCENSORES"

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção é dirigida, de uma maneira geral, ao
5 campo de dispositivos médicos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Mais especificamente, esta invenção se refere a
biossensores, que são usados para medir a proporção de ana-
litos em fluidos corpóreos. Os métodos ópticos são freqüen-
10 temente usados para fazer essas medidas, mas a presente in-
venção se refere a aperfeiçoamentos em biossensores eletro-
químicos. Ainda que o método descrito aqui possa ser aplica-
do à medida de outros analitos, incluindo colesterol, uréia,
creatinina e creatina, a medida de glicose em sangue inte-
15 gral é de particular interesse. Embora a descrição aqui vá
ênfatizar a aplicação da invenção na medida de glicose, de-
ve-se entender que a invenção tem aplicações mais amplas.

A invenção se refere a um instrumento eletroquími-
co no qual um potencial é aplicado a eletrodos em contato
20 com uma amostra biológica e reagentes. A corrente resultante
é medida, enquanto o analito está reagindo com os reagentes,
e depois correlacionada com a proporção de um analito na a-
mostra. Esses instrumentos são referidos como amperométricos,
em contraste com os instrumentos colorimétricos, que
25 medem a carga total em coulombs, produzidos da reação da a-
mostra por integração da corrente por todo o tempo de medi-
da. Os instrumentos amperométricos têm uma vantagem pelo fa-
to de que eles são menos dependentes de volume e tempo. Não

esperam que todo o volume do analito seja reagido, mas apenas fazem medidas no analito por amostragem da taxa de reação a um tempo predeterminado.

Muitos projetos para esses biossensores foram descritos na técnica, por exemplo, no pedido de patente U.S. 2001/0042683. Os eletrodos são descritos de uma maneira geral como o eletrodo de trabalho e como o contra-eletrodo. Os eletrodos ficam em contato com uma camada sólida contendo reagentes, que oxidam o analito na amostra, tal como glicose oxidase, e mediadores que reoxidam a enzima reduzida. O próprio mediador reduzido é oxidado no eletrodo de trabalho, que produz uma corrente mensurável. Essa corrente é usada para calcular a proporção de glicose na amostra sendo testada, uma vez que é uma medida indireta da oxidação de glicose na amostra. as reações podem ser descritas pelas seguintes etapas:

$$\text{Glicose} + \text{E}_{\text{oxid}} \rightarrow \text{E}_{\text{red}} + \text{produto (ácido glucônico, gluconolactona)}$$

$$\text{E}_{\text{red}} + \text{Med}_{\text{oxid}} \rightarrow \text{Med}_{\text{red}} + \text{E}_{\text{oxid}}$$

$$\text{Med}_{\text{red}} \rightarrow \text{Med}_{\text{oxid}} + n\text{e}^{-},$$

em que E_{oxid} e E_{red} são as formas oxidada e reduzida do centro de oxirredução da enzima e Med_{oxid} e Med_{red} são as formas oxidada e reduzida do mediador.

Para medir glicose, a enzima pode ser glicose oxidase e o mediador ferricianeto. A medida de outros analitos vai empregar enzimas e mediadores adequados. As combinações típicas de enzima, mediador e analito são listadas na Tabela 1.

TABELA 1 - Sistemas de substratos, enzimas e mediadores

Analito	Enzima	Mediador
glicose	glicose oxidase	ferricianeto
glicose	glicose desidrogenase	ferricianeto
colesterol	colesterol oxidase	ferricianeto
lactato	lactato oxidase	ferricianeto
ácido úrico	uricase	ferricianeto
álcool	álcool oxidase	fenilenodiamina

Para garantir medidas precisas, soluções de controle contendo proporções conhecidas de glicose são usadas para verificar que o instrumento está funcionando adequadamente. A composição das soluções de controle foi objeto de várias patentes e publicações. São representativas as patentes U.S. 3.920.580, 4.572.899, 5.028.542 e 5.605.837, os pedidos de patentes internacionais WO 93/21928, 95/13535 e 95/13536. Ainda que as soluções de controle contendo soro de sangue tenham sido usadas, as patentes mais recentes se preocuparam com a substituição das soluções de controle à base de soro com soluções isentas de soro, uma vez que as soluções isentas de soro são mais consistentes e estáveis do que aquelas contendo soro. A solução de controle deve conter uma concentração conhecida de glicose em uma matriz similar a soro, para determinar a precisão de ambos o biossensor enzimático e o medidor do potenciômetro. Vai ser evidente que a composição deve ser estável por períodos mais longos de armazenamento, antes de uso.

Em uma modalidade, o analito na amostra biológica é glicose em sangue integral e o mediador é ferricianeto de potássio. O composto de referência interna é oxidável a um potencial mais alto do que o potencial necessário para oxidar o mediador, que é usado para medir a oxidação do analito. A referência interna tem uma concentração predeterminada na solução de controle, juntamente com uma concentração predeterminada de glicose. O mediador relacionado com glicose e a referência interna são oxidados seletivamente no eletrodo por diferentes potenciais (baixos e altos). Quando a glicose é o analito, o composto de referência interna deve ser oxidável a um potencial de pelo menos 100 mV mais alto do que o potencial usado para reoxidar o mediador reduzido.

Os compostos de referência interna, úteis para medir glicose em soluções de controle, incluem quaisquer espécies oxidáveis no eletrodo a um potencial adequado, tais como compostos organometálicos, compostos de coordenação e compostos de aminas orgânicas. A proporção do composto de referência interna usada é relacionada com a proporção de glicose na solução de controle. De preferência, a proporção do composto de referência interna é selecionada de modo que a solução de controle possa ser reconhecida, quando a glicose na solução de controle for o máximo necessário para testar o medidor de glicose eletroquímico. Alternativamente, a proporção do composto de referência interna pode ser variada em relação à proporção de glicose.

As medidas comparativas feita em potenciais baixos e altos proporcionam um método para detectar o composto de referência interna e, desse modo, a solução de controle. Quando o protocolo de medida emprega dois períodos separados por um período de repouso, as voltagens alta e baixa podem ser aplicadas em qualquer um ou em ambos os períodos. Um potencial é aplicado a um sensor, que recebeu a solução de controle. A corrente produzida a um potencial capaz de oxidar o composto de referência interna é comparada com a corrente produzida, quando de um potencial capaz de oxidar apenas o analito (por exemplo, glicose), mas não o composto de referência interna. A razão entre as duas correntes medidas, designada o Índice Diferencial (DI), proporciona um meio para distinguir a solução de controle de uma amostra líquida desprovida do composto de referência interna.

$$DI = i_{\text{alta volt.}} / i_{\text{baixa volt.}}$$

em que $i_{\text{alta volt.}}$ e $i_{\text{baixa volt.}}$ são as correntes medidas em alta e baixa voltagens. Na voltagem mais alta, ambos o composto de referência interna e o mediador reduzido são oxidados, enquanto que na voltagem mais baixa apenas o mediador é oxidado.

Um valor de DI de cerca de 1 indica que a amostra é desprovida do composto de referência interna e presume-se que seja uma amostra biológica, enquanto que um valor DI significativamente superior a 1, de preferência, pelo menos cerca de 1,5, indica que a amostra é uma solução de controle.

Em outra modalidade, a invenção é um composto de referência interna, adequado para indicar a presença de uma solução de controle, que está sendo usada para testar a precisão de um sistema biossensor eletroquímico / potenciômetro. Quando o analito é glicose em sangue integral, o composto de referência interna pode ser um composto organometálico oxidável, um composto de coordenação ou uma amina orgânica.

Uma consequência da presente invenção é o aperfeiçoamento da consistência da corrente medida e da precisão da análise resultante. Se potenciais alto e baixo são aplicados durante o mesmo período de oxidação, tais como os períodos de queima e leitura usados na oxidação de glicose, é menos provável que fatores externos, tais como o movimento da amostra ou a temperatura ambiental, afetem o Índice Diferencial. As leituras múltiplas da corrente desenvolvida a voltagens alta e/ou baixa podem aperfeiçoar a precisão dos resultados. Também, quando a presença de uma solução de controle foi determinada, um algoritmo de correção de temperatura particular para a solução de controle pode ser aplicado. Por uso de diferentes algoritmos de temperatura para a solução de controle e a amostra biológica (por exemplo, sangue integral), os resultados clínicos podem ser aperfeiçoados e valores de faixas de controle mais estreitas podem ser atribuídos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é uma vista detalhada de um biossensor de acordo com uma modalidade.

A Figura 2 é uma vista montada do biossensor da Figura 1.

A Figura 3 é uma representação gráfica de potencial versus tempo para um período de queima.

5 A Figura 4 é uma representação gráfica de corrente versus tempo para o potencial aplicado como a Figura 3.

A Figura 5 é um curva corrente - potencial cíclica descrita no Exemplo 1.

10 A Figura 6 é um curva corrente - potencial cíclica descrita no Exemplo 2.

A Figura 7 é um curva corrente - potencial cíclica descrita no Exemplo 3.

A Figura 8 é um curva corrente - potencial cíclica descrita no Exemplo 4.

15 As Figuras 9A - E ilustram as seqüências de potenciais descritas no Exemplo 5.

As Figuras 10a - b são curvas corrente - potencial cíclicas descritas no Exemplo 6.

20 A Figura 11 é uma representação gráfica de corrente versus tempo obtida no Exemplo 7.

A Figura 12 é uma representação gráfica de corrente versus tempo obtida no Exemplo 8.

