

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

(21) **PI0621544-0 A2**

(22) Data de Depósito: 18/04/2006
(43) Data da Publicação: 13/12/2011
(RPI 2136)



(51) *Int.Cl.:*
G01N 27/327

(54) Título: BIOSSENSORES PARA MENSURAÇÃO DE PRODUTO DE ANÁLISE EM FLUIDO E DE NÍVEIS DE GLICOSE NO SANGUE E RESPECTIVO MÉTODO DE PRODUÇÃO

(73) Titular(es): Home Doagnostics, Inc

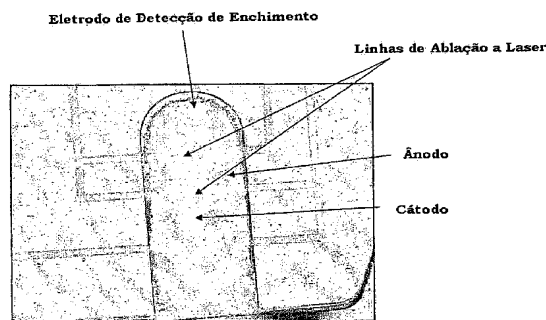
(72) Inventor(es): Dennis Slomski, Natasha Popovich

(74) Procurador(es): Hugo Silva, Rosa & Maldonado-Prop. Int

(86) Pedido Internacional: PCT US2006014753 de 18/04/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/120149de 25/10/2007

(57) Resumo: BIOSSENSORES PARA MENSURAÇÃO DE PRODUTO DE ANÁLISE EM FLUIDO E DE NÍVEIS DE GLICOSE NO SANGUE E RESPECTIVO MÉTODO DE PRODUÇÃO. É aqui revelado um biossensor para medir produto de análise num fluido que compreende uma camada de substrato tendo disposto sobre ela pelo menos um dentre cada um de um eletrodo, um cátodo, um ânodo e um material espaçador inovativo. O material espaçador de acordo com a presente revelação compreende uma camada orgânica vedável pelo calor que cobre pelo menos uma parte do ânodo e define pelo menos uma extremidade do ânodo, em que o material espaçador tem pelo menos um orifício perfurado através dele e define uma cavidade ou poço para aceitar produto químico. Também é revelado um método de fazer esses biossensores.



**Imagem Ótica de um Biossensor
de Acordo com a Presente Revelação**

**Sensores Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido****e de Níveis de Glicose no Sangue****e Respectivo Método de Produção”****Relatório Descritivo**

5 A presente revelação relaciona-se com biossensores para medir um produto de análise num fluido corpóreo, atl como sangue, em que o biossensor compreende um material espaçador orgânico vedável a quente que define particularmente pelo menos uma extremidade de um
10 elétrodo operacional disposto no biossensor. A presente revelação também se relaciona com métodos de produzir o biossensor e métodos de medição de produtos de análise em fluido corpóreo usando o biossensor.

 Os sensores eletroquímicos têm sido usados desde há longo tempo para detectar e/ou medir a presença de produtos de análise
15 numa amostra fluida. No sentido mais básico, os sensores eletroquímicos compreendem uma mistura de reativo contendo pelo menos um agente de transferência de elétrons (também chamado de um “mediador de elétrons”) e uma proteína biocatalítica específica de produtos de análise e um ou mais elétrodos. Esses sensores contam com a transfe-
20 rência de elétrons entre o mediador de elétrons e as superfícies de elétrodo e funcionam medindo reações redox eletroquímicas. Quando usadas num sistema ou dispositivo de biossensores eletroquímicos, as reações de transferência de elétrons são transformadas num sinal elétrico que se correlaciona com a concentração do produto de análise
25 sendo medido na amostra fluida.

 Os sensores de glicose eletroquímicos são baseados em medições da corrente resultante a partir da oxidação de uma forma reduzida do mediador, gerada por reações entre a molécula de glicose,

uma oxidoreductase e a forma oxidada do mediador. O sinal medido num sensor de glicose é diretamente proporcional à área do ânodo; conseqüentemente, a precisão de um dispositivo/teste de glicose do sangue pode ser diretamente correlacionada com a definição de área de ânodo e controle. Se as extremidades de um eletrodo forem irregulares e variam de meio para meio, a área do eletrodo e, portanto, a medição também variará de meio para meio. Por estas razões, as extremidades do eletrodo são um fator importante para o desenvolvimento de biossensores mais precisos com extremidades lisas sendo desejáveis para assegurar a precisão e exatidão da medida.

Além da precisão melhorada, a resolução espacial do eletrodo é importante porque quanto menor a área de superfície do eletrodo, menor o volume de amostra exigido. Isto é desejável, por exemplo, com a monitoração de glicose para diabéticos, em que o paciente deve testar a sua glicose no sangue múltiplas vezes ao dia. Os requisitos de menor volume de sangue permitem que o paciente obtenha sangue a partir de áreas com densidades capilares mais baixas do que os dedos, tais como o braço e antebraço superiores, que são menos dolorosos de lancetar.

Um método atualmente usado para o fabrico de biossensores é a impressão de tela. A impressão de tela envolve colocar uma tela de malha com um padrão de eletrodo sobre um substrato e, então, espalhar uma pasta eletroativa sobre a tela. Como a impressão de tela envolve extrudir a pasta através da tela sobre o substrato, é difícil obter padrões de eletrodo com pequena resolução e extremidades lisas. Por exemplo, no ânodo de sensores de glicose de tela impressa tradicional, a área é definida por extremidades da tinta de carbono de eletrodo e tinta dielétrica. Além disso, uma camada adicional é tipicamente necessária para formar o poço da amostra e, em muitos casos, esta camada é também uma tinta dielétrica de tela impressa. Com a tecnologia atual de impressão de tela, uma camada dielétrica é necessária para definir o

ânodo. Portanto, a área do ânodo e, deste modo, a precisão do biossensor resultante é uma função do método de deposição da camada dielétrica, assim como também a química desta camada.

Ligado à necessidade de melhor definir a área do ânodo, é um desejo simplificar as etapas de fabrico da nova geração de biossensores, a fim de proporcionar um processo mais robusto, elevados rendimentos de produção e sensores de alta qualidade. Novos materiais estão sendo explorados que poderiam ser benéficos para atingir esta meta.

Para resolver os problemas precedentes, os Inventores desenvolveram um método único de definir a área de ânodo de um biossensor utilizando um material espaçador vedável pelo calor para definir com precisão uma ou mais extremidades do ânodo em vez de uma camada dielétrica. Os Inventores apuraram que este método é particularmente útil quando usado com uma técnica de ablação a laser. Com a técnica de ablação a laser, um material eletroativo, tal como o ouro é estalado (sputtered) num filme fino sobre um substrato. Um laser, então, localiza através do substrato e faz a ablação do material eletroativo, deixando um padrão de elétrodo no substrato. Esta técnica produz elétrodos de melhor resolução e de extremidades mais lisas do que com a impressão de tela. Além de melhorar muito a precisão e a reprodutibilidade da área de ânodo, o método de fabrico do biossensor é mais simples do que o processo atual, visto que não mais exige depositar uma camada dielétrica separada.

Sumário da Invenção

São aqui revelados biossensores eletroquímicos para medir produtos de análise, tais como glicose, colesterol, lactato, ácido acetocético (corpos de cetona), teofilina e hemoglobina A1c num fluido. Os biossensores inventivos compreendem uma camada de substrato

compreendendo: pelo menos um eletrodo; pelo menos um cátodo; pelo menos um ânodo; e pelo menos um material espaçador. Numa modalidade, o material espaçador compreende uma camada orgânica vedável pelo calor que ative acima de 85°C. Por exemplo, o filme orgânico vedável pelo calor pode compreender um filme contendo poliéster, tal como tereftalato de polietileno (PET) com uma camada de poliolefina disposta sobre ele.

