

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 481 666**

51 Int. Cl.:

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2009** **E 09713393 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.07.2014** **EP 2252890**

54 Título: **Método y dispositivo para la detección de carbohidratos**

30 Prioridad:

22.02.2008 US 30747 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

31.07.2014

73 Titular/es:

ORION DIAGNOSTICA OY (100.0%)
Koivu-Mankkaan tie 6 B
02200 Espoo, FI

72 Inventor/es:

LUOTOLA, JUHANI;
SUNNARI, ANTTI;
KOLOLUOMA, TERHO y
KERÄNEN, MIKKO

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 481 666 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método y dispositivo para la detección de carbohidratos5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método, un dispositivo y un kit para el análisis de una muestra utilizando un tejido para determinar la presencia o la cantidad en la muestra de un analito, que es un carbohidrato, más particularmente un azúcar.

10

Antecedentes de la invención

15

La higiene ambiental recibe cada vez más atención en los laboratorios, las salas de espera de los médicos, en el hogar, en instalaciones públicas y en los centros de producción industriales. La tendencia es hacia el desarrollo de métodos con los que la persona que utiliza o limpia un espacio puede asegurar rápidamente su higiene. Tales métodos deben ser extremadamente simples, fáciles de utilizar, rápidos y baratos.

20

La higiene se puede asegurar mediante la determinación de la presencia de microbios, por ejemplo concentraciones de bacterias o sustancias que promueven el crecimiento de bacterias, en las superficies. El análisis de los microbios de las superficies con los métodos actuales es lento y requiere experiencia profesional. Un análisis de las sustancias - por ejemplo, azúcares y proteínas - que facilitan el crecimiento microbiano, por ejemplo, de bacterias u hongos, indica la limpieza de las superficies con una fiabilidad casi comparable.

25

Existen ensayos rápidos y sensibles para la determinación de la presencia de proteínas que se basan en la reacción de verde de bromocresol con proteínas. Tales ensayos se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente WO 2006/122733, que comenta exhaustivamente los formatos de ensayo existentes basados en el uso de varias membranas. La solicitud también comenta ampliamente diversos métodos para aplicar reactivos a la membrana en forma de técnicas rodillo a rodillo u otras técnicas de impresión.

30

La mayoría de los métodos de análisis de carbohidratos conocidos tales como los azúcares se basan en métodos en los que los azúcares se indican por medio de un cambio de color. La mayoría de los métodos basados en el cambio de color se desarrollaron para el análisis espectrofotométrico de azúcares. Hasta la fecha, no se encuentran disponibles ensayos de bajo coste, rápidos y fáciles para determinar la presencia de azúcares sobre las superficies. Un problema relacionado con los azúcares es su estructura estable, lo que significa que su análisis requiere la presencia de enzimas específicas y probablemente inestables, la incubación a altas temperaturas elevadas, los tiempos de reacción prolongados y/o la utilización de productos químicos peligrosos para la salud o poco seguros.

35

40

Se encuentran disponibles varios métodos para el análisis de azúcares que se basan en el cambio de color. Los métodos basados en la reducción de cobre incluyen análisis con reactivos de Fehling, arsenomolibdato y BCA (ácido bicinconínico). Otros métodos aplicables a la determinación de azúcares incluyen métodos con cianuro de hierro y DNS (ácido dinitrosalicílico), métodos basados en la formación de acetales, el método de la antrona, los métodos indicadores que incluyen grupos fenazino, reactivos de Schiff y azul de tetrazolio, así como sensores borónicos basados en el dicroísmo circular, la fotoabsorción y la fluorescencia. Otros métodos aplicables a la determinación de azúcares incluyen métodos enzimáticos tales como glucosa-oxidasa/peroxidasa y hexoquinasa, y métodos de luminiscencia incluyendo bioluminiscencia y quimioluminiscencia.

45

50

Los métodos disponibles como tales no son aplicables para su uso en un formato de ensayo en el que se detectan azúcares utilizando el método del tejido. Todos los métodos basados en la reducción de cobre requieren calentamiento con el fin de efectuar la reacción con la suficiente rapidez.

55

En la Patente de los Estados Unidos 6.586.195, se utiliza Verde Janus B para indicar los azúcares. La patente demuestra que los azúcares reductores son capaces de reducir el Verde Janus B en concentraciones suficientemente altas, en el orden de 10 g/l, en condiciones alcalinas, en cuyo caso el Verde Janus B cambia de azul a gris. El cambio de color no es óptimo, ya que esta reacción - un cambio de azul a gris - hace que sea muy difícil determinar el resultado del ensayo con concentraciones cercanas al límite de detección.

60

Los métodos basados en la formación de acetales y el método de la antrona utilizan ácidos fuertes a una elevada concentración, lo que hace que estos métodos sean inadecuados en el desarrollo de un ensayo rápido basado en un tejido.

Los métodos indicadores implican una composición de reactivo sencilla, lo que reduce el volumen requerido de reactivos que se van a imprimir sobre el tejido. Con concentraciones suficientemente altas de azúcar, los cambios en el color indicador también se pueden observar incluso a la temperatura ambiente. El inconveniente es que sólo los azúcares con alto poder de reducción, p. ej. fructosa, pueden ser detectados. También hay una carencia de

indicadores disponibles en el mercado.

Los métodos enzimáticos y basados en la luminiscencia son sensibles y rápidos. Los inconvenientes asociados con algunas enzimas incluyen su coste y sus características inestables. Además, la acción específica de las enzimas, es decir, que actúan únicamente sobre azúcares concretos, impide el uso de tales enzimas en ensayos rápidos, que deberían ser capaces de indicar un nivel total de todos o casi todos los carbohidratos. Los métodos basados en la luminiscencia son viables sólo en conexión con las enzimas modificadoras de azúcares y por lo tanto comparten los mismos problemas que los métodos enzimáticos.