DESCRIÇÃO DETALHADA DOS DESENHOS

Descrição das modalidades preferidas

25 A invenção vai ser descrita abaixo como aplicada à medida de teor de glicose de sangue integral, um método de interesse comercial. No entanto, o método da invenção tem outras aplicações nas quais outros analitos, tais como co-

lesterol, uréia, creatinina e creatina, são encontrados em fluidos biológicos, tais como urina, saliva e fluido intersticial, e quando soluções de controle são usadas para checar a precisão de medidores eletroquímicos.

5 Biossensores eletroquímicos

A presente invenção não é limitada a um projeto de biossensor particular entre os muitos que foram descritos na técnica. Um exemplo de um biossensor, que pode ser usado, é descrito na patente U.S. 6.531.040, que é ilustrada nas Fi-
10 guras 1 e 2.

O biossensor 10 é mostrado em uma vista detalhada na Figura 1. Compreende uma base isolante 12, na qual se imprime em seqüência (tipicamente por técnicas de impressão em tela), um modelo de condutor elétrico 14, um modelo de eletrodo (partes 16 e 18), um modelo isolante (dielétrico) 20 e
15 uma camada de reação 22, e completada por uma camada de cobertura 28. O capilar 30, formado entre a camada de cobertura 28 e a camada de reagente 22, proporciona um caminho de escoamento para a amostra de teste fluida. O biossensor é
20 mostrado na Figura 2, na qual todos os elementos na base são mostrados no mesmo plano.

A função da camada de reação 22 é promover uma reação química com glicose, ou outro analito na amostra de teste fluida, e produzir uma corrente elétrica, que é medida
25 e correlacionada com a proporção do analito presente. A camada de reação 22 contém tipicamente uma enzima ou enzimas e um acceptor de elétrons. A enzima reage com o analito para produzir elétrons, que são transportados para a superfície

do eletrodo de trabalho por um acceptor de elétrons. O acceptor de elétrons, também referido como um mediador, que tem sua resposta reduzida à reação entre o analito e a enzima. A enzima na camada de reação pode ser combinada com um polímero hidrofílico, tal como poli (óxido de etileno). Uma enzima, que pode ser usada para reagir com glicose, é glicose oxidase, e o mediador pode ser um sal de ferricianeto, usado com um tampão mantendo um pH de cerca de 5 - 7. Outra enzima, que pode ser usada, é glicose desidrogenase, juntamente com um co-fator, tal como pirroloquinolina quinona (PQQ), usado com um tampão mantendo um pH de cerca de 6 - 8.

As duas partes 16, 18 do modelo do eletrodo proporcionam os respectivos eletrodo de trabalho e contra-eletrodo, necessários para a determinação eletroquímica da concentração do analito. Um aspecto do projeto mostrado é que os eletrodo de trabalho e contra-eletrodo são configurados de modo que a grande parte do contra-eletrodo seja localizada a jusante (em termos da direção de escoamento de fluido ao longo do caminho de escoamento), a partir da parte exposta do eletrodo de trabalho 16a.

O sub-elemento contra-eletrodo 18a, no entanto, é posicionado a montante do elemento superior eletrodo de trabalho 16a, de modo que, quando uma quantidade da amostra de fluido de teste (por exemplo, uma amostra de sangue integral), inadequada para cobrir completamente o eletrodo de trabalho, entra no espaço capilar, uma conexão elétrica se forma entre o sub-elemento contra-eletrodo 18a e a parte exposta do eletrodo de trabalho 16a, devido à condutividade da

te nesse tipo de determinação eletroquímica, porque a corrente medida depende não apenas da concentração do analito e da área da camada de reação 22, mas também da área do eletrodo de trabalho 16a, que é exposta à amostra de teste contendo analito.

Uma camada dielétrica típica 20 compreende um monômero, oligômero ou polímero modificado com acrilato curado por UV, e é de uma espessura de cerca de 10 μm (0,0004'). A camada dielétrica também pode ser curável por umidade ou curável termicamente. Uma tampa ou cobertura 28 é adaptada para conformar-se com a base, para formar um espaço para receber a amostra de teste de fluido, no qual os eletrodo de trabalho e contra-eletrodo estão situados. A tampa 28 proporciona um espaço côncavo 30, e é formada tipicamente por estampagem em relevo de uma folha plana de material deformável. A tampa 28 é perfurada para proporcionar uma ventilação de ar 32 e unida à base 12 em uma operação de vedação. A tampa e a base podem ser unidas por soldagem sônica, na qual a base 12 e a tampa 28 são primeiro alinhadas e depois comprimidas conjuntamente entre um elemento de vedação térmica vibratório ou corneta e um mordente estacionário. O contato é feito apenas com as regiões não estampadas, planas da tampa. A energia ultra-sônica de um cristal ou outro transdutor é dissipada como calor na junta polimérica, propiciando a ligação dos materiais termoplásticos. A tampa e a base estampadas também podem ser unidas por uso de um material adesivo no lado inferior da tampa. O método de união da tampa e

oxidável (isto é, uma referência interna), que é oxidável apenas em voltagens mais altas do que aquelas usadas para medidas de glicose (ou outro analito). Isso significa que a um baixo potencial, adequado para oxidar inteiramente o mediador relacionado com a glicose, mas não o composto de referência interna, apenas a glicose vai ser medida. No entanto, quando o potencial é suficientemente alto para oxidar o composto de referência interna adicionado, tanto a glicose quanto o composto de referência interna vão ser oxidados. Embora a glicose seja oxidada no potencial mais alto, a medida feita a uma voltagem mais baixa já é limitada por difusão e não depende da quantidade total de glicose oxidada pela enzima. É viável, no entanto, adicionar essa espécie de referência interna a uma solução de controle e usá-la para identificar a solução como um controle e não como uma amostra biológica.

A diferença entre as correntes medidas nas voltagens alta e baixa pode ser comparada para indicar a presença da característica de referência interna da solução de controle. O Índice Diferencial (DI) seguindo os componentes de corrente relativos à glicose e ao composto de referência interna é:

$$DI = (i_{\text{alta volt.}} / i_{\text{baixa volt.}}) = [(i_{\text{ref. int}} + i_{\text{glicose}}) / i_{\text{glicose}}] = 1 + (i_{\text{ref. int}} / i_{\text{glicose}})$$

em que: $i_{\text{alta volt.}}$ é a corrente medida na voltagem mais alta e $i_{\text{baixa volt.}}$ é a corrente medida na voltagem mais baixa.

	Solução de teste		
	com Bis-Tris	sem Bis-Tris	sangue integral
B8/B4, DI (Caso II-a)	2,3	1,2	1,0
desvio padrão	0,26	0,13	0,07
% C.V.	11,6	11,0	7,0
% de variação versus referência interna	-	96	127
B8/B4, DI (Caso II-b)	1,7	0,9	0,9
desvio padrão	0,09	0,03	0,03
% C.V.	5,5	3,9	3,1
% de variação versus referência interna	-	95	78

Protocolos para teste da solução de controle

A comparação das correntes produzidas durante os períodos de queima e leitura podem ser feitas de muitos modos. Algumas seqüências de teste são ilustradas no Exemplo 5 e na Figura 9. Na alternativa mais simples, uma medida é feita no potencial necessário para oxidar o composto de referência interna, e outra medida é feita no potencial mais baixo usado para oxidar o analito. Depois, o Índice Diferencial é calculado e, com base nos resultados, o medidor eletroquímico registra que ou uma solução de controle ou que uma amostra biológica está sendo testada. De preferência, a primeira medida é feita durante a parte posterior do período de queima e a segunda durante o período de leitura, mas ambas as medidas podem ser feitas durante o período de queima

ou durante o período de leitura. O período de tempo necessário para obter leituras de corrente pode ser variado, por exemplo, entre cerca de 1 e 10 segundos. No entanto, desde que as leituras de corrente sejam suficientemente longas para representar adequadamente a presença do composto de referência interna ou a glicose, qualquer período de tempo pode ser usado.

Para confiabilidade adicional nos resultados, mais de um período pode ser usado para ambos os potenciais alto e baixo. Isto é, o potencial para oxidação da referência interna, isto é, + 600 mV para o Bis-Tris, e o potencial para oxidação de glicose, isto é, + 200 - 400 mV, podem ser aplicados mais de uma vez durante o período de queima ou o período de leitura.

É também viável aplicar potenciais que são mais altos do que os que são necessários para a oxidação do analito ou da referência interna. Isto é, se o potencial de oxidação for para o mediador de glicose é + 200 mV, por exemplo, depois um potencial de + 200 mV e o mais alto pode ser usado, com o limite sendo no potencial no qual a referência interna é oxidada.

Em uma modalidade, variações múltiplas nos potenciais aplicados são usadas para proporcionar uma indicação mais consistente nos potenciais alto e baixo. Além do mais, a alternância dos potenciais tem a vantagem de uniformizar as curvas de corrente versus tempo e aperfeiçoar a precisão. Por exemplo, o potencial aplicado pode ser alternado entre

os valores alto e baixo a cada 1 segundo, durante os períodos de queima e/ou leitura.