Qualquer que seja a composição do material espaçador, tipicamente tem pelo menos uma abertura perfurada através dele e cobre pelo menos uma parte do eletrodo operacional, tal como o ânodo. A abertura perfurada define pelo menos uma extremidade do ânodo e tipicamente duas extremidades opostas. As restantes duas extremidades opostas são tipicamente definidas por linhas de ablação a laser e, deste modo, têm também excelente qualidade de extremidade.

Além de definir as extremidades do ânodo, uma vez que é aplicada ao substrato, a abertura perfurada pelo material espaçador define uma cavidade ou poço suficiente para aceitar a química depositada nos biossensores aglomerados.

Também é aqui revelado um método de produzir o biossensor descrito. Numa modalidade, o método compreende depositar um material eletroativo sobre um substrato para formar um substrato revestido. O material eletroativo pode compreender um material condutor ou semicondutor. Os padrões são a seguir formados na camada de substrato coberto por ablação do material eletroativo com um laser. Esses padrões formam um conjunto ordenado de eletrodos compreendendo pelo menos um eletrodo, um cátodo e um ânodo.

Depois de ser formado conjunto ordenado de eletrodos, o material espaçador é aplicado sobre o substrato, de tal modo que cobre pelo menos uma parte do conjunto ordenado. Conforme mencionado, o

material espaçador tem pelo menos uma abertura que é perfurada antes de ser depositada sobre o substrato. A abertura através do material espaçador é posicionada de modo a assegurar que cubra pelo menos uma parte do ânodo e define pelo menos uma extremidade do ânodo.

Uma vez aplicado, o filme espaçador é laminado sobre o substrato aplicando calor e pressão em condições suficientes para formar uma vedação com o conjunto ordenado de elétrodos e substrato, formando, deste modo, um biossensor aglomerado. A seguir, a química pode ser depositada dentro da cavidade ou poço definido pelo material espaçador. Uma vez que a química seque, é aplicada uma cobertura sobre as cavidades de amostra para formar intervalos capilares para os quais a amostra de sangue é puxada.

Deve ser entendido que tanto a descrição geral precedente como a descrição detalhada seguinte são apenas exemplificativas e explicativas e não são restritivas da invenção, conforme reivindicada.

Os desenhos anexos, que são incorporados e constituem parte deste Relatório Descritivo, ilustram várias modalidades da invenção e, em conjunto com a descrição, servem para explicar os princípios da invenção.

Breve Descrição dos Desenhos

A **Figura 1** é uma imagem óptica de um biossensor (sem cobertura) de acordo com a presente revelação.

A **Figura 2** é uma imagem SEM de uma exibição de um espaçador perfurado que mostra excelente definição de extremidades e nenhuma extrusão adesiva.

A **Figura 3** são imagens CMM ópticas de uma exibição de

espaçador perfurado mostrando excelente definição (a) circular e (b) de extremidade reta e nenhuma extrusão adesiva.

A Figura 4 são imagens SEM de uma exibição de um espaçador perfurado mostrando excelente definição de extremidade e
5 nenhuma extrusão adesiva.

A Figura 5 é um histograma de um teste de cronoamperometria mostrando um coeficiente de variação (%CV) de 0,85.

A Figura 6 são varreduras de perfilometria através da parte superior do material espaçador perfurado laminado sobre o substrato
10 contendo eletrodo.

De acordo com a presente revelação são aqui proporcionados biossensores eletroquímicos desenvolvidos para medir um produto de análise numa amostra de fluido não homogêneo, tal como um fluido corpóreo escolhido a partir do sangue, urina, saliva e lágrimas. O
15 biossensor inclui pelo menos um ou mais eletrodos e um sistema de reativos de reação compreendendo um mediador de elétrons e uma enzima de oxidação-redução específica para o produto de análise a ser mensurado.

O biossensor pode compreender uma camada de substrato
20 que inclui pelo menos um eletrodo, pelo menos um cátodo, pelo menos um ânodo e pelo menos um material espaçador. Numa modalidade, o biossensor compreende dois eletrodos de detecção de enchimento, um ânodo e um cátodo.

O material espaçador compreende tipicamente uma camada
25 orgânica vedável pelo calor que cobre pelo menos uma parte do ânodo, de tal forma que define pelo menos uma extremidade do ânodo. A camada orgânica vedável pelo calor pode cobrir ainda uma parte do eletrodo ou cátodo ou uma parte tanto do eletrodo como do cátodo.

A camada vedável pelo calor compreende um polímero que tipicamente ativa em ou acima de 85°C. Por exemplo, a camada orgânica vedável pelo calor pode compreender um filme contendo poliéster, tal como tereftalato de polietileno (PET), com uma camada de poliolefina disposta sobre ela. A camada de poliolefina pode ser disposta sobre o PET por um processo de co-extrusão ou pode ser depositada via uma técnica de pulverização.

Em certas modalidades, o material espaçador tem pelo menos um orifício perfurado através dele, em que o orifício define um poço quando colocado sobre o substrato. Em várias modalidades, o orifício pode ser perfurado com qualquer configuração ou perfurado múltiplas vezes dependendo da forma e/ou tamanho pretendidos. Por exemplo, conforme mostrado nas Figuras 2-4, o material espaçador perfurado de acordo com a presente revelação exibe excelente definição de extremidades sem nenhuma extrusão adesiva, se forem perfurados padrões retos ou circulares através dele.

O biossensor pode também compreender um sistema de reativos de reação localizado no poço. Tipicamente em sensores eletroquímicos, o sistema de reativos de reação compreende um mediador de elétrons e uma enzima de oxidação-redução específica para o produto de análise.

Numa modalidade, a camada vedável pelo calor define duas de quatro extremidades do ânodo. Nesta modalidade, as duas extremidades restantes do ânodo podem ser definidas pelas linhas retiradas por ablação na camada de substrato por um laser. A Figura 1 mostra padrões das linhas que são cauterizadas no substrato durante a fabricação do sensor. Nesta modalidade, as linhas paralelas horizontais definem duas extremidades opostas de um ânodo.

Um processo exemplificativo é a escrita direta de eletrodos

(deposição a laser) como descrito no pedido de patente provisório comumente cedido, co-pendente 60/716,120 "*Biosensor with Direct Written Electrode*", depositado em 13 de setembro de 2005, cuja revelação é por este meio aqui incorporada por referência na sua totalidade.

5 Em razão da importância da definição da extremidade de ânodo, o material espaçador deve satisfazer pelo menos um dos seguintes requisitos:

- Nenhuma extrusão adesiva em cavidade de amostra visto que isto causaria variabilidade na definição do ânodo.

10 • Vedação hermética com o material de eletrodo para assegurar nenhum vazamento da solução de química ou sangue debaixo do espaçador.

15 • Nenhuma pegajosidade antes da ativação do adesivo para evitar o uso de um revestimento que necessitaria de ser removido antes da laminação. Além disso, o revestimento poderia interferir com a qualidade da extremidade perfurada.

20 • Boa qualidade de extremidade perfurada, que é uma função da ferramenta de punção, condições de punção e o material. A qualidade da extremidade é importante para a definição do ânodo e para formar uma boa vedação com o material de cobertura.

25 De acordo com outro aspecto da presente revelação, são aqui proporcionados biossensores compreendendo materiais de eletrodo únicos, incluindo materiais semicondutores e condutores. Os materiais condutores incluem metais tradicionais, assim como também materiais inovativos de carbono de filme fino.

Quando são usados materiais condutores, pelo menos um eletrodo pode compreender um metal escolhido a partir de ou derivado

a partir do ouro, platina, ródio, paládio, prata, irídio, carbono, aço, metalorgânicos e suas misturas. Numa modalidade, um eletrodo de carbono pode ainda compreender Cr.

Quando pelo menos um eletrodo é semicondutor, pode
5 compreender um material escolhido a partir de óxido de estanho, óxido de índio, dióxido de titânio, óxido de manganês, óxido de ferro e óxido de zinco. Numa modalidade, pelo menos um eletrodo semicondutor compreende óxido de zinco dopado com índio, óxido de estanho dopado com índio, óxido de índio dopado com zinco ou óxido de índio dopado
10 com estanho.