Los métodos bien conocidos, familiares para los expertos en la materia y los reactivos que emplean no son aplicables como tales a los métodos de diagnóstico rápido. Por ejemplo, el método del cianuro de hierro no es adecuado para el análisis rápido de azúcares ya que en un entorno ácido el cianuro se libera en forma de cianuro de hidrógeno, una sustancia altamente tóxica. Algunos métodos pueden no funcionar a la temperatura ambiente (p. ej., el método DNS o el Verde Janus B), o pueden tener una escasa estabilidad (p. ej., los métodos que requieren enzimas, reactivo de Schiff y reactivos formadores de acetales). Varios métodos también requieren condiciones fuertemente ácidas o alcalinas.

Por consiguiente, existe la necesidad de un ensayo rápido y sensible para la determinación de carbohidratos en las superficies. Especialmente existe la necesidad de un ensayo que se pueda realizar sin un aumento de la temperatura.

Resumen de la invención

Un método no enzimático de determinación de la presencia o la cantidad de un analito carbohidratado en una muestra, comprendiendo dicho método:

aplicar la muestra a un tejido sintético;

modificar químicamente dicho carbohidrato, si está presente en la muestra, con un agente oxidante con potencial de oxidación suficiente para escindir el carbohidrato entre dos grupos hidroxilo;

detectar la presencia o cantidad de dicho carbohidrato modificado químicamente;

en donde la modificación química y la detección se llevan a cabo a la temperatura ambiente y en regiones del tejido separadas.

[0015 En una realización, los medios para modificar químicamente el analito, p. ej. el reactivo o los reactivos, están presentes en el tejido antes de aplicar la muestra al tejido. Preferiblemente, los reactivos se imprimen sobre o se colocan de otro modo, se absorben sobre o se adhieren al tejido.

En una realización de la presente invención, el método comprende adicionalmente la inactivación de un agente que interfiere en la detección del analito modificado químicamente. Preferiblemente, la modificación química y la inactivación del agente de interferencia se llevan a cabo antes de detectar el analito modificado químicamente. De acuerdo con esta realización, cualquier muestra o producto de interferencia, p. ej. agente, reactivo, composición o sustancia presente en la muestra, reactivo de análisis aplicado al tejido o formado durante el procedimiento de análisis puede ser sujeto de inactivación por ejemplo, por neutralización o mediante la prevención de su movimiento por medio de precipitación. En una realización, los medios para inactivar el agente de interferencia están presentes en el tejido antes de aplicar la muestra al tejido. Estos medios se imprimen preferiblemente sobre el tejido colocado de otro modo, adsorbido o adherido. En una realización tanto los medios para modificar químicamente el analito como los medios para inactivar el agente de interferencia están presentes sobre el tejido antes de aplicar la muestra al tejido.

La presente invención también proporciona un dispositivo de ensayo adecuado para llevar a cabo el método no enzimático, cuyo dispositivo comprende un tejido sintético al que se puede aplicar la muestra, llevando el tejido en regiones separadas un medio para modificar químicamente un carbohidrato a la temperatura ambiente con un agente oxidante con potencial de oxidación suficiente para escindir el carbohidrato entre dos grupos hidroxilo; y un medio para detectar a la temperatura ambiente carbohidratos modificados químicamente; y, opcionalmente, un medio para la inactivación de un agente de interferencia.

De acuerdo con una realización, dichos medios se aplican o se imprimen de manera seriada p. ej., en forma de regiones, zonas o secciones preferiblemente de tal manera que cuando se utiliza el dispositivo la muestra es capaz de viajar a través de las regiones en un orden secuencial.

La presente invención proporciona adicionalmente un kit para la determinación de la presencia o la cantidad de un analito carbohidratado en una muestra, comprendiendo dicho kit un dispositivo de ensayo como se ha definido anteriormente y una solución tampón para humedecer el material del tejido o una superficie de la que se vayan a tomar muestras o para crear dicha muestra.

Además, la presente invención se refiere a un método de impresión rodillo a rodillo, en el que los reactivos y dichos

medios se imprimen de manera sucesiva sobre áreas especificadas en un tejido. En particular, la invención proporciona un método de fabricación de un dispositivo de ensayo como se ha definido anteriormente adecuado para llevar a cabo el método no enzimático de la invención y que comprende un tejido sintético al que se puede aplicar la muestra, comprendiendo el método de fabricación:

- 5 aplicar al material de tejido sintético mediante impresión un reactivo para modificar químicamente un carbohidrato a la temperatura ambiente con un agente oxidante con potencial de oxidación suficiente para escindir el carbohidrato entre dos grupos hidroxilo y un reactivo para detectar a la temperatura ambiente el carbohidrato modificado químicamente, en donde la impresión rodillo a rodillo se pone en contacto con el material de tejido mientras que el rodillo de contacto se hace girar y el rodillo de contacto y el material de tejido se mueven relativamente y el reactivo para modificar químicamente el carbohidrato y el reactivo de detección se aplican a regiones separadas del tejido; y
- 10 laminar el material de tejido entre dos capas impermeables, teniendo una de las capas impermeables al menos una apertura alineada con el material del tejido y a través de la cual una muestra puede ser absorbida en el material de tejido desde una superficie
- 15 opcionalmente en donde dicha impresión rodillo a rodillo es una impresión en huecograbado.

El analito es un carbohidrato. En una realización el carbohidrato es un azúcar. Preferiblemente, el azúcar comprende fructosa, dextrina, lactosa, maltosa y/o sacarosa.