Processo alternativo A

Um método de distinguir uma solução de controle de
5 uma amostra biológica, durante operação de um sensor eletroquímico medindo a proporção de um analito na dita solução de controle e na dita amostra biológica, o método compreendendo os atos de:

(a) adicionar à dita solução de controle um composto de referência interna, o dito composto sendo adaptado
10 para ser oxidado eletroquimicamente a um potencial mais alto do que o potencial necessário para medir a oxidação do dito analito, o dito composto de referência interna sendo adicionado em uma proporção relativa a uma proporção predeterminada de analito na dita solução de controle, suficiente para
15 indicar a presença do dito composto de referência interna na solução de controle;

(b) introduzir a dita solução de controle contendo o dito composto de referência interna e a dita proporção
20 predeterminada do dito analito a um sensor eletroquímico, o dito sensor tendo eletrodos de trabalho e de referência, e uma camada de reação contendo os reagentes para oxidação do dito analito;

(c) pelo menos por uma vez aplicação de um potencial aos ditos eletrodos do dito sensor eletroquímico, suficiente para oxidar o dito composto de referência interna e o
25 dito analito e medir a corrente elétrica resultante;

(d) pelo menos por uma vez aplicação de um potencial ao dito sensor eletroquímico mais baixo do que o potencial de (c), o dito potencial sendo suficiente para medir a oxidação do dito analito e não suficiente para oxidar o dito composto de referência interna e medir a corrente elétrica resultante;

(e) calcular um Índice Diferencial (DI) definido como $DI = (i_{\text{alta volt.}} / i_{\text{baixa volt.}})$, em que: $i_{\text{alta volt.}}$ é a corrente medida em (c) e $i_{\text{baixa volt.}}$ é a corrente medida em (d);

10 (f) determinar que uma solução de controle está presente quando o Índice Diferencial de (e) é suficientemente maior do que 1, para distinguir o composto de referência interna da proporção predeterminada de analito; e

(g) determinar que uma amostra biológica está presente quando o Índice Diferencial de (e) é cerca de 1.

Processo alternativo B

O método do processo alternativo A, em que o dito Índice Diferencial determinado em (f) é igual ou superior a 1,5.

20 Processo alternativo C

O método do processo alternativo A, no qual o dito composto de referência interna é adicionado em uma proporção proporcional à proporção do analito na dita solução de controle.

25 Processo alternativo D

O método do processo alternativo C, no qual o dito composto de referência interna é adicionado em uma proporção de modo que o Índice Diferencial é igual ou superior a 1,5,

quando a proporção do analito é o máximo usado na dita solução de controle.

Processo alternativo E

O método do processo alternativo A, no qual o potencial de (c) é aplicado antes do potencial de (d) ser aplicado.

Processo alternativo F

O método do processo alternativo A, no qual o potencial de (d) é aplicado antes do potencial de (c).

10 Processo alternativo G

O método do processo alternativo A, no qual os potenciais de (c) e (d) são aplicados mais de uma vez.

Processo alternativo H

O método do processo alternativo A, no qual o dito analito é medido por aplicação de um primeiro potencial suficiente para oxidar o dito analito, por um primeiro período de tempo predeterminado, seguida pela aplicação de um segundo potencial insuficiente para oxidar o dito analito e inferior àquele do dito primeiro potencial, por um segundo período de tempo predeterminado, e seguida por aplicação de um terceiro potencial mais alto do que o dito segundo potencial e suficiente para oxidar o dito analito, por um terceiro período de tempo predeterminado.

Processo alternativo I

25 O método do processo alternativo H, no qual o dito potencial de (c) é aplicado durante o dito primeiro período de tempo predeterminado, e o dito potencial de (d) é aplicado durante o dito terceiro período de tempo predeterminado.

Processo alternativo J

O método do processo alternativo H, no qual ambos o dito potencial de (c) e o dito potencial de (d) são aplicados durante o dito primeiro período de tempo predeterminado.

Processo alternativo K

O método do processo alternativo H, no qual ambos o dito potencial de (c) e o dito potencial de (d) são aplicados durante o dito terceiro período de tempo.

10 Processo alternativo L

O método do processo alternativo H, no qual o dito potencial de (d) é aplicado durante o dito primeiro período de tempo predeterminado, e o dito potencial de (c) é aplicado durante o dito terceiro período de tempo predeterminado.

15 Processo alternativo M

O método do processo alternativo H, no qual os ditos potenciais de pelo menos um de (c) e (d) é aplicado mais de uma vez.

Processo alternativo N

20 O método do processo alternativo A, no qual o dito analito é glicose e a dita amostra biológica é sangue integral.

Processo alternativo O

25 O método do processo alternativo A, no qual o dito composto de referência interna é um composto organometálico oxidável, um composto de coordenação ou um composto de amina orgânica.

Processo alternativo P

O método do processo alternativo N, no qual a glicose é oxidada por glicose desidrogenase, e no qual a dita solução de controle contém um tampão capaz de manter um pH entre 6 e 8.

5 Modalidade alternativa V

Uma solução de controle para uso em teste de um sistema eletroquímico para medir a proporção de um analito em uma amostra biológica, a solução de controle compreendendo:

10 (a) uma proporção predeterminada do dito analito;
e

(b) uma proporção predeterminada de um composto de referência interna, o dito composto de referência interna sendo adaptado para ser oxidado a um potencial mais alto do que o potencial requerido para oxidar o dito analito, a dita
15 proporção predeterminada do dito composto de referência interna sendo proporcional à dita proporção predeterminada de analito, de modo que a presença do dito composto de referência interna é detectável.

20 Modalidade alternativa W

A solução de controle da modalidade alternativa V, na qual o dito analito é glicose e a dita amostra biológica é sangue integral.

Modalidade alternativa X

25 A solução de controle da modalidade alternativa W, na qual o dito composto de referência interna é um composto organometálico oxidável, um composto de coordenação ou um composto de amina orgânica.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de distinguir uma solução de controle de uma amostra biológica, durante operação de um sensor eletroquímico medindo a proporção de um analito na dita solução de controle e na dita amostra biológica, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende os atos de:

(a) adicionar à dita solução de controle um composto de referência interna, o dito composto sendo adaptado para ser oxidado eletroquimicamente a um potencial mais alto do que o potencial necessário para medir a oxidação do dito analito, o dito composto de referência interna sendo adicionado em uma proporção relativa a uma proporção predeterminada de analito na dita solução de controle, suficiente para indicar a presença do dito composto de referência interna na solução de controle;

(b) introduzir a dita solução de controle contendo o dito composto de referência interna e a dita proporção predeterminada do dito analito a um sensor eletroquímico, o dito sensor tendo eletrodos de trabalho e de referência, e uma camada de reação contendo os reagentes para oxidação do dito analito;

(c) pelo menos por uma vez aplicação de um potencial aos ditos eletrodos do dito sensor eletroquímico, suficiente para oxidar o dito composto de referência interna e o dito analito e medir a corrente elétrica resultante;

(d) pelo menos por uma vez aplicação de um potencial ao dito sensor eletroquímico mais baixo do que o potencial de (c), o dito potencial sendo suficiente para medir a

oxidação do dito analito e não suficiente para oxidar o dito composto de referência interna e medir a corrente elétrica resultante;

(e) calcular um Índice Diferencial (DI) definido
5 como $DI = (i_{\text{alta volt.}} / i_{\text{baixa volt.}})$, em que: $i_{\text{alta volt.}}$ é a corrente medida em (c) e $i_{\text{baixa volt.}}$ é a corrente medida em (d);

(f) determinar que uma solução de controle está presente quando o Índice Diferencial de (e) é suficientemente maior do que 1, para distinguir o composto de referência
10 interna da proporção predeterminada de analito; e

(g) determinar que uma amostra biológica está presente quando o Índice Diferencial de (e) é cerca de 1.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito Índice Diferencial determinado em (f) é igual ou superior a 1,5.
15

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito composto de referência interna é adicionado em uma quantidade proporcional à proporção do analito presente na dita solução de controle.

20 4. Método, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito composto de referência interna é adicionado em uma quantidade de modo que o Índice Diferencial é igual ou superior a 1,5, quando a quantidade do analito é o máximo usado na dita solução de controle.

25 5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o potencial de (c) é aplicado antes do potencial de (d) ser aplicado.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o potencial de (d) é aplicado antes do potencial de (c).

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, **5 CARACTERIZADO** pelo fato de que os potenciais de (c) e (d) são aplicados mais de uma vez.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito analito é medido por aplicação de um primeiro potencial suficiente para oxidar o
10 dito analito, por um primeiro período de tempo predeterminado, seguida pela aplicação de um segundo potencial insuficiente para oxidar o dito analito e inferior àquele do dito primeiro potencial, por um segundo período de tempo predeterminado, e seguida por aplicação de um terceiro potencial
15 mais alto do que o dito segundo potencial e suficiente para oxidar o dito analito, por um terceiro período de tempo predeterminado.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito potencial de (c) é aplicado durante o dito primeiro período de tempo predeterminado, e o dito potencial de (d) é aplicado durante o dito
20 terceiro período de tempo predeterminado.

10. Método, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que ambos o dito potencial de (c) e o dito potencial de (d) são aplicados durante o dito primeiro período de tempo predeterminado.
25

11. Método, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito potencial de (c) e o

dito potencial de (d) são aplicados durante o dito terceiro período de tempo.

12. Método, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito potencial de (d) é aplicado durante o dito primeiro período de tempo predeterminado, e o dito potencial de (c) é aplicado durante o dito terceiro período de tempo predeterminado.

13. Método, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os ditos potenciais de pelo menos um de (c) e (d) é aplicado mais de uma vez.

14. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito analito é glicose e a dita amostra biológica é sangue integral.

15. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito composto de referência interna é um composto organometálico oxidável, um composto de coordenação ou um composto de amina orgânica.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito composto de referência interna é o dito composto de amina orgânica, o dito composto de amina orgânica sendo ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico, ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(2-etano sulfônico), ácido 2-(hidróxi-1,1-bis (hidroximetil) etilamino) etano sulfônico, ácido 2-morfolinoetano sulfônico, bis (2-hidroxietil) amino-tris (hidroximetil) metano (Bis-Tris), 4-aminobenzonitrila, ácido 4-aminobenzóico ou 4-iodoanilina.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito composto de referência interna é Bis-Tris.

18. Método, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito composto de referência interna é o dito composto organometálico oxidável, o dito composto organometálico oxidável sendo ferroceno ou derivados de ferroceno.

19. Método, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito composto de referência interna é o dito composto de coordenação, o dito composto de coordenação sendo ferrocianeto de potássio.

20. Método, de acordo com a reivindicação 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a glicose é oxidada por glicose oxidase, e no qual a dita solução de controle contém um tampão capaz de manter um pH entre 5 e 7.

21. Método, de acordo com a reivindicação 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a glicose é oxidada por glicose desidrogenase, e no qual a dita solução de controle contém um tampão capaz de manter um pH entre 6 e 8.

22. Solução de controle para uso em teste de um sistema eletroquímico para medir a proporção de um analito em uma amostra biológica, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende:

(a) uma proporção predeterminada do dito analito;
e

(b) uma proporção predeterminada de um composto de referência interna, o dito composto de referência interna

sendo adaptado para ser oxidado a um potencial mais alto do que o potencial requerido para oxidar o dito analito, a dita proporção predeterminada do dito composto de referência interna sendo proporcional à dita proporção predeterminada de analito, de modo que a presença do dito composto de referência interna é detectável.

23. Solução de controle, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito analito é glicose e a dita amostra biológica é sangue integral.

10 24. Solução de controle, de acordo com a reivindicação 23, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito composto de referência interna é um composto organometálico oxidável, um composto de coordenação ou um composto de amina orgânica.

15 25. Solução de controle, de acordo com a reivindicação 24, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito composto de referência interna é o dito composto de referência interna é o dito composto de amina orgânica, o dito composto de amina orgânica sendo ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico, ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(2-etano sulfônico), ácido 20 do 2-(hidróxi-1,1-bis (hidroximetil) etilamino) etano sulfônico, ácido 2-morfolinoetano sulfônico, bis (2-hidroxietil) amino-tris (hidroximetil) metano (Bis-Tris), 4-aminobenzonitrila, ácido 4-aminobenzóico ou 4-iodoanilina.

25 26. Solução de controle, de acordo com a reivindicação 25, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita referência interna é Bis-Tris.

27. Solução de controle, de acordo com a reivindicação 24, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito composto de

referência interna é o dito composto organometálico oxidável, o dito composto organometálico oxidável sendo ferroceno ou derivados de ferroceno.

28. Solução de controle, de acordo com a reivindicação 24, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito composto de referência interna é o dito composto de coordenação, o dito composto de coordenação sendo ferrocianeto de potássio.

29. Solução de controle, de acordo com a reivindicação 23, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a glicose é oxidada por glicose oxidase, e um tampão é incluído para manter o pH entre 5 e 7.

30. Solução de controle, de acordo com a reivindicação 23, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a glicose é oxidada por glicose desidrogenase, e um tampão é incluído para manter o pH entre 6 e 8.

31. Composto de referência interna para adição a uma solução de controle, usada para testar um medidor eletroquímico de glicose, a dita referência interna **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende um composto químico que é oxidável a um potencial mais alto do que aquele necessário para medir a oxidação de glicose.

32. Composto de referência interna de acordo com a reivindicação 31, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a dita referência interna é oxidável a um potencial pelo menos 100 mV maior do que o potencial necessário para medir a oxidação de glicose.

33. Composto de referência interna de acordo com a reivindicação 31, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito com-

posto de referência interna é um composto organometálico oxidável, um composto de coordenação ou um composto de amina orgânica.

34. Composto de referência interna de acordo com a reivindicação 33, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito composto de referência interna é ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico, ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(2-etano sulfônico), ácido 2-(hidróxi-1,1-bis (hidroximetil) etilamino) etano sulfônico, ácido 2-morfolinoetano sulfônico, bis (2-hidroxietil) amino-tris (hidroximetil) metano (Bis-Tris), 4-aminobenzonitrila, ácido 4-aminobenzóico e 4-iodoanilina.

35. Composto de referência interna de acordo com a reivindicação 34, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito composto de referência interna é Bis-Tris.

36. Composto de referência interna de acordo com a reivindicação 33, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito composto de referência interna é o dito composto organometálico oxidável, o dito composto organometálico oxidável sendo ferroceno ou derivados de ferroceno.

37. Composto de referência interna de acordo com a reivindicação 33, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o dito composto de referência interna é o dito composto de coordenação, o dito composto de coordenação sendo ferrocianeto de potássio.

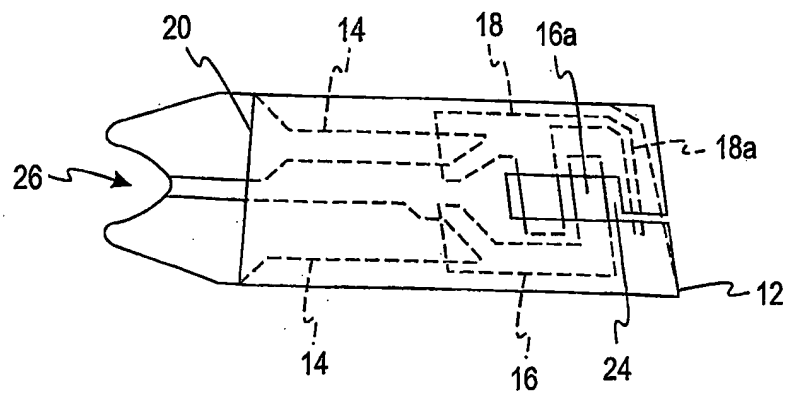
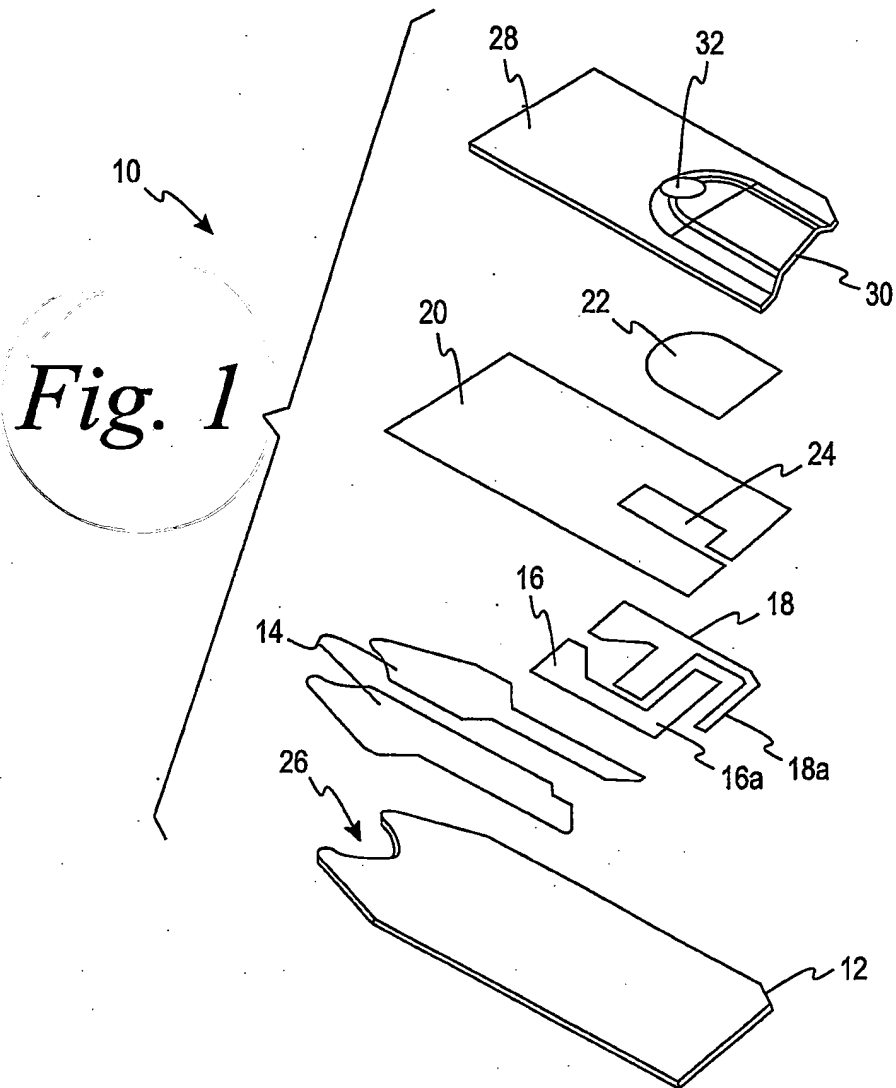
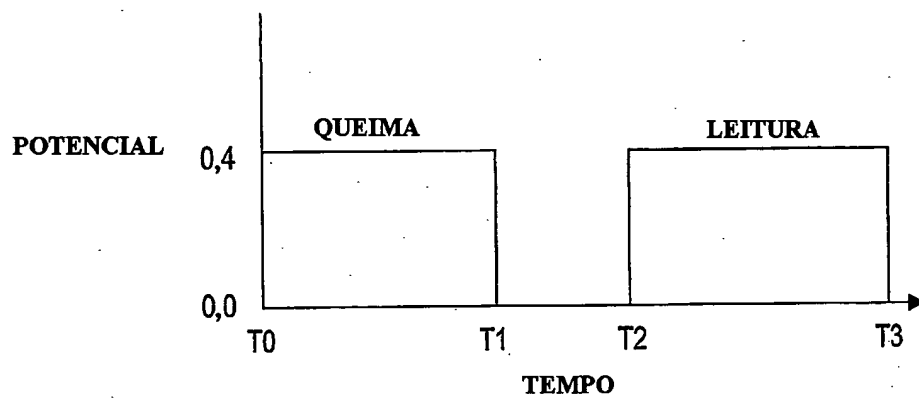
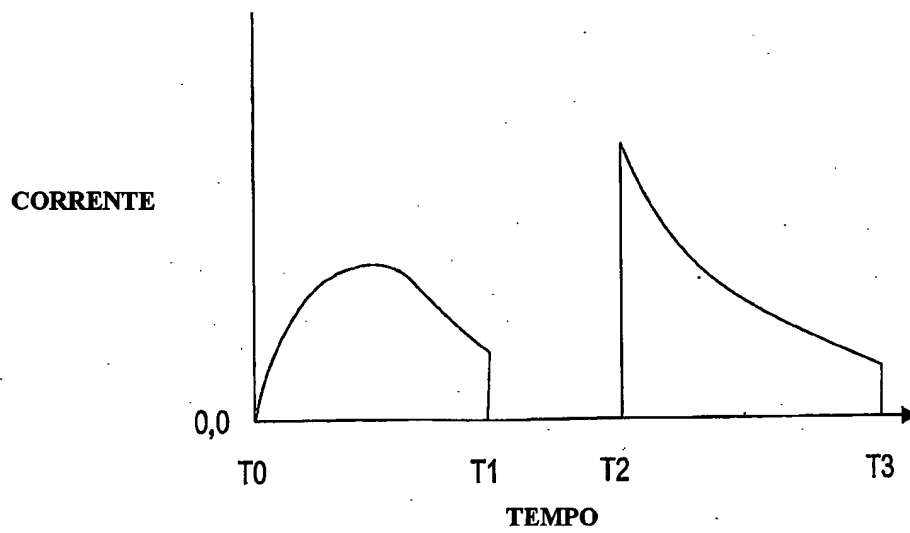