Noutra modalidade, pelo menos um eletrodo semicondutor compreende um alótropo de carbono dopado com boro, nitrogênio ou fósforo.

Conforme afirmado, o biossensor aqui revelado inclui pelo
15 menos um ou mais eletrodos e um sistema de reativos de reação compreendendo um mediador de elétrons e uma enzima de oxidação-redução específica para o produto de análise a ser mensurado. Em várias modalidades, o produto de análise pode ser escolhido a partir de glicose, colesterol, lactato, ácido acetoacético (corpos de cetona), teofilina e hemoglobina A1c.
20

Quando o biossensor é usado para medir um produto de análise compreendendo glicose, pelo menos uma enzima de oxidação-redução específica para o produto de análise pode ser escolhida a partir da oxidase da glicose, desidrogenase de glicose dependente de PQQ e
25 desidrogenase de glicose dependente de NAD.

Noutras modalidades não limitativas, o mediador de elétrons pode compreender um material de ferricianeto, tal como ferricianeto de potássio, ácido ferroceno carboxílico ou um material contendo rutênio, tal como tricloreto de rutênio hexaamina (III).

O sistema de reativos de reação pode também compreender uma variedade de tampões, surfactantes e ligantes. Por exemplo, numa modalidade, o material de tampão compreende fosfato de potássio. Os surfactantes podem ser escolhidos a partir de surfactantes não iônicos, aniônicos e zwitteriônicos. Além disso, o ligante polimérico pode ser escolhido a partir de hidroxipropilmetil celulose, alginato de sódio, celulose microcristalina, óxido de polietileno, hidroxietilcelulose, polipirrolidona, PEG e álcool polivinílico.

Quando usado para medir produtos de análise no sangue, o sistema de reativos de reação tipicamente compreende ainda um agente de ligação de célula de sangue vermelho para capturar células de sangue vermelho. Esses agentes ligantes incluem lecitinas.

Dependendo do produto de análise de interesse, o sistema de reativos de reação pode incluir ingredientes opcionais tais como tampões, surfactantes e polímeros formadores de filmes. Os exemplos de tampões que podem ser usados na presente invenção incluem sem limitação fosfato, citrato, acetato de potássio, TRIS, HEPES, tampão de MOPS e MES. Além disso, os surfactantes típicos incluem surfactantes não iônicos, tais como Triton X-100® e Surfynol®, surfactantes aniônicos e surfactantes zwitteriônicos. Triton X-100® (um alquil fenoxi polietoxi etanol), e Surfynol® são uma família de detergentes baseados na química do diol acetilênico. Além disso, o sistema de reativos de reação pode incluir opcionalmente agentes molhantes, tais como surfactantes de organossilicones, incluindo Silwet® (um heptametiltrissiloxano modificado por polialquilenóxido a partir de GE Silicones).

O sistema de reativos de reação compreende ainda opcionalmente pelo menos um material de ligante polimérico. Esses materiais são geralmente escolhidos a partir do grupo que consiste em hidroxipropilmetil celulose, alginato de sódio, celulose microcristalina, óxido de polietileno, polietileno glicol (PEG), poliporrolidona, hidroxietilcelulo-

se, ou álcool polivinílico.

5 Numa modalidade, podem ser usados de 0,01 a 0,3%, tal como de 0,05 a 0,25% de um surfactante não-iônico tal como Triton X-100 em combinação com 0,1 a 3%, tal como de 0,5 a 2,0% de um material de ligante polimérico.

Outros componentes opcionais incluem corantes que não interferem com a reação de glicose, mas facilitam a inspeção da deposição. Numa modalidade não limitativa, pode ser usado um corante amarelo (fluoresceína) ou um corante azul (Azul de Cresil).

10 Além da enzima específica para o produto de análise e o mediador de elétrons, o sistema de reativos de reação mencionado acima pode também incluir os componentes opcionais previamente descritos, incluindo os materiais de tamponamento, os ligantes poliméricos e os surfactantes. A camada de reativo cobre geralmente pelo
15 menos parte do eletrodo operacional assim como também o eletrodo contador.

Numa modalidade, usando um processo de carretel para carretel, são formados biossensores múltiplos do tipo aqui revelado numa folha de material que serve de substrato. Os outros componentes
20 no biossensor acabado são, então, construídas camada a camada sobre o substrato para formar o produto acabado.

O processo de produção dos biossensores revelados pode começar depositando um electroativo sobre um substrato de plástico. Conforme aqui usado, pretende-se que um material “eletroativo” signifi-
25 que material eletricamente condutor ou semicondutor.

Por exemplo, o material eletricamente condutor pode compreender um metal escolhido a partir de ou derivado a partir de ouro, platina, ródio, paládio, prata, irídio, carbono, aço, metalorgânicos,

e misturas deles. Numa modalidade, um eletrodo de carbono pode ainda compreender Cr.

Quando pelo menos um eletrodo é semicondutor, pode compreender um material escolhido a partir de óxido de estanho, óxido de índio, dióxido de titânio, óxido de manganês, óxido de ferro e óxido de zinco. Numa modalidade, pelo menos um eletrodo semicondutor compreende óxido de zinco dopado com índio, óxido de estanho dopado com índio, óxido de índio dopado com zinco ou óxido de índio dopado com estanho.

Noutra modalidade, pelo menos um eletrodo semicondutor compreende um alótropo de carbono dopado com boro, nitrogênio ou fósforo.

O material condutor ou semicondutor pode ser depositado de um modo conhecido, como *sputtering* uma camada variando desde 10nm a 100nm. Numa modalidade não limitativa, um filme fino de ouro variando de 25 nm até 35 nm é depositado sobre o substrato de plástico.

Os padrões pretendidos são a seguir formados sobre o substrato por ablação da camada condutora ou camada semicondutora usando um feixe de laser focalizado. Numa modalidade, são usados espelhos para dirigir o feixe de laser para fazer a ablação do material, de acordo com um padrão pretendido. Como mostrado na Figura 1, as linhas cauterizadas ou de ablação pelo laser formam pelo menos dois lados opostos do ânodo. Os restantes dois lados são formados pelo material espaçador aqui descrito e particularmente exemplificado abaixo.

O material espaçador de acordo com a presente invenção é então aplicado ao substrato. Diversamente dos materiais espaçadores tradicionais em que o lado inferior foi coberto com um adesivo para

facilitar a ligação à camada e substrato dielétrico, o material espaçador inventivo não exige um adesivo. Ao contrário, um material espaçador pré-perfurado de acordo com a presente revelação liga-se ao substrato por uma camada vedável pelo calor.

5 Conforme afirmado, antes de ser aplicado ao substrato, pelo menos um orifício é perfurado pelo material espaçador. As Figuras. 2-4 mostram várias SEM e imagens óticas de material espaçador perfurado de acordo com a presente revelação. Conforme mostrado nestas Figuras, o material espaçador perfurado exibe excelente definição de extre-
10 midade com pequena ou nenhuma extrusão adesiva. A extrusão adesiva é definida como definição de extremidade deficiente resultante a partir da adesão do material espaçador à ferramenta de punção usada para formar o orifício. O que também é evidente a partir destas Figuras na uniformidade da camada sobre o substrato.

15 Depois do processo de puncionamento, o material espaçador é posicionado sobre o substrato de tal forma que cobre pelo menos uma parte do ânodo. Numa modalidade, o material espaçador define duas extremidades do ânodo. Nesta modalidade, as duas extremidades que definem as extremidades de ânodo são aquelas que foram puncio-
20 nadas. A fim de definir com precisão a área do ânodo, é desejável ter excelente definição de extremidade depois de puncionar o espaçador. Noutra modalidade, o material espaçador pode ser aplicado ao substrato de tal forma que também cubra uma parte do elétrodo ou cátodo ou uma parte tanto do elétrodo como do cátodo.