- 20 La presente invención proporciona un método de determinación de azúcares en una muestra que comprende un método no enzimático realizado a la temperatura ambiente mediante la aplicación de dicha muestra a un tejido.

Breve descripción de los dibujos

- 25 Figura 1. Principio estructural del método de tejido absorbente de humedad.
Figura 2. Ejemplo específico de un tejido adecuado para un ensayo de azúcares que muestra reactivos presentes en diferentes regiones del tejido.

Descripción detallada de la invención

- 30 El alcance de la protección de la invención está determinado por las reivindicaciones adjuntas (Art.69 (1) EPC)

Esta invención se refiere a un método, un dispositivo y un kit para el análisis de una muestra de tal manera que un analito carbohidratado de la muestra se puede modificar químicamente con un agente oxidante con un potencial de oxidación suficiente para escindir el carbohidrato entre dos grupos hidroxilo y opcionalmente se pueden inactivar durante el análisis reactivos o agentes de interferencia y/o productos formados durante el análisis.

- 35 El método es ampliamente aplicable a la medición de un analito que es estable o de otro modo difícil de medir en la forma en la que se encuentra en la muestra. El método de la presente invención consiste en la determinación de la presencia de carbohidratos, en particular azúcares, en una muestra.

La invención se refiere a la detección de azúcares en la muestra utilizando un método de tejido absorbente de humedad. El método se puede llevar a cabo sin aumentar la temperatura de reacción. La presente invención también se refiere a un dispositivo que contiene el tejido para su uso en el método. En la fabricación del dispositivo, los productos químicos utilizados en el análisis pueden ser transferidos sobre el tejido utilizando métodos de impresión convencionales. Un método adecuado de fabricación se describe con detalle en el documento WO 2006/122733. La laminación del tejido entre las membranas de plástico permite que el líquido se mueva rápidamente a lo largo del tejido. Sin embargo, el procedimiento de fabricación es distinto del procedimiento descrito en el documento WO 2006/122733 por ser más complicado y estimulante debido a las zonas claramente diferenciadas a las cuales se aplican uno o varios agentes de remodelación, uno o varios agentes de inactivación y reactivos de análisis típicos. El método y el dispositivo de la presente invención son aplicables como un ensayo rápido. Los requisitos básicos para un ensayo rápido son la sencillez, la sensibilidad, la especificidad, la seguridad, la facilidad de uso, la capacidad de eliminación y la idoneidad para la producción industrial con métodos de impresión.

- 55 El ensayo de la presente invención se puede utilizar para determinar carbohidratos, en particular azúcares, tales como la fructosa (azúcar de la fruta), la dextrina, la lactosa (azúcar de la leche), la maltosa (azúcar de malta), y la sacarosa (azúcar granulada) preferiblemente utilizando un cambio de color visual. Cuando se explotan los métodos tradicionales, la fructosa es la más fácil de determinar, mientras que la sacarosa y el almidón son los más difíciles. La sacarosa y el almidón son los más difíciles de determinar ya que tienen un poder reductor mucho más bajo que los otros azúcares mencionados anteriormente. La presente invención es capaz de detectar la presencia de 150 µg de azúcares, incluyendo la presencia de azúcares neutros, tales como la sacarosa.

Para evaluar la higiene, los ensayos indicativos son principalmente de naturaleza cualitativa, indicando la presencia de un azúcar en la muestra dentro de un intervalo de sensibilidad dado. La presente invención es capaz de indicar la presencia de carbohidratos, en particular azúcares, a una sensibilidad tal que el límite de detección sea de 1 g/l.

Esto corresponde a una capacidad de detección de 500 µg de azúcares en una muestra de 500 µg tomada de una superficie de 10 x 10 cm². El límite de detección para los azúcares (utilizando las mismas unidades) es preferiblemente de 0,5 g/l, (250 µg) más preferiblemente 0,2 µg (100 µg), 0,1 g/l (50 µg), 0,05 g/l, (25 µg), 0,02 g/l (10 µg) o 0,01 g/l (5 µg).

5 La presente invención permite un dispositivo simple y de bajo coste para la determinación de la higiene p. ej., en hospitales, por ejemplo, consultorios médicos, laboratorios, industria de alimentos, lecherías, panaderías, fábricas de cerveza y en la industria de las bebidas.

10 Un "carbohidrato" es un compuesto químico que contiene carbono, oxígeno e hidrógeno. Se trata preferentemente de un azúcar.

Un "azúcar" es un monosacárido, oligosacárido o polisacárido soluble en agua

15 Se puede utilizar una reacción en serie en un tejido para llevar a cabo el método de la invención. En resumen, la muestra se introduce en el tejido para hacerla reaccionar con los productos químicos deseados en un orden predeterminado específico.

20 La muestra se introduce típicamente en el tejido limpiando el tejido sobre una superficie que se va a someter a ensayo. También se contemplan otras realizaciones. Por ejemplo, el tejido se puede colocar sobre una superficie que se va a someter a ensayo o se puede retirar una muestra líquida de un área de ensayo e introducirla en el tejido usando, por ejemplo, una pipeta o un método de transferencia similar. La superficie y/o el tejido se pueden tratar antes de ponerlos en contacto. Por ejemplo, uno de ellos (preferiblemente la superficie) se puede humedecer con una solución acuosa para ayudar a proporcionar una muestra de fluido. La solución acuosa se puede aplicar, por ejemplo, en forma de pulverización o de lavado. Esto es particularmente deseable si la superficie a someter a ensayo está seca o no tiene suficiente humedad para crear una muestra de fluido adecuada. La solución acuosa es típicamente agua o una solución que comprende los materiales beneficiosos para llevar a cabo el ensayo, p. ej., un tampón.