Fig. 2

*Fig. 3**Fig. 4*

VOLTAMOGRAMA CÍCLICO PARA SOLUÇÃO DE CONTROLE COM REFERÊNCIA INTERNA E SENSOR
ZP3-1 COM CONTRA / ELETRODO DE REFERÊNCIA DE Ag / AgCl (SEM REAGENTE)

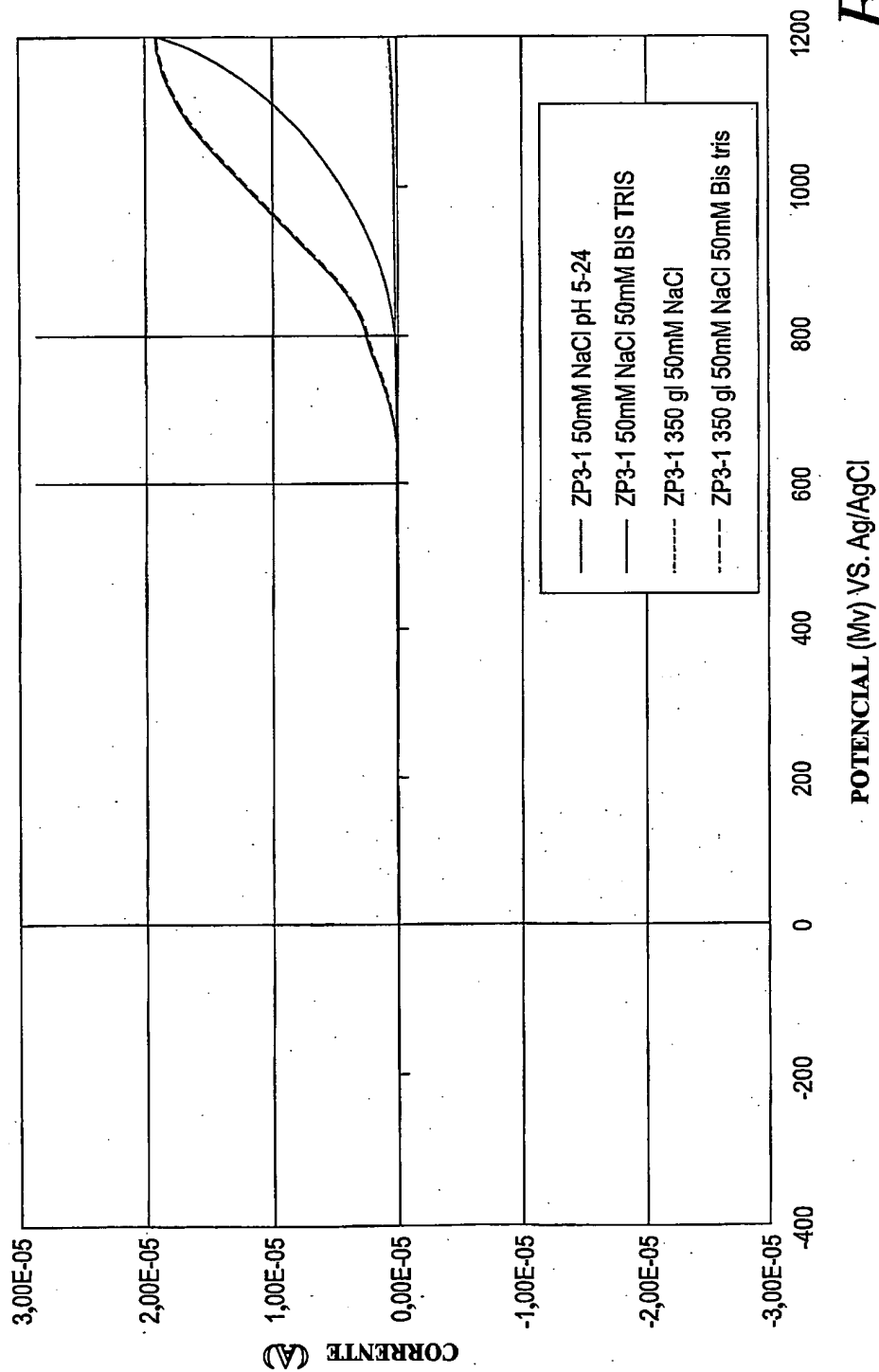


Fig. 5

VOLTAMOGRAMA CÍCLICO PARA SOLUÇÃO DE CONTROLE COM REFERÊNCIA INTERNA E
SENSOR CE1001-1 COM CONTRA REFERÊNCIA DE FERRICIANETO (SEM REAGENTE)