25 Depois do material espaçador ser aplicado ao substrato da maneira descrita, é laminado no substrato para assegurar uma vedação hermética com o material de elétrodo. Se feito corretamente, não existirá nenhum vazamento da solução química ou sangue sob o espaçador. O procedimento de laminação é tipicamente realizado a
30 uma temperatura variando desde 121 a 149°C e pressão variando desde

0,35 até 4,2 kgcm⁻².

O biossensor laminado mostra uma superfície uniformemente lisa com uma excelente definição de extremidade para o ânodo. A uniformidade na definição do revestimento e da extremidade do ânodo é exemplificada nas varreduras de perfilometria proporcionadas na Figura 6. Estas varreduras foram tomadas através da parte superior do material espaçador puncionado laminado sobre o substrato contendo o eletrodo e mostram um declive de extremidade mínima entre a superfície e a cavidade e a ausência de carrapichos ou outros defeitos ao longo das extremidades perfuradas.

Numa modalidade, depois de laminar o espaçador no substrato, o sensor montado compreende um ânodo, um cátodo e dois eletrodos de detecção de enchimento, com a área de ânodo definida sobre dois lados opostos por ablação a laser do material condutor ou semicondutor subjacente e os dois lados restantes pelo espaçador perfurado.

Além disso, pelo menos um orifício puncionado através do espaçador define uma cavidade ou poço suficiente para receber certas químicas depois da laminação. A química pode ser depositada nas cavidades ou poços do biossensor montado usando uma variedade de métodos, incluindo piezo dispensação, micropipetagem ou revestimento de spray.

Numa modalidade, um sistema de reativos compreendendo um mediador de elétrons e uma enzima de oxidação-redução específica para o produto de análise é aplicado ao biossensor. Uma composição aquosa compreendendo o sistema de reativos pode ser aplicada via técnicas previamente mencionadas, sobre a parte exposta do eletrodo operacional e secando-a para formar a camada de reativo.

A composição aquosa compreendendo o sistema de reativos

pode incluir um mediador de elétrons escolhido a partir de um material de ferricianeto, ácido ferroceno carboxílico ou um material contendo rutênio. Numa modalidade, o material de ferricianeto compreende ferricianeto de potássio e o material contendo rutênio compreende tricloreto de rutênio (III)hexaamina.

O sistema de reativos de reação depositado compreende ainda pelo menos um material tampão, tal como um compreendendo fosfato de potássio.

O sistema de reativos de reação pode também compreender uma variedade de tampões, surfactantes e ligantes. Por exemplo, numa modalidade, o material tampão compreende fosfato de potássio. Os surfactantes podem ser escolhidos a partir de surfactantes não iônicos, aniônicos e zwitteriônicos. Além disso, o ligante polimérico pode ser escolhido a partir de hidroxipropilmetil celulose, alginato de sódio, celulose microcristalina, óxido de polietileno, hidroxietilcelulose, poli-porrolidona, PEG e álcool polivinílico.

Numa modalidade não limitativa, o sistema de reativos de reação compreende de 0,01 a 0,3% de um surfactante não iônico, tal como de 0,05 a 0,25% de um alquil fenoxi polietoxi etanol, e de 0,1 a 3% de um material de ligante polimérico, tal como de 0,5 a 2,0% de álcool polivinílico.

Uma cobertura transparente pode, então, ser ligada à parte superior do espaçador para formar a cavidade de amostra.

Numa modalidade, uma sonda redox secundária ("SRP") pode ser adicionada à química do biossensor. Para propósitos desta revelação, "sonda redox" significa uma substância capaz de ser oxidada e/ou reduzida.

É possível que a sonda redox secundária compreenda uma

substância mediadora de elétrons adicional capaz de sofrer uma reação redox eletroquímica. Conseqüentemente, da mesma maneira que o mediador de hexaamina de rutênio mencionado acima, a substância de sonda redox secundária gera uma corrente em resposta à aplicação de um pulso de voltagem. A sonda redox secundária, porém, difere da hexaamina de rutênio (isto é, a sonda redox primária) ou dos outros mediadores citados acima por que a corrente gerada não tem relação com a concentração de glicose, mas ainda dependente do nível de sangue particular da amostra, particularmente o nível de hematócrito (isto é, a porcentagem da quantidade de sangue que é ocupada por células de sangue vermelho) da amostra.

Conseqüentemente, o sinal eletroquímico produzido pela SRP será uma função do hematócrito da amostra, mas não dependente da glicose e, portanto, funcionará como um padrão interno para avaliação de hematócrito.

Algumas das classes de compostos que poderiam funcionar como uma SRP incluem complexos de metal de transição, tais como derivados de ferroceno, íons simples, tais como Fe(III) e Mn(II), organometálicos, corantes orgânicos, tais como azul de cresil, produtos orgânicos simples tais como tal como ácido gentísico (2,4-ácido benzóico) e ácido trihidroxibenzóico e outras moléculas orgânicas redox ativas, tais como peptídios contendo aminoácidos redox ativos e partículas da ordem de nm de tamanho que contêm componentes redox ativos.

O seguinte é uma lista exemplificativa de características que a SRP pode exibir:

- pequena ou nenhuma interferência com a medição de glicose (isto é, interação limitada com a enzima, mediador ou glicose);
- oxidado ou reduzido numa faixa potencial que

pode ser facilmente distinguida daquela do mediador;

- solúvel na formulação da química de tiras; e
- pequena ou nenhuma interferência com a estabilidade do sensor ou qualquer outro parâmetro de desempenho.

5 Para que um composto eletroquimicamente ativo seja útil como SRP, é desejável que tenha um potencial distintamente diferente do mediador primário, mas não tão extremo que a sua mensuração resultaria num sinal ruidoso devido a interferência. Por exemplo, quando a hexaamina de rutênio é usada como mediador, existem
10 geralmente duas 'janelas' na faixa de potencial. Numa abordagem baseada na oxidação, uma das janelas é desde mais ou menos 0,3 até cerca de 0,9V. A segunda janela é a técnica baseada em redução e estende-se a partir de aproximadamente -0,15V até -0,5V. É importante lembrar que os números aqui citados são apenas um exemplo muito
15 específico e não devem ser interpretados como uma regra geral. Pode haver casos em que uma SRP que tem um pico em 0,2V ou em outras magnitudes fosse perfeitamente aceitável. A faixa real das janelas é dependente do potencial exigido para a medição primária.

 Para além do escopo de dependência de hematócrito, faixas
20 potenciais e uma preferência para evitar interferência com a medição primária, existem poucas restrições sobre o que exatamente pode ser usado como uma SRP. Isto possibilita o uso de uma ampla variedade de substâncias, incluindo, mas sem limitação: produtos orgânicos simples, macromoléculas, micropérolas funcionalizadas, complexos de
25 metal de transição, nano-partículas e íons simples.

 A presente revelação é ainda iluminada pelos seguintes exemplos não limitativos, que se pretende que sejam puramente exemplificativos da invenção.

Exemplos

Os Exemplos seguintes descrevem a fabricação e a teste de biossensores de acordo com uma modalidade da presente revelação. Nestes Exemplos, o biossensor teve elétrodos sujeitos à ablação com espaçador laminado puncionado sobre ele. O Exemplo 1 descreve testes realizados para determinar a precisão (rugosidade geométrica e de superfície) de áreas de ânodo em biossensores que não têm nenhuma química sobre eles. O Exemplo 2 proporciona dados de testes de sangue de biossensores que compreendem ainda química.

Exemplo 1

Um filme fino de ouro (30 nm) foi *sputtered* sobre um substrato de filme de plástico (PET). A camada de ouro foi, então, sujeita a ablação a laser usando uma abordagem de feixe enfocado, em que foram usados espelhos Galvo para direcionar o feixe de laser para fazer a ablação do material de acordo com um padrão de eletrodo pretendido. A camada de ouro restante foi formada em padrões desejados para um conjunto ordenado de elétrodos, que incluiu um ânodo, um cátodo e dois elétrodos de detecção de enchimento.