30 Un tampón no debe contener compuestos que interfieran en la química utilizada para modificar el analito o para detectar el analito modificado. Para un analito carbohidratado en el que la modificación química es una oxidación, la etapa de detección implica típicamente el uso de complejos metálicos cuyo color es una indicación visible de un resultado positivo. En esta realización los reactivos de interferencia que preferiblemente deben estar ausentes de la solución acuosa comprenden, pero no se limitan a, yodatos y fosfatos que forman complejos con cobre, y ácido bórico y boratos que forman complejos con los carbohidratos que interfieren en la oxidación. Las soluciones tampón pueden contener alcoholes primarios, secundarios y terciarios, aunque no se prefieren los di, tri, etc. poli-alcoholes. La solución acuosa también puede contener yodo y estabilizadores, tales como KI, para la detección de almidón u otros polisacáridos cuyo movimiento en el dispositivo de ensayo puede estar más limitado debido a la separación cromatográfica.

40 Las soluciones acuosas adecuadas son tampones que se preparan de acuerdo con la calidad ACS o ProAnalysis. La solución acuosa debe tener un bajo contenido de impurezas de cationes de metálicos. Preferiblemente, no tiene más de 0,002% o no más de 0,001% de Fe. Preferiblemente, no tiene más de 10 ppm, o no más de 5 ppm de metales pesados tales como el Pb. Más preferiblemente, el contenido de impurezas de cationes metálicos de la solución acuosa es tan bajo como sea posible.

50 Una vez que la muestra de fluido se introduce en el tejido, típicamente la primera etapa consiste en modificar químicamente el carbohidrato. Cuando el carbohidrato es un azúcar éste es preferiblemente remodelado o modificado de una manera que permita la determinación a la temperatura ambiente. En una realización, los azúcares se hacen más reactivos mediante la apertura de la unión éter de la estructura del anillo de azúcar y entre monómeros, seguido por un proceso de oxidación, en donde se incrementa el número de grupos aldehído. Los medios para la modificación química de los carbohidratos pueden ser un reactivo, por ejemplo, ácido periódico o una sal peryodato tal como peryodato de sodio u otro tipo de compuesto químico tal como una sal de cerio (IV). Semejante medio de modificación es un agente oxidante con potencial de oxidación suficiente para escindir la cadena de carbohidrato entre dos grupos hidroxilo, y es preferiblemente incoloro. Otras reacciones contempladas para la modificación de carbohidratos en una forma más fácilmente detectable y que pueden ser utilizadas como una base para un método y un dispositivo de ensayo de la presente invención incluyen, pero no se limitan a:

55 Mutarrotación, donde el grupo -OH está mutarrotado de la forma α a la β con un ácido débil.
Formación de puentes de oxígeno catalizada por ácido (éter) entre -OH del azúcar y el alcohol.
60 Formación de ácido carboxílico, por ejemplo ácido glucónico, con la presencia de un oxidante débil, por ejemplo Cu²⁺
Formación de ácido dicarboxílico, por ejemplo ácido glucurónico, a una temperatura elevada con un ácido fuerte.
Reducción con NaBH₄ a alcoholes de azúcares (rotura del anillo éter y formación de grupos terminales

hidroxilo).

Formación de acetatos cuando existen acetato de Na y anhídrido acético. Formación de aldehídos con la presencia, por ejemplo, de óxido de plata y yoduro de metilo.