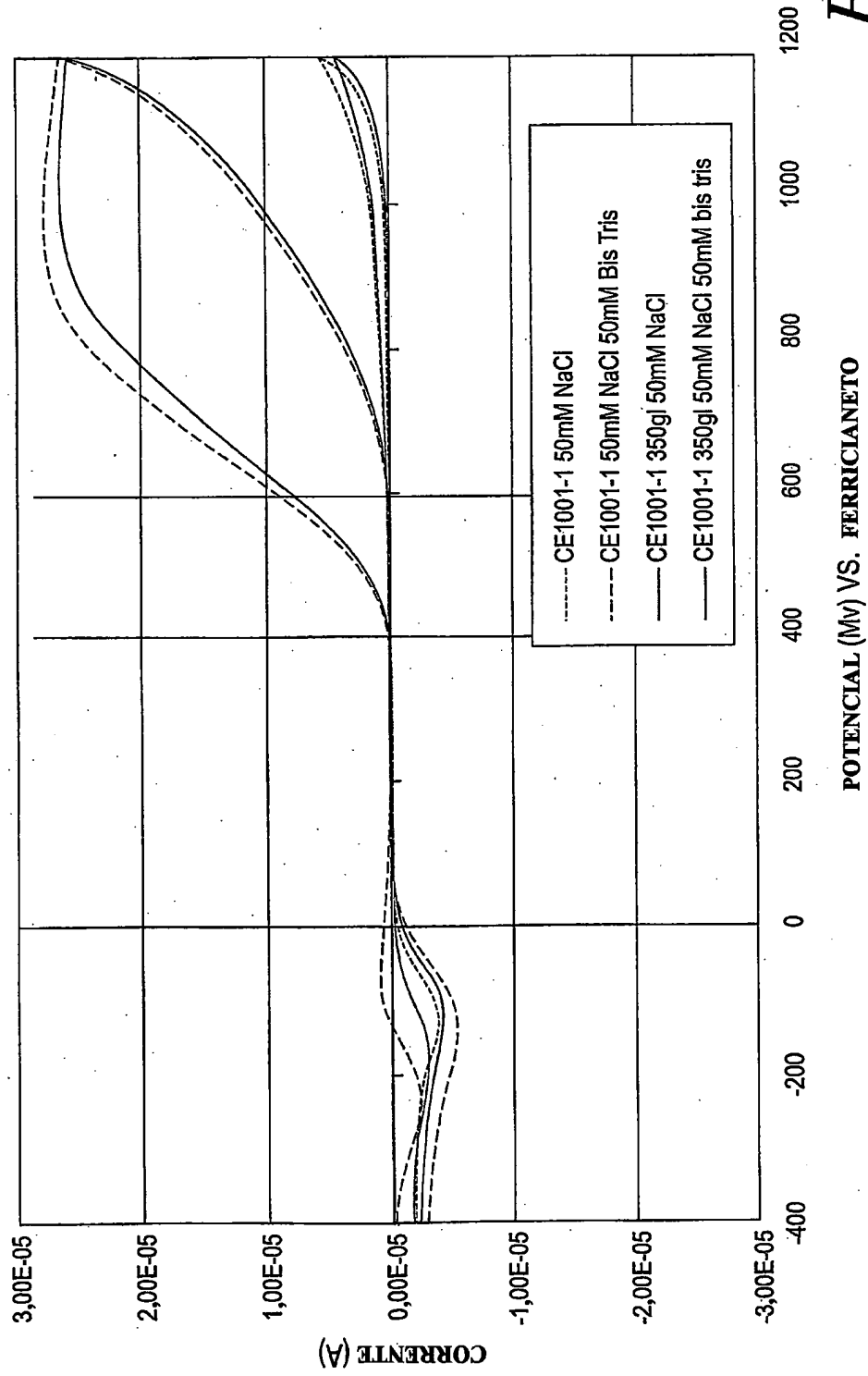


Fig. 6

VOLTAMOGRAMA CÍCLICO PARA SOLUÇÃO DE CONTROLE COM
REFERÊNCIA INTERNA E SENSOR ASCENSIA DEX LOTE A2444AA

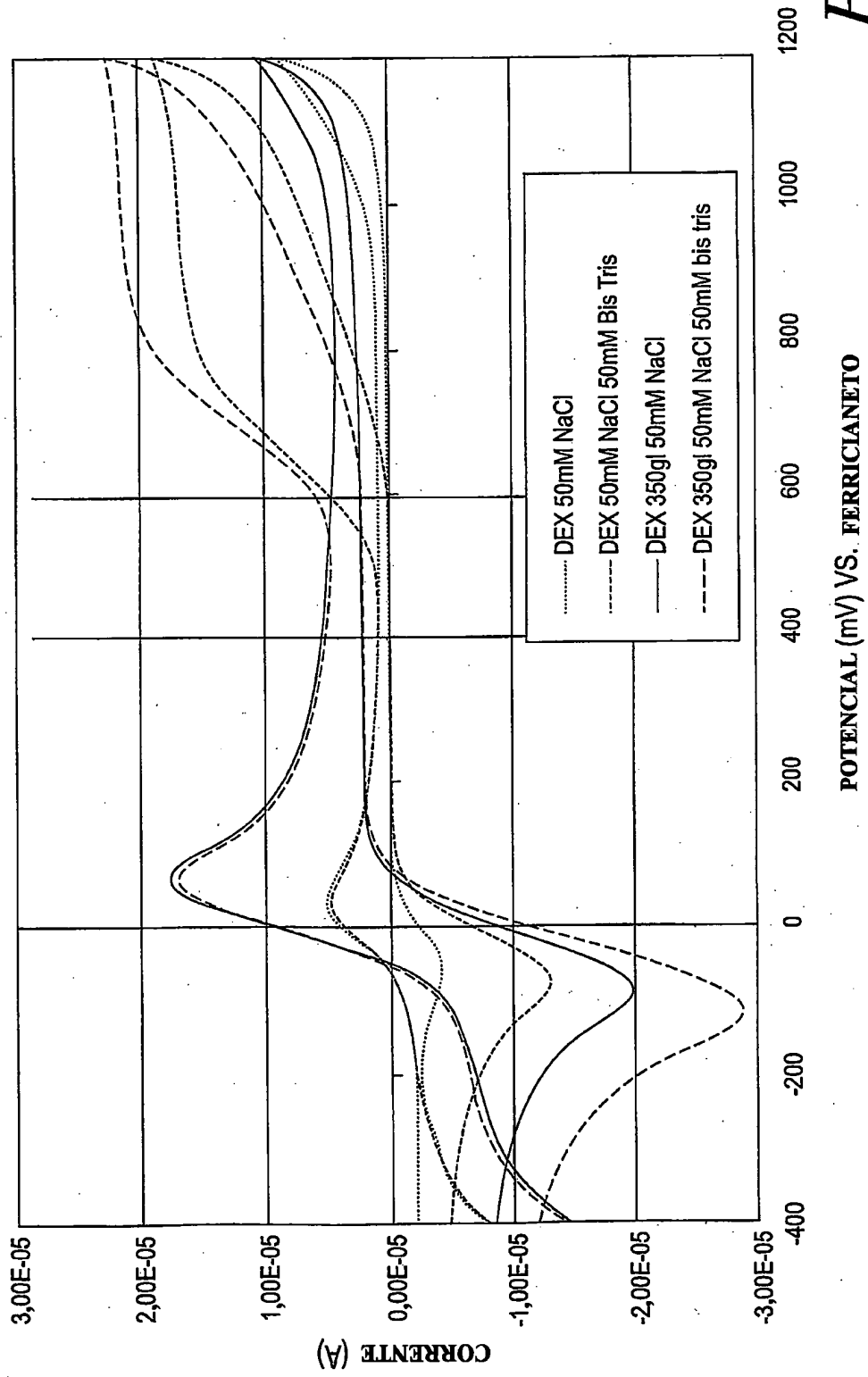


Fig. 7

VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DE ESPÉCIES OXIDÁVEIS

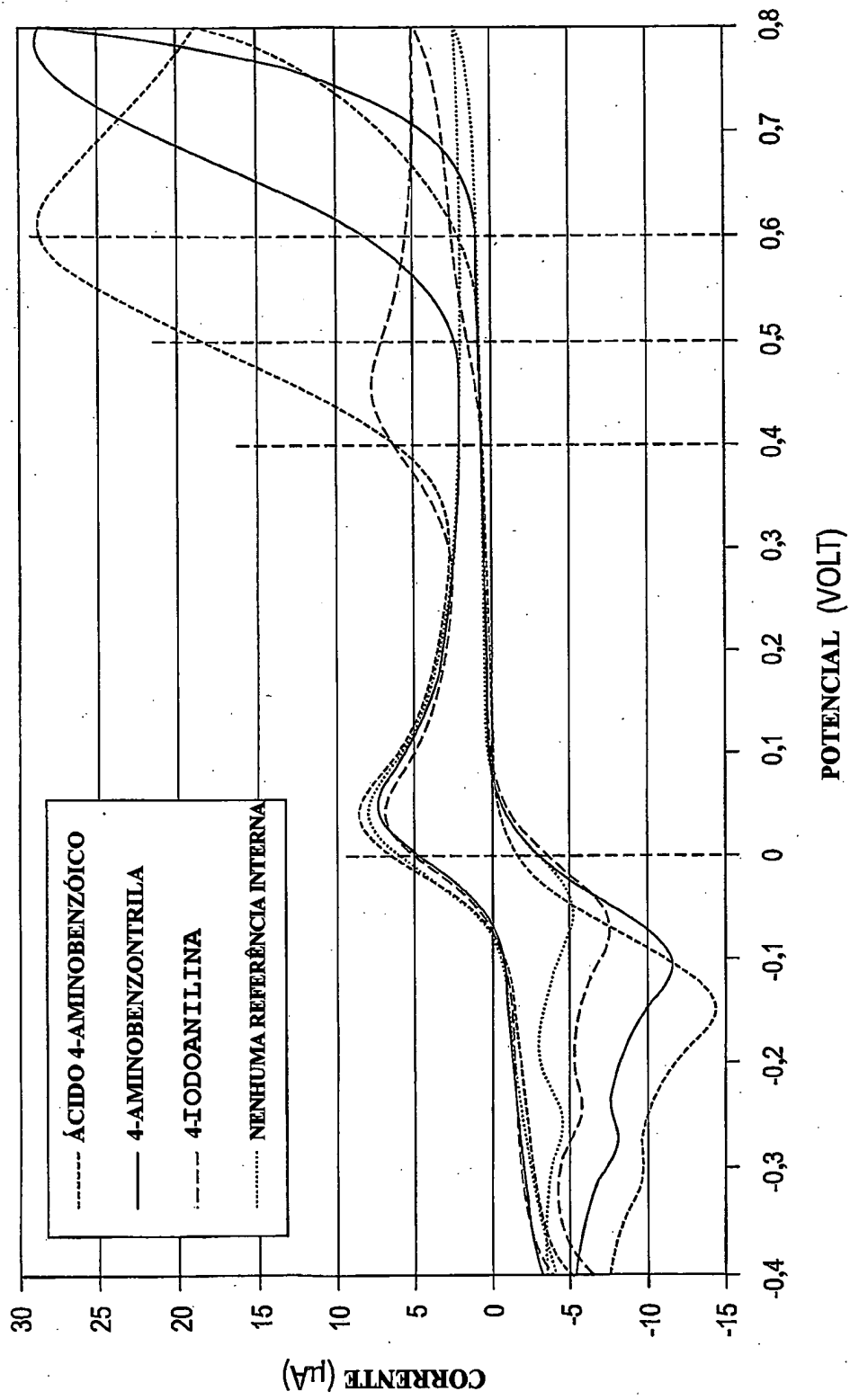


Fig. 8

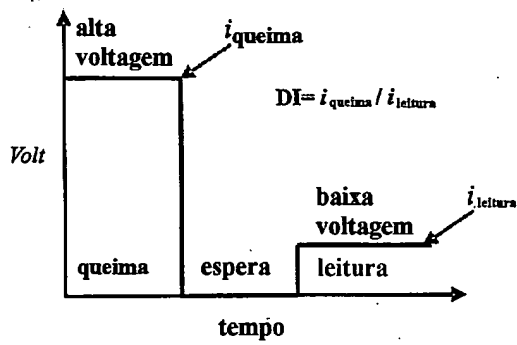


Fig. 9a