A seguir, a segunda camada ou camada de espaçador do biossensor foi formada primeiro puncionando cavidades de amostra num filme de poliéster tendo um revestimento de vedação térmica. O filme de poliéster usado para o espaçador era um filme PET comercialmente disponível (3M Scotchpak™ MA370M), que tinha uma espessura total de 0,094 milímetros, incluindo a camada de vedação térmica de 0,02 milímetros.

O material espaçador perfurado foi laminado sobre substrato eletrodo sujeito a ablação a laser para formar biossensores montados tendo um ânodo, um cátodo e dois elétrodos de detecção de enchimento. Conforme mostrado na Figura 1, a área de ânodo foi definida sobre

os dois lados pela ablação a laser da camada de ouro e as outras duas pelas cavidades de amostra puncionadas do espaçador.

Além dos elétrodos de ablação e do espaçador descrito acima, uma solução de cronoamperometria compreendendo ferrocianeto 5 mM e ferricianeto 200 mM em tampão de 100 mM de fosfato, com 0,1% de Triton X-100 foi aplicado às amostras. O biossensor não teve nenhuma outra química ou cobertura.

Os biossensores fabricados foram analisados usando cronoamperometria que permitiu reprodutibilidade da área de ânodo a ser determinada. Conforme mostrado na Figura 5, o coeficiente de variação (%CV) é de 0,85, que era essencialmente o erro da medição do instrumento, indicando que todos os 57 sensores testados de acordo com este Exemplo foram quase idênticos. Como é evidente, os valores %CV, que determina a precisão na área do ânodo, ilustram excelente reprodutibilidade tanto da ablação a laser como da definição de espaçador puncionado, os dois limites que definem o ânodo.

Exemplo 2

Uma vez que os sensores foram montados de acordo com o Exemplo 1, a química foi dispensada para dentro das cavidades de amostra usando micropipetagem. O volume de sangue exigido para encher a cavidade de amostra deste biossensor era de 0,25 µl, quando foi usada uma camada de espaçador de 100 µm de espessura. A Tabela 1 abaixo mostra as porcentagens relativas em peso dos vários ingredientes dispensados nas cavidades de amostra.

Tabela 1

Ingrediente	Percentual Ponderal
Fosfato, Monobásico (Tampão)	0,64%
Fosfato, Dibásico (Tampão)	0,92%
Silwet L-7206 (Agente Espalhador)	0,051%
Triton X-100 (Agente Espalhador)	0,051%
Methocel F4M (Ligante)	20,00%
Sacarose	5,00%
Cloreto de Rutênio (III) Hexaamina (Mediador)	5,8%
Deidrogenase da Glucose Dependente de PQQ (Enzima)	10,00%
Água Desionizada 18 mega ohm	Restante

A solução de química foi, então, seca e foi aplicada uma cobertura sobre as cavidades de amostra para formar intervalos capilares para dentro dos quais a amostra de sangue pudesse ser puxada. Os dados de teste de sangue foram tomados sobre as amostras acabadas, com tamanhos de amostra variando desde 40-60 por nível de sangue para os valores mostrados na Tabela 2. Como no Exemplo 1, o coeficiente de variação (%CV) foi tanto baixo quanto uniforme através dos níveis de sangue mensurados indicando um alto grau de precisão para as amostras testadas.

Tabela 2

Leitura YSI	30 mg/dl	62 mg/dl	84 mg/dl	109 mg/dl	168 mg/dl	243 mg/dl	301 mg/dl	398 mg/dl	588 mg/dl
Corrente Média (nA)	1411	2365	2850	3728	5383	7376	8763	10884	14935
Desvio Padrão	68	79	94	221	235	149	187	356	549
%CV	4,8	3,3	3,3	5,9	4,4	2,0	2,1	3,3	3,7
Glucose Média (mg/dL)	18	57	77	113	178	260	317	403	565
Desvio Padrão	2,2	3,0	3,9	5,3	7,0	6,1	6,9	13,9	20,5
%CV	12,4	5,3	5,0	4,7	3,9	2,3	2,2	3,4	3,6

A menos que de outra forma indicado, todos os números que expressam quantidades de ingredientes, condições de reação e assim por diante usados no Relatório Descritivo e Reivindicações devem ser entendidos como sendo modificados em todos os exemplos pelo

5 termo “cerca de”. Conseqüentemente, a menos que indicado de outra forma, os parâmetros numéricos descritos no Relatório Descritivo e Reivindicações anexas são aproximações que podem variar, dependendo das propriedades pretendidas buscadas ser obtidas pela presente invenção.

10 Outras modalidades da invenção serão evidentes para aqueles qualificados na técnica a partir da consideração do Relatório Descritivo. Outras modalidades da invenção serão evidentes para aqueles qualificados na técnica a partir de consideração do Relatório Descritivo e da prática da invenção aqui revelada. Pretende-se que o

15 Relatório Descritivo e os Exemplos sejam considerados apenas como exemplificativos, com um escopo e espírito verdadeiros da invenção sendo indicados pelas Reivindicações seguintes.

5 **1 - Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido,**
caracterizado por que o referido biossensor compreende:

pelo menos um eletrodo;

pelo menos um ânodo;

uma cobertura disposta acima da cavidade de amostra ou poço para formar pelo menos um intervalo capilar para dentro do qual o sangue possa ser puxado.

2 - Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido,
de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que a referida
camada orgânica vedável pelo calor compreende um filme contendo
poliéster com uma camada de poliolefina disposta sobre ele.

5 **3 - Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido,**
de acordo com a Reivindicação 2, **caracterizado** por que o referido filme
contendo poliéster compreende tereftalato de polietileno (PET).

4 - Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido,
de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que a referida
10 camada vedável pelo calor ativa-se a ou acima de 85°C.

5 - Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido,
de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que a referida
camada vedável pelo calor define duas de quatro extremidades do citado
ânodo.

15 **6 - Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido,**
de acordo com a Reivindicação 5, **caracterizado** por que as duas
extremidades restantes do ânodo são definidas pelas linhas sujeitas a
ablação na citada camada de substrato por um laser.

7 - Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido,
20 de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que compreende
dois ou mais elétrodos de detecção de enchimento.

8 - Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido,
de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que pelo menos
um eletrodo é condutor e compreende um metal escolhido a partir de ou
25 derivado a partir de ouro, platina, ródio, paládio, prata, irídio, carbono,
aço, metalorgânicos e suas misturas.

9 - Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido,

de acordo com a Reivindicação 8, **caracterizado** por que pelo menos um eletrodo de carbono compreende ainda Cr.

10 - Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que pelo menos
5 um eletrodo é semicondutor.

11 - Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido, de acordo com a Reivindicação 10, **caracterizado** por que o eletrodo semicondutor compreende um material escolhido a partir do óxido de estanho, óxido de índio, dióxido de titânio, óxido de manganês, óxido de
10 ferro e óxido de zinco.

12 - Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido, de acordo com a Reivindicação 10, **caracterizado** por que pelo menos um eletrodo semicondutor compreende óxido de zinco dopado com índio, óxido de estanho dopado com índio, óxido de índio dopado com
15 zinco ou óxido de índio dopado com estanho.

13 - Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido, de acordo com a Reivindicação 10, **caracterizado** por que pelo menos um eletrodo semicondutor compreende um alótropo de carbono dopado com boro, nitrogênio ou fósforo.

14 - Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que o produto de análise é escolhido a partir da glicose, colesterol, lactato, ácido acetoacético (corpos de cetona), teofilina e hemoglobina A1c.

15 - Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido, de acordo com a Reivindicação 14, **caracterizado** por que o produto de análise compreende glicose e pelo menos uma enzima de oxidação-redução específica para o produto de análise é escolhida a partir da oxidase de glicose, desidrogenase de glicose dependente de PQQ e
25

desidrogenase de glicose dependente de NAD.