- 5 Se cree que el método de modificación química de un analito antes de detectar el analito modificado químicamente es un procedimiento no utilizado previamente en tejidos. En el método de la invención, la muestra y los medios de modificación y remodelado se deben reunir, preferiblemente se deben inactivar los agentes de interferencia y sólo las composiciones o sustancias deseadas deben moverse adicionalmente en el material del tejido.
- 10 Un "agente de interferencia" es una sustancia que, si está presente cuando se detecta el analito modificado químicamente, interferirá en la detección del analito modificado químicamente. El agente de interferencia puede estar presente en la muestra originalmente, puede ser un reactivo superfluo de la modificación química del analito o puede existir como resultado de la reacción para modificar químicamente el analito p. ej., un producto o subproducto de la reacción.
- 15 Los ejemplos de los agentes de interferencia incluyen yodatos y fosfatos que forman complejos con cobre, así como ácido bórico y boratos que tienden a formar complejos con los carbohidratos que interfieren en la oxidación de un carbohidrato. Asimismo, los agentes reductores tales como los cationes de metales son capaces de reducir el cobre conduciendo de ese modo a una reacción coloreada sin azúcar. Un agente de interferencia puede ser inactivado o bien en la misma región del tejido en la que se ha llevado a cabo la modificación o bien en una región posterior del tejido a través de la cual pasa la muestra que comprende el analito modificado químicamente. Preferiblemente, la inactivación tiene lugar en una región posterior. La inactivación tiene lugar antes de que se detecte el analito modificado químicamente.
- 20 A continuación, se detecta el analito modificado químicamente. La detección de un analito carbohidratado se lleva a cabo preferiblemente utilizando un análisis de BCA. En un método de BCA el Cu^{2+} oxida el azúcar bajo condiciones alcalinas de ebullición. Se utiliza ácido tartárico como un complejante para el Cu^{2+} evitando la formación de producto precipitado de hidróxido de cobre. Durante este proceso el Cu^{2+} se reduce a Cu^+ que reacciona con ácido bicinconínico y forma un complejo coloreado cuya formación se atribuye a la existencia de azúcar.
- 25 Si bien el método de BCA utiliza la incubación, incluso cantidades minúsculas de cobre reducido son detectables en forma de un complejo de BCA, y los reactivos utilizados se pueden solidificar en compuestos estables sobre el tejido.
- 30 El tejido es un tejido sintético ya que los tejidos basados, por ejemplo, en celulosa natural y viscosa tienden a producir falsos positivos cuando se utilizan para detectar un carbohidrato. Los tejidos sintéticos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, tejidos libres de celulosa y viscosa, tejidos de poliéster, polietano, tejidos de poliamida, tejidos de polipropileno, tejidos de poli(cloruro de vinilo) y sus combinaciones. En una realización, el tejido es un tejido de poliéster.
- 35 El término "tejido" se utiliza en la presente descripción y se define por incluir cualquier material tal como aquel que es capaz de absorber una muestra de fluido y transportar o llevar dicha muestra por acción capilar. Un término comúnmente utilizado es "matriz", que es un material con las características correspondientes. El término "modificar" se utiliza y se define para representar también remodelar.
- 40 El término "región" se utiliza y se define para representar también "zona", "fase", "superficie", "sección", p. ej., un ensayo de múltiples etapas.
- 45 El término "limpieza" se utiliza y se define para representar también "barrido". Durante la limpieza el tejido absorbe el fluido de la superficie.
- 50 El término "producto" se utiliza y se define para representar cualquier agente, reactivo, composición o sustancia.
- 55 En una realización de la presente invención, se aplica el método de BCA para que funcione en un tejido. En la producción de un dispositivo adecuado se imprime un producto químico en forma líquida en el tejido donde se seca. En forma sólida el producto químico no se mueve a lo largo del tejido ni se diluye a través de la evaporación y su estabilidad mejora con respecto a la estabilidad en forma líquida. El ensayo de diagnóstico rápido de la presente invención permite la detección de azúcares sobre las superficies basándose en una reacción que causa un cambio de color que elimina las deficiencias descritas como problemas asociados con los ensayos mencionados más arriba. El dispositivo de ensayo de la presente invención es desechable y puede ser fabricado usando un método de impresión de rodillo a rodillo, lo que mantiene el bajo coste. La realización del ensayo es fácil y no requiere de un entrenamiento especial. Por otra parte, los productos químicos incluidos son seguros para el uso diario.
- 60 Se encuentran disponibles varios métodos para la determinación e indicación de azúcares; estos ensayos fueron comentados en la introducción anterior. Los métodos que se encuentran en la literatura incluyen BCA y diversos indicadores. Estos métodos satisfacen uno de los requisitos preferidos para el éxito del ensayo, es decir, ocasionan un cambio de color a la temperatura ambiente. El inconveniente es que requieren altas concentraciones de azúcar, aunque se pueden indicar cantidades diminutas por medio de termocatálisis. Sin embargo, las propiedades

discutidas en la bibliografía no son suficientes para que los métodos se puedan utilizar directamente con tejidos. La presente invención elimina estos problemas y la necesidad de calentamiento, sin embargo, el ensayo es lo suficientemente sensible como para determinar incluso las bajas concentraciones de azúcar. La presente invención permite crear las condiciones del método del tubo de ensayo en un tejido, lo que hace que la muestra transferida desde la superficie humedecida al tejido experimente un cambio de color si la muestra incluye azúcares.

De acuerdo con la invención, los reactivos utilizados en los métodos estudiados fueron transferidos al tejido por medio de impresión, que además de una fabricación rentable del dispositivo de ensayo también asegura concentraciones de reactivos homogéneas en toda la zona de impresión. Los métodos más comunes de impresión de rodillo a rodillo incluyen la impresión en relieve, la impresión por huecograbado, la impresión offset y la serigrafía, así como el chorro de tinta en algunas aplicaciones.

Se prefiere la impresión por huecograbado como el método de impresión para esta invención. Sin embargo, será evidente para los expertos en la técnica que también se pueden usar otros métodos de impresión con ligeras modificaciones. Se prefiere la impresión por huecograbado debido a la simple mecánica de transferencia de tinta, que permite el uso de tintas con propiedades reológicas significativamente diferentes, y las buenas propiedades de transferencia de productos químicos y resistencia química del método. En los ejemplos, la impresión se realizó con una prensa de impresión de ensayo de sobremesa.

El ensayo del tejido absorbente de humedad implicó la aplicación de una muestra líquida que contenía azúcar a una superficie limpia en cantidades suficientes. El borde del tejido se mantuvo en contacto con la muestra hasta que el líquido de la muestra alcanzó la zona indicadora.

Todos los métodos se sometieron a ensayo con los siguientes azúcares: fructosa, dextrina, lactosa, maltosa y sacarosa, de los cuales la sacarosa es un azúcar neutro en lugar de reductor.

Ejemplo 1

Se sometieron a ensayo tejidos tanto biológicos como sintéticos. En una etapa inicial se observó que los tejidos biológicos que contenían celulosa y viscosa y por consiguiente grupos de tipo azúcar, no eran adecuados para ser utilizados debido a que las funcionalidades de tipo azúcar provocaban también una muestra cero para cambiar el color del ensayo. Por lo tanto, los tejidos libres de celulosa sintética y viscosa también se sometieron a ensayo y no se observó cambio de color con una muestra cero. Entre los tejidos sintéticos sometidos a ensayo se encontró que los tejidos de poliéster eran más favorables que el polipropano debido a su naturaleza menos hidrófoba.

Los protocolos de Waffenschmidt o Smith utilizados durante los experimentos para la determinación de azúcares son los siguientes (Smith et al., Measurement of Protein Using Bicinnchoninic Acid, 1985, 150, 76-85; Waffenschmidt et al., Anal. Biochem. 1987, 165, 337-340).