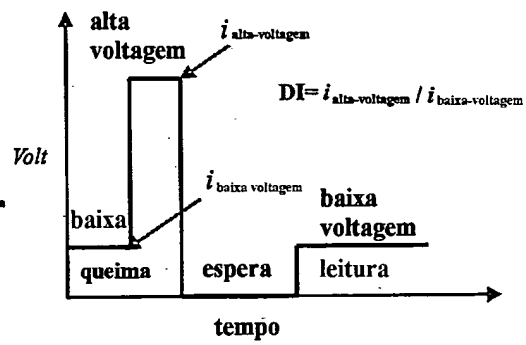


Fig. 9b

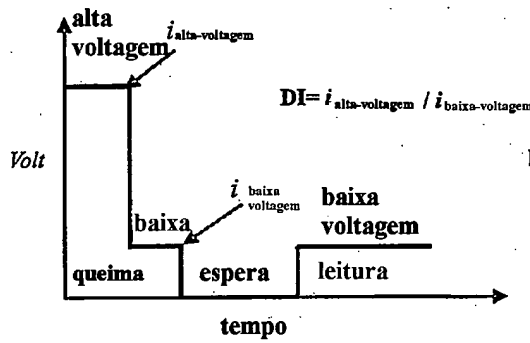


Fig. 9c

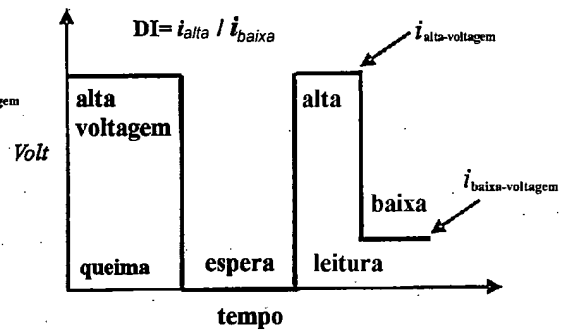


Fig. 9d

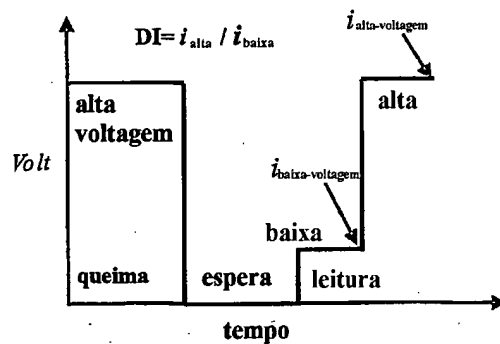


Fig. 9e

VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DE REFERÊNCIA INTERNA, SEM GLICOSE

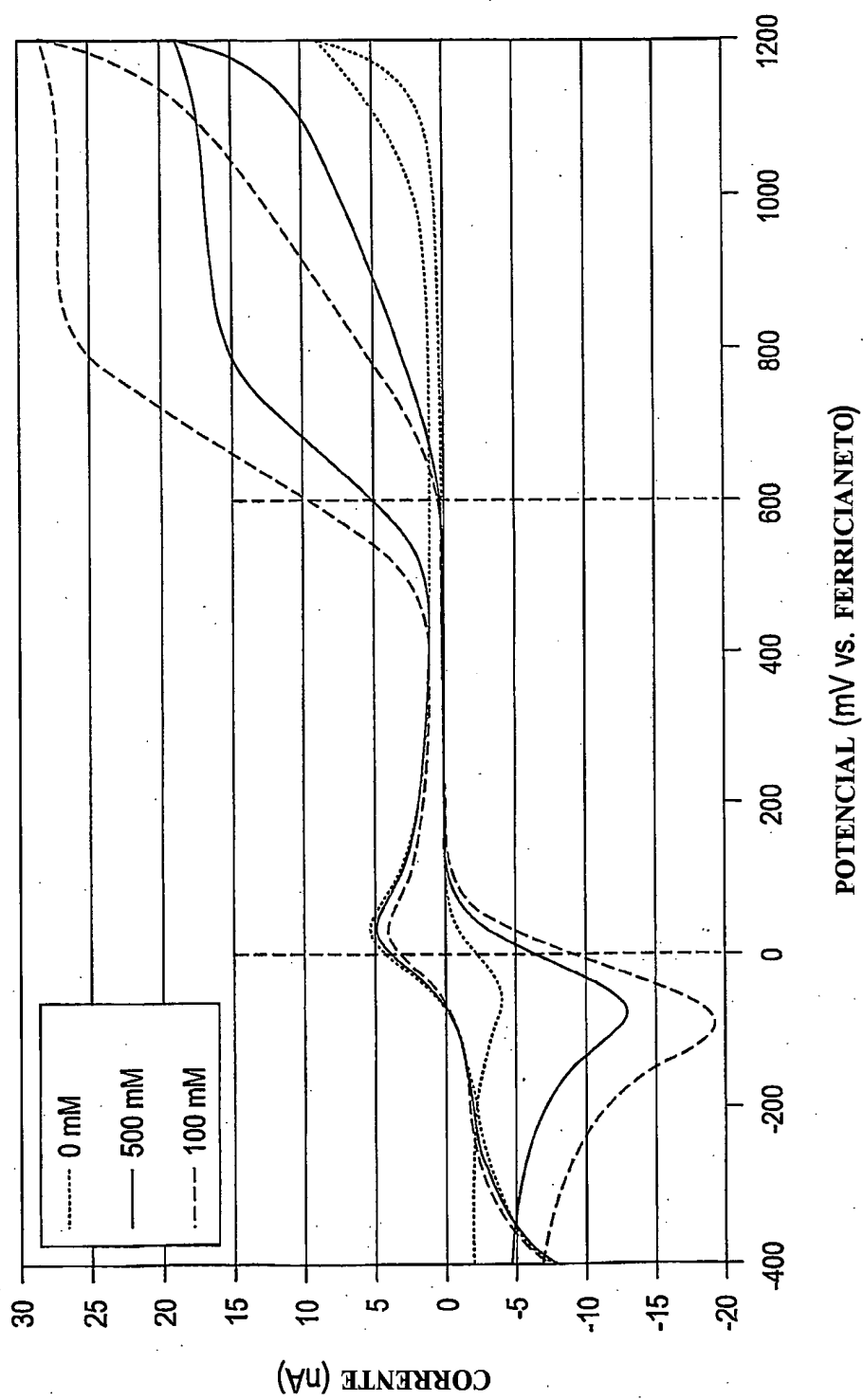
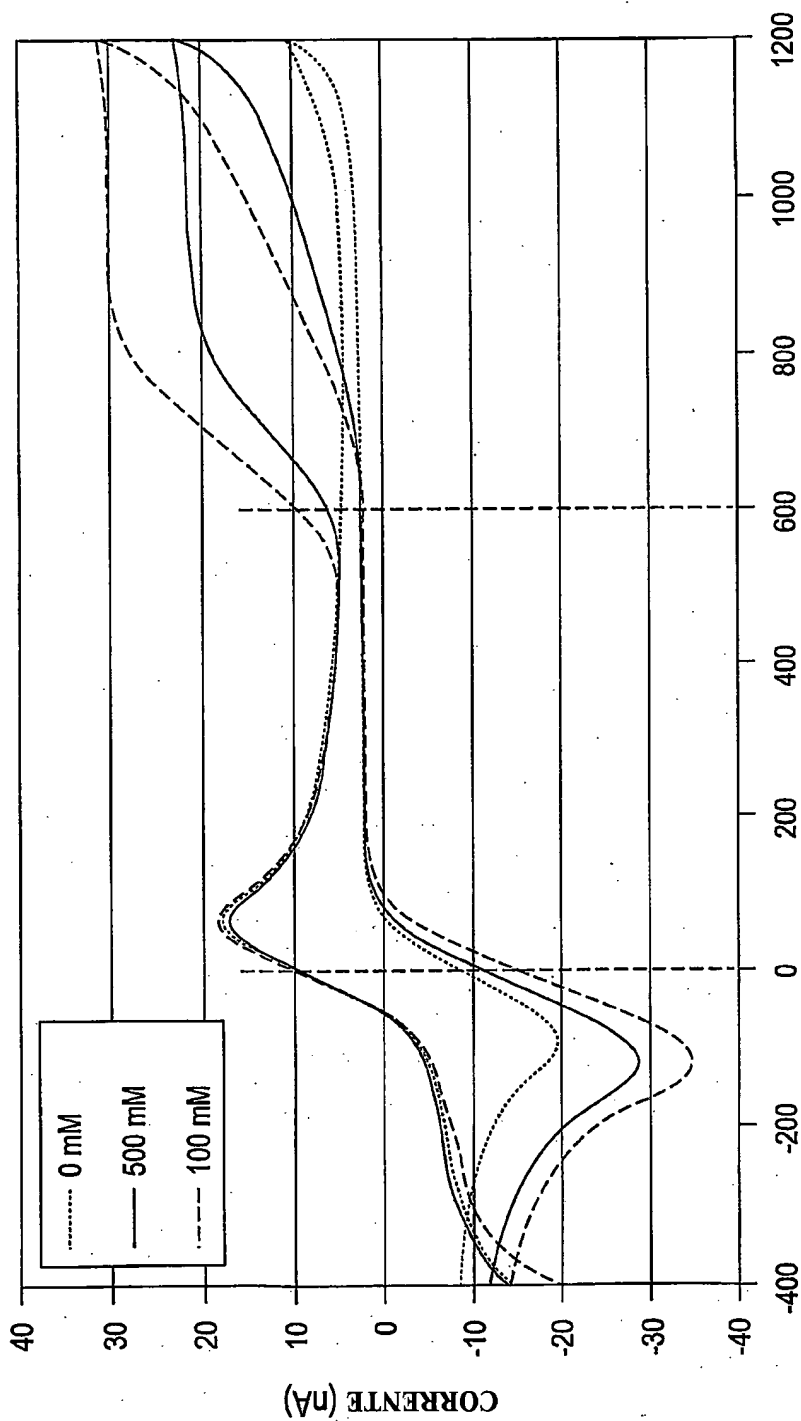