16 - Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido,
de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que o mediador de
elétrons compreende um material de ferricianeto, ácido ferroceno
5 carboxílico ou um material contendo rutênio.

17 - Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido,
de acordo com a Reivindicação 16, **caracterizado** por que o material de
ferricianeto compreende ferricianeto de potássio e o material contendo
rutênio compreende tricloreto de rutênio (III) hexaamina.

10 **18 - Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido,**
de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que o sistema de
reativos de reação compreende ainda pelo menos um material tampão
que compreende fosfato de potássio.

19 - Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido,
15 de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que o sistema de
reativos de reação compreende ainda pelo menos um surfactante
escolhido a partir de surfactantes não iônicos, aniônicos e zwitteriôni-
cos.

20 - Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido,
20 de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que o sistema de
reativos de reação compreende ainda pelo menos um ligante polimérico
escolhido a partir de hidroxipropilmetil celulose, alginato de sódio,
celulose microcristalina, óxido de polietileno, hidroxietilcelulose, poli-
porrolidona, PEG e álcool polivinílico.

25 **21 - Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido,**
de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que o sistema de
reativos de reação compreende de 0,01 a 0,3% de um surfactante não
iônico e de 0,1 a 3% de um material de ligante polimérico.

22 - Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que o sistema de reativos de reação compreende de 0,05 a 0,25% de um alquil fenoxi polietoxi etanol e de 0,5 a 2,0% de álcool polivinílico.

5 **23 - Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido,** de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que o sistema de reativos de reação compreende uma ou mais sondas redox secundárias escolhidas a partir de complexos de metal de transição, íons simples, organometálicos, corantes orgânicos, produtos orgânicos simples e
10 moléculas orgânica redox ativas.

24 - Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido, de acordo com a Reivindicação 23, **caracterizado** por que os complexos de metal de transição compreendem derivados de ferroceno, os íons simples compreendem Fé (III) ou Mn (II), os corantes orgânicos compre-
15 endem azul de cresil, os produtos orgânicos simples compreendem ácido gentísico (ácido 2,4-benzóico) e ácido trihidroxibenzóico e as moléculas orgânicas redox ativas compreendem peptídios contendo aminoácidos redox ativos e partículas na ordem de nm de tamanho que contêm componentes redox ativos.

20 **25 - Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido,** de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que a camada orgânica vedável pelo calor cobre pelo menos uma parte do eletrodo ou cátodo ou uma parte tanto do eletrodo como do cátodo.

26 - Método de Produção de Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise, **caracterizado** por que o referido método compreende:
25

aplicar um material eletroativo sobre um substrato para formar um substrato coberto;

formar padrões na citada camada de substrato coberto por

ablação do material eletroativo com um laser, em que ditos padrões formam um conjunto ordenado de elétrodos compreendendo pelo menos um elétrodo, um cátodo e um ânodo;

5 aplicar um filme orgânico sobre o referido substrato de tal forma que ele cubra pelo menos uma parte dos citados padrões, em que pelo menos um orifício foi puncionado em dito filme orgânico antes de deposita-lo sobre o referido substrato, formando o citado orifício pelo menos um poço, quando depositado sobre dito substrato, em que o referido filme orgânico compreende uma camada vedável pelo calor que
10 cobre pelo menos uma parte do ânodo e define pelo menos uma extremidade do citado ânodo;

laminar dito filme orgânico sobre o referido substrato aplicando calor e pressão no citado filme orgânico; e

depositar dentro de dito pelo menos um poço um sistema de
15 reativos de reação compreendendo um mediador de elétrons e uma enzima de oxidação-redução específica para o referido produto de análise; e

aplicar opcionalmente uma cobertura para formar um vaso capilar para aplicação de amostra.

20 **27 - Método de Produção de Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise**, de acordo com a Reivindicação 26, **caracterizado** por que o referido material eletroativo é depositado por *sputtering*.

28 - Método de Produção de Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise, de acordo com a Reivindicação 27, **caracterizado** por
25 que o referido material eletroativo compreende um material condutor ou semicondutor.

29 - Método de Produção de Biossensor Para Mensuração de Produ-

to de Análise, de acordo com a Reivindicação 28, **caracterizado** por que o referido material condutor compreende um metal escolhido a partir de ou derivado a partir do ouro, platina, ródio, paládio, prata, irídio, carbono, aço, metalorgânicos e suas misturas.

- 5 **30 - Método de Produção de Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise**, de acordo com a Reivindicação 29, **caracterizado** por que pelo menos um eletrodo de carbono compreende ainda Cr.

- 10 **31 - Método de Produção de Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise**, de acordo com a Reivindicação 28, **caracterizado** por que o material semicondutor é escolhido a partir de óxido de estanho, óxido de índio, dióxido de titânio, óxido de manganês, óxido de ferro e óxido de zinco.

- 15 **32 - Método de Produção de Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise**, de acordo com a Reivindicação 31, **caracterizado** por que o material semicondutor compreende óxido de zinco dopado com índio, óxido de estanho dopado com índio, óxido de índio dopado com zinco ou óxido de índio dopado com estanho.

- 20 **33 - Método de Produção de Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise**, de acordo com a Reivindicação 28, **caracterizado** por que o material semicondutor compreende um alótropo de carbono dopado com boro, nitrogênio ou fósforo.

- 25 **34 - Método de Produção de Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise**, de acordo com a Reivindicação 26, **caracterizado** por que o mediador de elétrons compreende um material de ferricianeto, ácido ferroceno carboxílico ou um material contendo rutênio.

- 35 - Método de Produção de Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise**, de acordo com a Reivindicação 34, **caracterizado** por que o material de ferricianeto compreende ferricianeto de potássio e o

material contendo rutênio compreende tricloreto de rutênio (III) hexaamina.

36 - Método de Produção de Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise, de acordo com a Reivindicação 26, **caracterizado** por que o sistema de reativos de reação compreende ainda pelo menos um material tampão que compreende fosfato de potássio.

37 - Método de Produção de Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise, de acordo com a Reivindicação 26, **caracterizado** por que o sistema de reativos de reação compreende ainda pelo menos um surfactante escolhido a partir de surfactantes não iônicos, aniônicos e zwitteriônicos.

38 - Método de Produção de Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise, de acordo com a Reivindicação 26, **caracterizado** por que o sistema de reativos de reação compreende ainda pelo menos um ligante polimérico escolhido a partir de hidroxipropilmetil celulose, alginato de sódio, celulose microcristalina, óxido de polietileno, hidroxietilcelulose, poliporrolidona, PEG e álcool polivinílico.

39 - Método de Produção de Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise, de acordo com a Reivindicação 26, **caracterizado** por que o sistema de reativos de reação compreende de 0,01 a 0,3% de um surfactante não iônico e de 0,1 a 3% de um material de ligante polimérico.

40 - Método de Produção de Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise, de acordo com a Reivindicação 26, **caracterizado** por que o sistema de reativos de reação compreende de 0,05 a 0,25% de um alquil fenoxi polietoxi etanol e de 0,5 a 2,0% de álcool polivinílico.

41 - Método de Produção de Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise, de acordo com a Reivindicação 26, **caracterizado** por

que o sistema de reativos de reação compreende uma ou mais sondas redox secundárias escolhidas a partir de complexos de metal de transição, íons simples, organometálicos, corantes orgânicos, produtos orgânicos simples e moléculas orgânicas redox ativas e suas combinações.

42 - Método de Produção de Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise, de acordo com a Reivindicação 41, **caracterizado** por que os complexos de metal de transição compreendem derivados de ferroceno, os íons simples compreendem Fe(III) ou Mn(II), os corantes orgânicos compreendem azul de cresil, os produtos orgânicos simples compreendem ácido gentísico (ácido 2,4-benzóico) e ácido trihidroxibenzoico e as moléculas orgânicas redox ativas compreendem peptídios contendo aminoácidos redox ativos e partículas na ordem de nm de tamanho que contêm componentes redox ativos.