Protocolo de Waffenschmidt et al. para la determinación de azúcares reductores con el método de BCA:

Composiciones en disolución
Disolución A

BCA 971 mg
Na₂CO₃ x H₂O 31,75 g
NaHCO₃ 12,1 g
añadir H₂O 500 ml

Disolución B

CuSO₂ X 5H₂O 624 mg
L-serina 631 mg
añadir H₂O 500 ml

Las disoluciones se mezclan 1:1 diariamente.

La muestra de azúcar se mezcla con 1 ml de mezcla de disolución A y B. Esta mezcla que contiene azúcar se mantiene durante 15 minutos en un bloque de calentamiento a 100°C. Después de enfriar a la temperatura ambiente, aproximadamente 20 minutos, se registra la absorción a 560 nm.

El límite de detección para los monosacáridos reductoras es de aproximadamente 5 nmol. Para la glucosa 5 nmoles son aproximadamente 0,9 g.

Las composiciones en disolución utilizadas durante el protocolo de Smith et al. para la determinación de proteínas con el método de BCA se muestran en la Tabla 3.1:

Tabla 3.1. Composiciones de las disoluciones en la mezcla de BCA.

Disolución A		Disolución B	
Producto químico	Cantidad	Producto químico	Cantidad
Sal de sodio en BCA	1 g	CuSO ₄ x 5H ₂ O	4 g
Na ₂ CO ₃ x H ₂ O	2 g	H ₂ O	añadir 100 ml
Tartrato disódico	0,16 g	-	-
NaOH	0,4 g	-	-
NaHCO ₃	0,95 g		
H ₂ O	Añadir 100 ml	-	-
pH ajustado, NaOH 10 M, a 11,25		-	-

5 Las disoluciones A y B se mezclan en una proporción 50:1 diariamente.

La disolución de la muestra y la mezcla de las disoluciones A y B se mezclan en una proporción 1:20, respectivamente. La mezcla se incuba si el límite de tiempo para la determinación es estrecho o solo persisten cantidades diminutas de proteína.

10 La absorbancia se midió utilizando un espectrofotómetro. Se logra la misma lectura de absorbancia cuando se utilizan diferentes tiempos y temperaturas de incubación. Esto se presenta en la Tabla 3.2.

15 Tabla 3.2 Obtención de absorbancia 0,2 por medio de diferentes cantidades de proteínas y parámetros de incubación.

Absorbancia	Cantidad de proteína	Temperatura de incubación	Tiempo de incubación en minutos
~ 0,2	20 mg	Temperatura de la habitación	~ 5
~ 0,2	20 mg	37°C	~ 2,5
~ 0,2	5 mg	60°C	~ 3

20 A pesar de que el protocolo de Smith está destinado al análisis de proteínas, se puede utilizar para la determinación de azúcares reductores. Esto se muestra en la Tabla 3.3, donde se presenta el efecto de interferencia del azúcar reductor (glucosa).

Tabla 3.3 Efecto del azúcar reductor en el protocolo de Smith

100 µl de muestra que consiste en 50 µg de BSA* y	Análisis** de BCA (BSA* encontrada) cuando se utilizó la corrección del blanco con agua	Análisis** de BCA (BSA* encontrada) cuando se utilizó la corrección del blanco con interferencia.
900 µg de glucosa	245 µg	57,1 µg
450 µg de glucosa	144 µg	47,7 µg
90 µg de glucosa	70 µg	49,1 µg

* Albúmina de suero bovino (proteína).
 ** Protocolo descrito anteriormente con incubación a 37°C durante 30 minutos.

25 En "corrección del blanco con agua" todos los reactivos existen en el blanco + la misma cantidad de agua pura que en el tamaño de la muestra para mantener el volumen de la muestra y el mismo blanco. La absorción del blanco se registra y se resta de la absorción de la muestra para corregir la absorción causada por la contaminación, los reactivos, los materiales de laboratorio, etc.

"Corrección del blanco con interferencia" es similar a "corrección del blanco con agua", pero el blanco comprende

también la misma cantidad de agente o de agentes de interferencia que la muestra. Por consiguiente, la absorción causada por el agente de interferencia, la contaminación, los reactivos, el material de laboratorio, etc. se puede restar de la muestra.

5 Las composiciones de los reactivos de BCA utilizadas en los experimentos de acuerdo con el protocolo Smith se enumeran en la Tabla 3.1. En los métodos de tubos de ensayo, los reactivos se mezclaron en una proporción de 50A:1B, además de lo cual se incubó la muestra.

10 Los productos químicos utilizados en el método de BCA se transfirieron al plano y diferentes tejidos lavados con tampón utilizando la prensa de impresión de ensayo de sobremesa. Se sometieron a ensayo una gama de diferentes tejidos, valores de pH y combinaciones de productos químicos de BCA creando la base para el desarrollo adicional del trabajo. Las observaciones del ensayo y sus explicaciones se enumeran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4.Observaciones del ensayo y sus explicaciones

Observación	Explicación
La intensidad de la reacción cero aumentó con los valores de pH superiores	Se utilizó un tejido biológico en el ensayo; de este modo se adquirió una reacción más intensa cuando se aproximaba a las condiciones óptimas del método de BCA. El valor de pH óptimo para los azúcares cuando se utilizó el método de BCA es de 10,2.
El tejido biológico causó una reacción cero y no se observaron reacciones cero con los tejidos sintéticos.	La reacción cero observada con los tejidos biológicos estuvo causada por la reacción del cobre con las sustancias reductoras presentes en los tejidos biológicos en forma de viscosa y celulosa. La carencia de reacción cero con tejidos sintéticos confirmó la hipótesis.
Cuando se utilizaron tampones fosfato de pH elevado, la reacción cero fue colorida, aunque el color se desvaneció gradualmente.	Cuando se utilizaron tampones fosfato, se produjo la reacción coloreada, pero el color se desvaneció gradualmente. Esto se debió al cobre que reaccionaba con los fosfatos.
El límite de detección más bajo se logró con un tampón acetato de sodio con un valor de pH de 4,7.	Un tampón acetato con un valor de pH de 4,7 fue el más sensible puesto que el ensayo se realizó utilizando un tampón y un sustrato que no interfirieron en el método de BCA

15 El método de BCA se desarrolló aún más con el objetivo de crear las condiciones óptimas del método del tubo de ensayo en el tejido. Puesto que se ha demostrado que el tejido biológico es inadecuado debido al resultado positivo en la reacción de control negativo, se eligió tejido de poliéster como sustrato ya que éste está libre de los grupos reductores que provocaron la falsa reacción de control.