Fig. 10a

VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DE REFERÊNCIA INTERNA, 350 mg/dL de GLICOSE



POTENCIAL (mV vs. FERRICIANETO)

Fig. 10b

SOLUÇÃO DE CONTROLE, 0 mg/dL DE GLICOSE

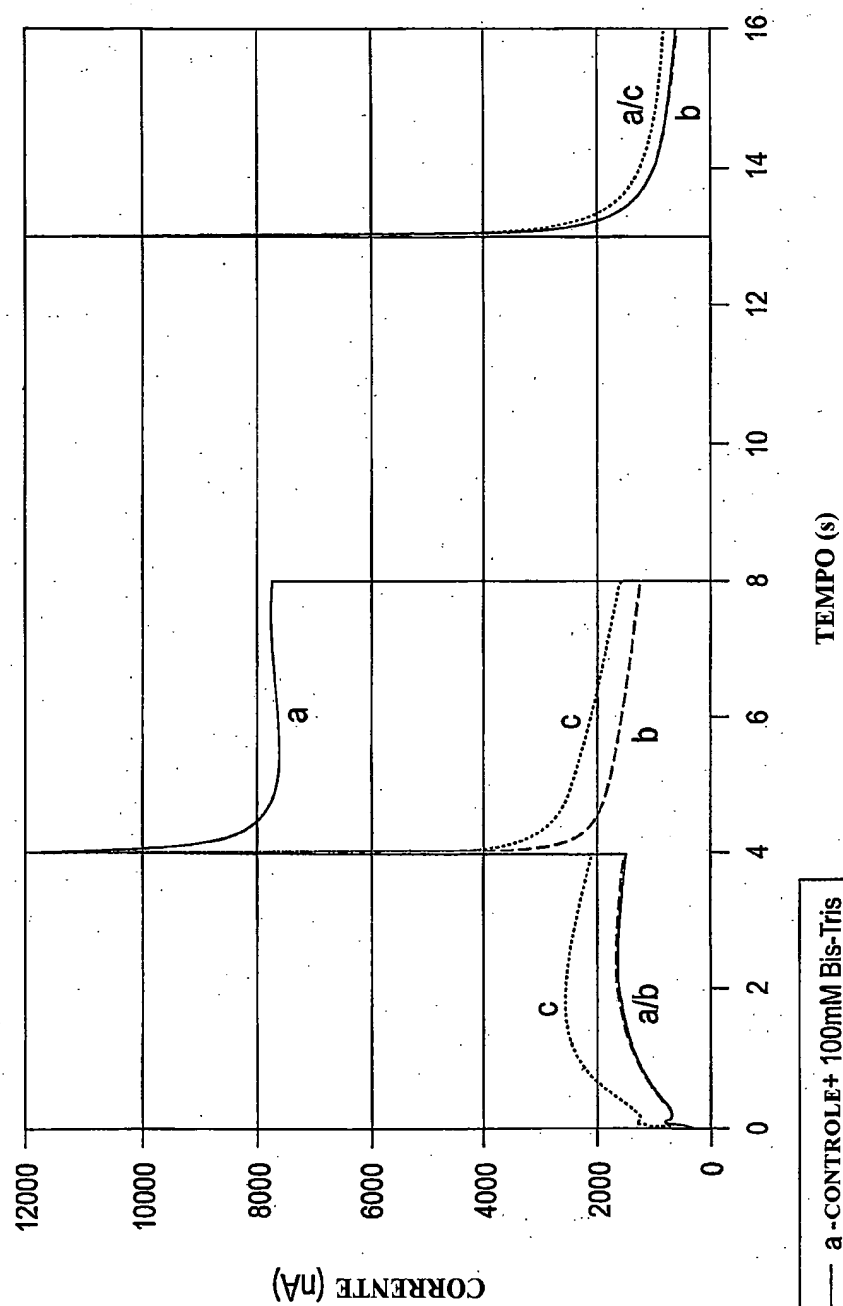


Fig. 11

SOLUÇÃO DE CONTROLE, ALTO TEOR DE GLICOSE

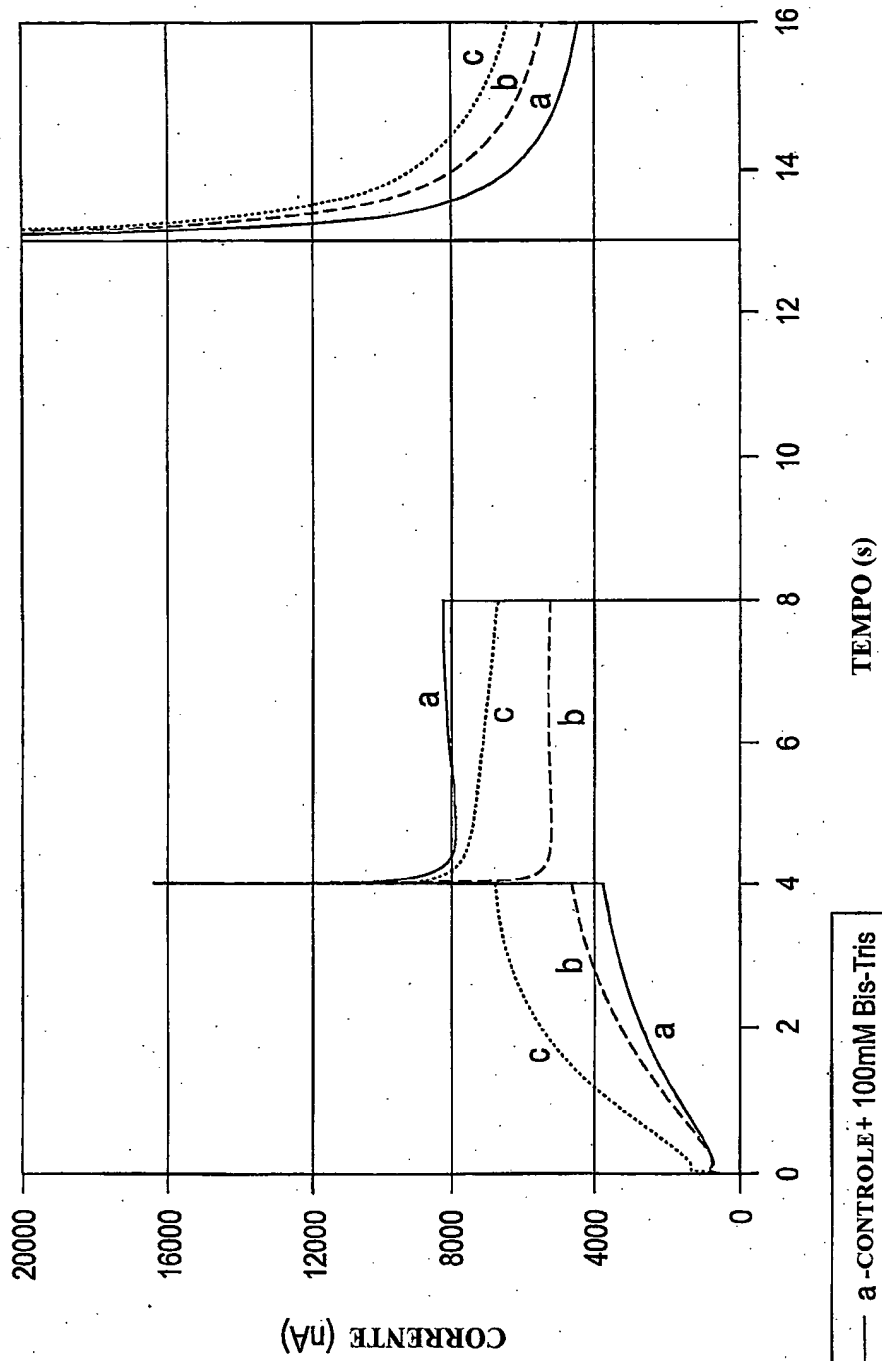


Fig. 12

RESUMO

"ESPÉCIES OXIDÁVEIS COMO UMA REFERÊNCIA INTERNA EM
SOLUÇÕES DE CONTROLE PARA BIOSSENSORES"

O teste do desempenho de um medidor eletroquímico,
5 usado para medir a presença de um analito em uma amostra bi-
ológica, particularmente, glicose em sangue integral, inclui
a introdução de uma solução de controle contendo uma propor-
ção predeterminada do analito e uma proporção predeterminada
de um composto de referência interna. O composto de referên-
10 cia interna é selecionado de modo que seja oxidado a um po-
tencial superior do que aquele usado para oxidar o analito,
possibilitando distinguir a solução de controle de uma amos-
tra biológica.