43 - Método de Produção de Biossensor Para Mensuração de Produto de Análise, de acordo com a Reivindicação 26, **caracterizado** por que a referida laminação do filme orgânico sobre o citado substrato é realizada a uma temperatura que varia desde 149 a 204°C e uma pressão que varia desde 1,4 a 4,2 kgcm⁻².

44 - Biossensor Para Mensuração de Níveis de Glicose no Sangue, **caracterizado** por que o referido biossensor compreende:

uma camada de substrato, compreendendo a referida camada de substrato:

pelo menos um eletrodo;

pelo menos um cátodo;

pelo menos um ânodo;

pelo menos um material espaçador que com-

preende um tereftalato de polietileno (PET) com uma camada de poliole-
fina nela disposta, em que o citado material espaçador ativa-se em ou
acima de 85°C e define duas de quatro extremidades de dito ânodo,
sendo as duas extremidades restantes do ânodo definidas pelas linhas
5 sujeitas a ablação na referida camada de substrato por um laser,

em que o citado material espaçador tem pelo menos um
orifício nele puncionado, definindo dito orifício uma cavidade ou poço de
amostra;

um sistema de reativos de reação localizado na
10 referida cavidade ou poço, compreendendo o citado sistema de reativos
de reação um mediador de elétrons escolhido a partir de um material de
ferricianeto, ácido ferroceno carboxílico ou um material contendo
rutênio e uma enzima de oxidação-redução escolhida a partir de oxidase
de glicose, desidrogenase de glicose dependente de PQQ e desidrogenase
15 de glicose dependente de NAD; e

uma cobertura disposta acima da cavidade ou poço de
amostra para formar pelo menos um intervalo capilar para dentro do
qual o sangue possa ser puxado.

45 - Biossensor Para Mensuração de Níveis de Glicose no Sangue, de
20 acordo com a Reivindicação 44, **caracterizado** por que o sistema de
reativos de reação compreende uma ou mais sondas redox secundárias
escolhidas a partir de complexos de metal de transição, íons simples,
organometálicos, corantes orgânicos, produtos orgânicos simples e
moléculas orgânicas redox ativas.

46 - Biossensor Para Mensuração de Níveis de Glicose no Sangue, de
25 acordo com a Reivindicação 45, **caracterizado** por que os complexos de
metal de transição compreendem derivados de ferroceno, os íons
simples compreendem Fe (III) ou Mn (II), os corantes orgânicos compre-
endem azul de cresil, os produtos orgânicos simples compreendem

ácido gentísico (ácido 2,4-benzóico) e ácido trihidroxibenzóico e as moléculas orgânicas redox ativas compreendem peptídios contendo aminoácidos redox ativos e partículas na ordem de nm de tamanho que contêm componentes redox ativos.

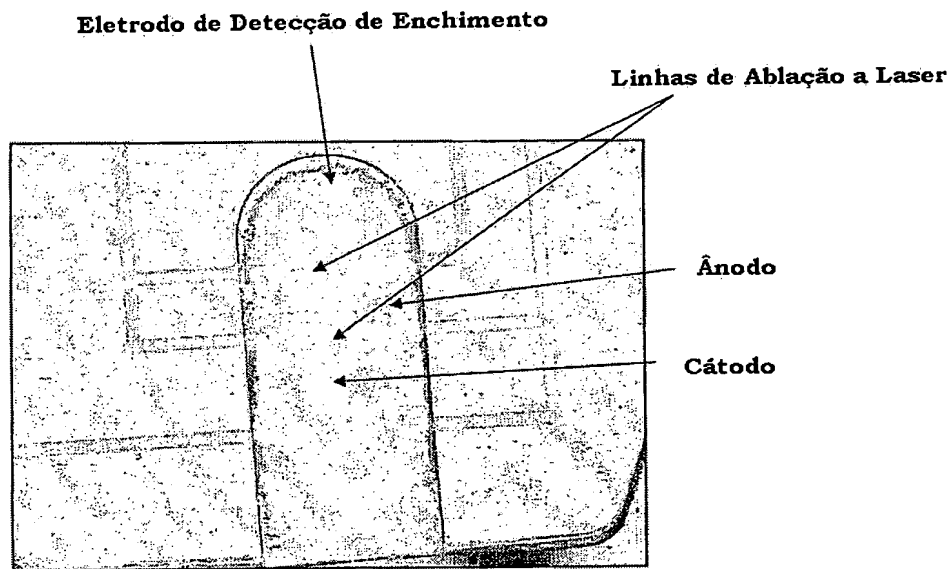


Figura 1

**Imagem Ótica de um Biossensor
de Acordo com a Presente Revelação**

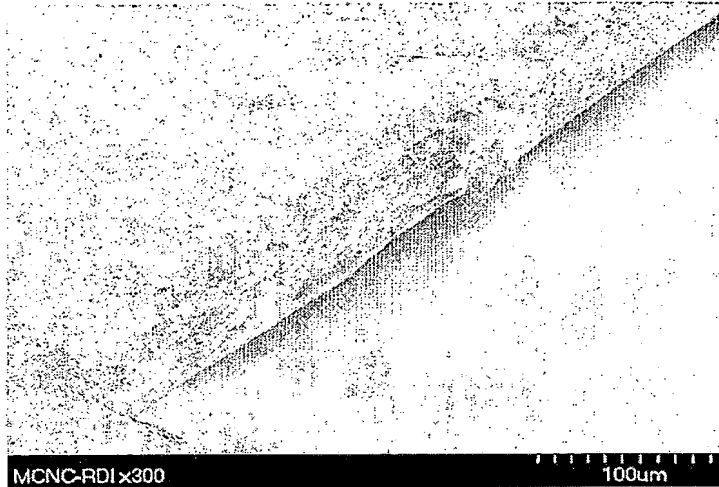
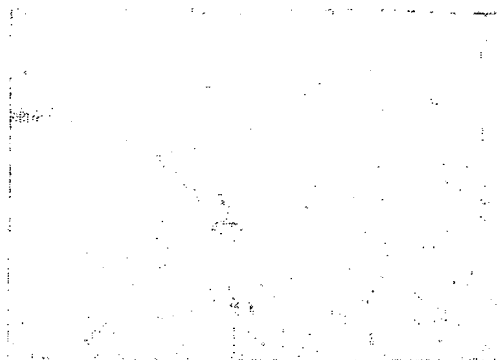
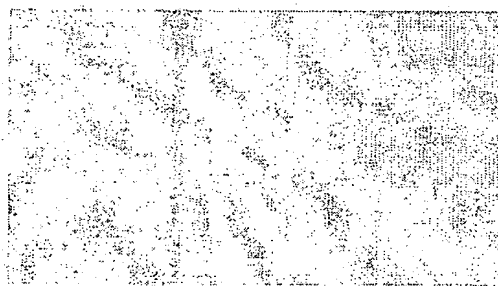


Figura 2

**Imagem SEM de um Espaçador Puncionado
que Mostra Excelente Definição de Extremidade
e Nenhuma Extrusão Adesiva**



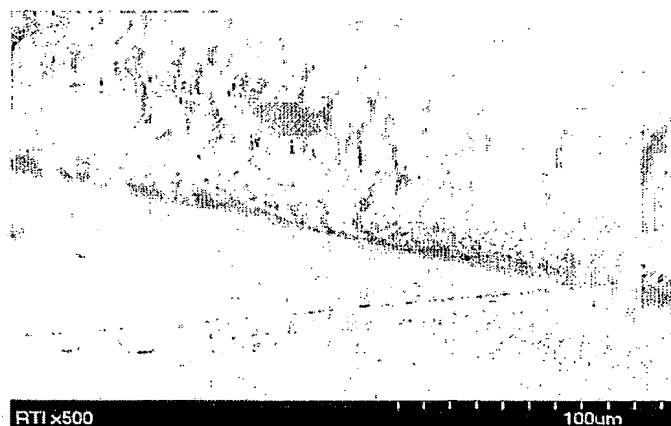
(a)