20 Con el fin de estudiar el impacto del tampón y el pH, el tejido se lavó con tampón carbonato 0,1 M, pH 10,2, y los resultados se compararon con el tampón acetato, pH 4,7. Las disoluciones de reactivo de BCA se imprimieron sobre los tejidos lavados con un tampón carbonato de sodio en una proporción A + ½B, es decir, la disolución B se diluyó a la mitad de la fuerza con agua antes de imprimir. La disolución A se imprimió primero; una vez que la impresión estuvo seca, se añadió 1/2 de disolución B. La Tabla 3.1 muestra las composiciones de la disolución antes de diluir.

25 En anteriores ensayos, el límite de detección para la fructosa en tejidos lavados con un tampón acetato de sodio, pH 4,7, fue de 5 µg/l. Otros azúcares sometidos a ensayo no lograron provocar un cambio de color. Un tampón carbonato con un pH de 10,2 bajó el límite de detección de fructosa a 1 µg/l, mientras que otros azúcares todavía no lograron causar un cambio de color.

30 Como el método de análisis del tubo de ensayo implica la incubación de la muestra, el impacto del calor sobre el método del tejido se puso a prueba mediante la colocación de tejidos humedecidos con los azúcares en un horno a 80°C durante 30 minutos. El efecto térmico también fue evidente con los tejidos; el límite de detección con la fructosa fue de 0,05 g/l, pero no se observó una reacción de cambio de color con otros azúcares.

35 Puesto que un agente complejante de cobre es un elemento del método, se sometieron a ensayo diversos agentes complejantes para tratar de mejorar el rendimiento del ensayo. En los ensayos anteriores se usó tartrato ácido de sodio como agente complejante de Cu²⁺, pero fue sustituido por L-serina ya que Waffenschmidt había descubierto que la L-serina era un agente complejante para el cobre más eficaz que el tartrato ácido de sodio.

40 El siguiente ensayo se basó en composiciones de reactivos de Waffenschmidt (Waffenschmidt et al., más arriba). Los tejidos se trataron con el mismo tampón carbonato y los productos químicos se imprimieron en los tejidos de la misma manera que en los ensayos anteriores. Se utilizaron dos proporciones diferentes de reactivos, A + B y A + ½ B, en la impresión. La Tabla 3.5 muestra las composiciones de las disoluciones A y B.

Tabla 3.5.Composición de las disoluciones de BCA de Waffenschmidt.

Disolución A		Disolución B	
Producto químico	Cantidad	Producto químico	Cantidad
BCA	0,194 g	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,194 g
NaCO ₃ x H ₂ O	6,35 g	L-serina	0,126 g
NaHCO ₃	2,42 g	H ₂ O	añadir 100 ml
H ₂ O	añadir 100 ml	-	-

5 Cuando los azúcares fueron sometidos a ensayo sobre tejidos, la reacción cero con agua fue intensa y los tejidos viraron a color violeta espontáneamente en el plazo de dos semanas. Se cree que la L-serina formó complejo con Cu²⁺ y lo redujo gradualmente a Cu, lo que estuvo seguido de la formación de un complejo de cobre con BCA de color fuerte. Por lo tanto, el protocolo de Smith parece preferirse frente al protocolo de Waffenschmidt para su utilización en el desarrollo adicional del trabajo.

10 Basándose en los ensayos anteriores, se evidenció que el valor de pH, la solución tampón y el agente complejante correctos no proporcionaron al método un grado suficiente de sensibilidad. No se pudo identificar un catalizador adecuado para mejorar la detección de azúcares con el método de BCA basándose en la bibliografía.

15 El poder oxidante del cobre juega un papel en el método de BCA. Por lo tanto, y basándose en los resultados y conclusiones presentados anteriormente, se hizo un intento para encontrar un agente oxidante más poderoso que el cobre. De acuerdo con la invención, sería posible detectar la reducción del agente oxidante utilizando un indicador adecuado que cambiara de color.

20 Sin embargo, la adopción de un agente oxidante más potente dio lugar a varios problemas. A medida que el poder oxidante de una sustancia aumenta, su toxicidad y reactividad a otras sustancias también aumentan. La reactividad hace que varias sustancias se degraden o se reduzcan de manera espontánea, lo que debilita la estabilidad y el funcionamiento del ensayo.

25 A continuación los autores de la presente invención se dieron cuenta de que se podían modificar o remodelar los propios azúcares de una manera que los hiciera más fácilmente detectables usando métodos basados en los cambios de color. Por consiguiente, los autores de la presente invención intentaron oxidar los azúcares con el objetivo de aumentar el número de grupos aldehído que contenían ya que son los grupos aldehído, en particular, los que reaccionan con el cobre en los métodos basados en la reducción del cobre.