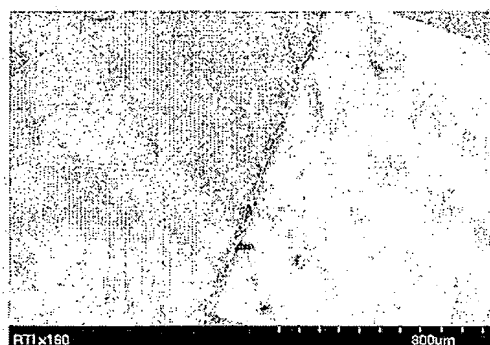
(b)

Figura 3

**Imagens Óticas CMM de um Espaçador Puncionado
que Mostra Excelente Definição
de Extremidades (a) Circulares e (b) Retas**



(a)



(b)

Figura 4

**Imagem SEM de um Espaçador Puncionado
que Mostra Excelente Definição
e Nenhuma Extrusão Adesiva**

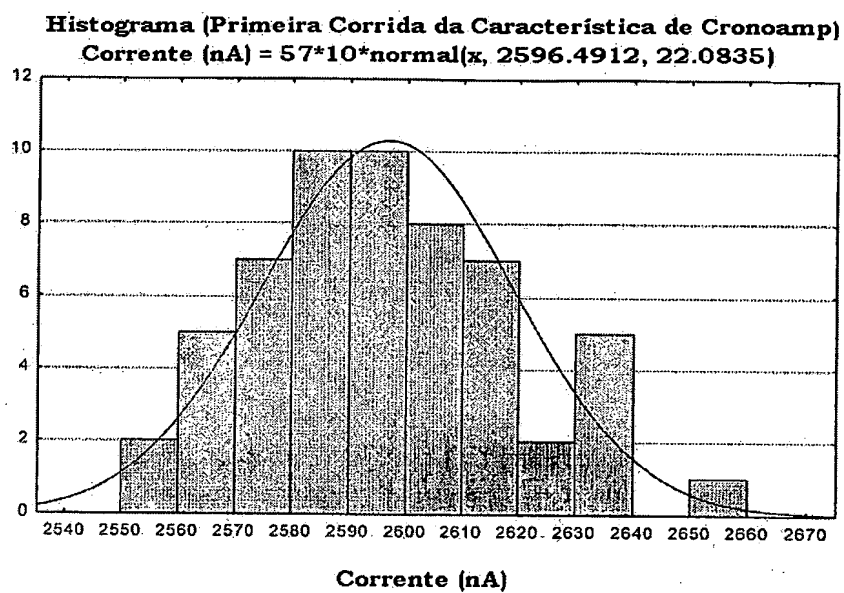
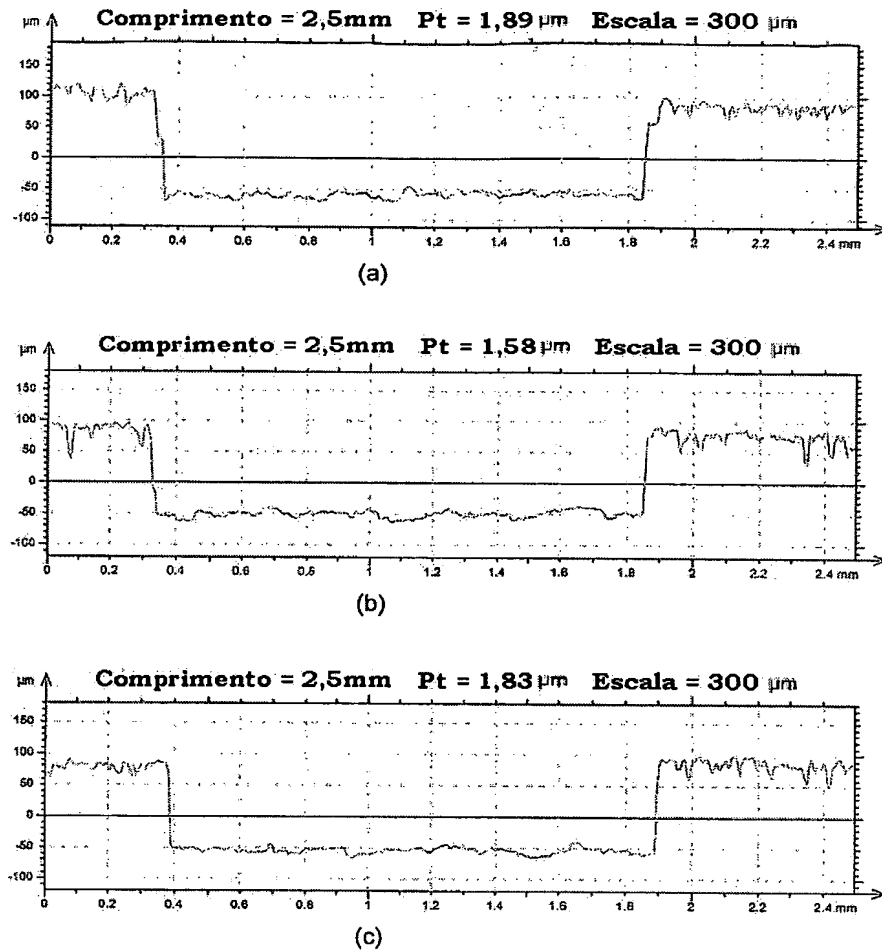


Figura 5

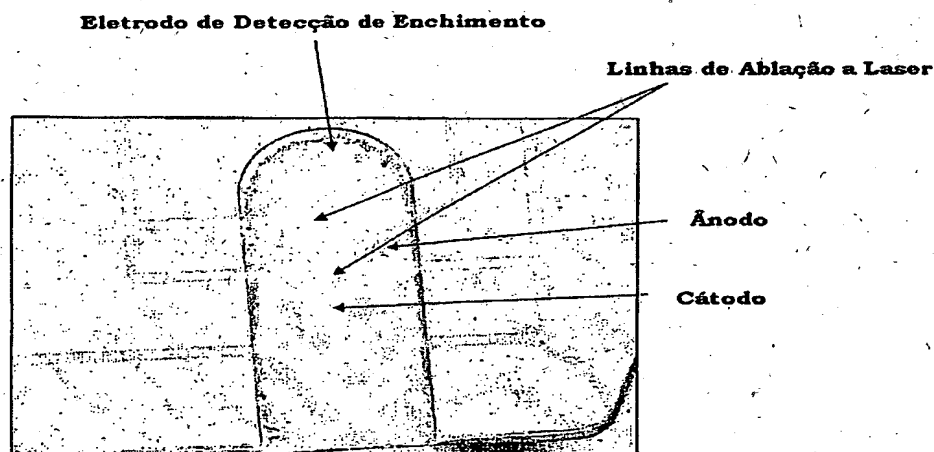
**Histograma de um Teste de Cronoamperometria
(feixe localizado a 0,254mm)
que Mostra um Coeficiente de Variação (%CV) de 0,85**

**Figura 6**

**Varreduras de Perfilometria Através da
Parte Superior do Material Espaçador
Puncionado Laminado Sobre o Substrato
Contendo o Eletrodo**

**“Biossensores Para Mensuração de Produto de Análise em Fluido
e de Níveis de Glicose no Sangue
e Respectivo Método de Produção”**

Resumo



5

É aqui revelado um biossensor para medir produto de análise num fluido que compreende uma camada de substrato tendo disposto sobre ela pelo menos um dentre cada um de um eletrodo, um cátodo, um ânodo e um material espaçador inovativo. O material espaçador de acordo com a presente revelação compreende uma cama-
10 da orgânica vedável pelo calor que cobre pelo menos uma parte do ânodo e define pelo menos uma extremidade do ânodo, em que o material espaçador tem pelo menos um orifício perfurado através dele e define uma cavidade ou poço para aceitar produto químico. Também é
15 revelado um método de fazer esses biossensores.