30 Se identificaron tres productos químicos adecuados para la oxidación de los azúcares a partir de las publicaciones: ácido periódico, peryodato de sodio y peryodato de Dess-Martin, que oxidan los azúcares de manera que aumentan los grupos aldehído. Como se describe a continuación, los autores de la presente invención encontraron que el aumento del número de grupos aldehído redujo el límite de detección del método e hizo posible detectar también azúcares con potencia baja de reducción y azúcares neutros.

35 **Ejemplo 2**

40 En el método del tubo de ensayo, se añadieron el azúcar, el peryodato de sodio y los reactivos de BCA enumerados en la Tabla 3.1 a un tubo de ensayo en el orden dado. Los tubos de ensayo que contenían el azúcar cambiaron de color a la temperatura ambiente en el plazo de cinco minutos, pero se produjo la reacción cero (control negativo) cinco minutos después. El ensayo demostró un progreso significativo ya que el método de BCA ahora era funcional a la temperatura ambiente e incluso los azúcares neutros causaron un cambio de color. La reacción cero se atribuyó al tartrato de sodio contenido en el reactivo de BCA.

45 El efecto del tartrato de sodio se estudió mediante la preparación de la disolución A en la mezcla de BCA mostrada en la Tabla 3.1 sin tartrato de sodio. Ninguno de los azúcares logró causar un cambio de color en el método del tubo de ensayo. Esto puede ser atribuible al efecto oxidante del peryodato de sodio, en cuyo caso el cobre es reducido por los azúcares, pero se vuelven a oxidar por el peryodato de sodio (Cu⁺ → Cu²⁺).

50 Se tomó la decisión de probar el peryodato de sodio como parte del método de BCA con los tejidos. Los reactivos de BCA fueron impresos en los tejidos en la misma forma que en los ensayos anteriores y el peryodato de sodio se añadió el último. El objetivo era establecer un plazo de tiempo claro entre la muestra control negativo y la muestra que contiene azúcar.

55 Basándose en los resultados, se concluyó que el peryodato de sodio se puede utilizar para mejorar la sensibilidad del ensayo, pero que el peryodato de sodio también interfiere en el método de manera que el cambio de color

inducido por el azúcar sólo se puede observar en el tejido después de 30-40 minutos. Por lo tanto, se necesitaban métodos para neutralizar y/o inactivar el peryodato de sodio después de la remodelación o modificación del azúcar.

Ejemplo 3

Los resultados preliminares de los autores de la presente invención y la resolución de problemas de los autores de la presente invención les llevaron a adoptar un ensayo de múltiples etapas que comprendía productos químicos que reaccionaban como en un ensayo de múltiples regiones o de múltiples zonas, en serie. La acción capilar hace que la disolución de muestra fluya en el tejido donde reacciona con los productos químicos impresos en áreas específicas del tejido.

En el concepto del ensayo, las impurezas de azúcar en la superficie investigada se llevaron a través del tejido absorbente de humedad que contenía los productos químicos necesarios. En el tejido, los azúcares de la muestra líquida reaccionan con los productos químicos en un orden dado. De este modo, incluso los productos químicos reactivos que normalmente inhibirían la reacción o causarían una reacción cero, tales como los descritos en el Ejemplo 2, se pueden utilizar como reactivos, ya que pueden ser inactivados antes del área indicadora de analito de BCA. En consecuencia, los reactivos utilizados en dicho método del tubo de ensayo se pueden utilizar en el material del tejido en un ensayo rápido de múltiples etapas cuando se explotan el moldeo y la inactivación de la presente invención.

En el método del tubo de ensayo anterior, se encontró que el peryodato de sodio facilitaba el método de BCA a la temperatura ambiente. El problema fue la aparición de un resultado de ensayo positivo con una muestra negativa a los pocos minutos y la dificultad de obtener el método para que funcionara con los tejidos. Los autores de la presente invención se dieron cuenta de que el método se podría mejorar mediante la inclusión de etapas adicionales.

Se sabe que las estructuras anulares de los azúcares y las uniones entre monómeros implican un enlace éter. La apertura de esta unión éter acelera la reacción del azúcar con el peryodato de sodio y adicionalmente con el cobre. Los ácidos halogenados, yoduro de hidrógeno y bromuro de hidrógeno, o el pH bajo, se pueden utilizar para romper enlaces éter (Clayden et al., *Organic Chemistry*, OUP 201, p. 434). Los haluros de hidrógeno no se pueden utilizar directamente, ya que no se pueden fijar en un tejido en forma de sólido.

Los enlaces éter de los azúcares se rompieron en condiciones ácidas, que se lograron en los ensayos del método del tubo de ensayo utilizando ácido sulfúrico. A continuación, los azúcares se oxidaron con peryodato de sodio y el peryodato de sodio en exceso se neutralizó con tiosulfato de sodio. La disolución se neutralizó con hidróxido de sodio antes de la adición de los reactivos de BCA. Las razones estequiométricas se utilizaron como punto de partida para la optimización de las concentraciones químicas, dando como resultado las concentraciones mostradas en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Razones de reactivos en el método del peryodato de sodio/tiosulfato de sodio.

Reactivo	Volumen
Disolución de azúcar 1 g/l	200 µl
Ácido sulfúrico 0,1 M	100 µl
Peryodato de sodio 11,3 g/l	100 µl
Tiosulfato de sodio x 5H ₂ O 11,6 g/l	120 µl
NaOH 0,1 M	200 µl
Disolución B de BCA, diluida al 5%	100 µl
Disolución A de BCA que contiene ácido tartárico	500 µl

El método anteriormente descrito ocasionó un cambio de color con sacarosa y la muestra cero (control negativo) cambió de color 24 minutos más tarde en el ensayo del método del tubo de ensayo.

De acuerdo con la visión del método de los autores de la presente invención la reactividad de los azúcares se puede incrementar en un proceso de múltiples etapas y los reactivos que interfieren en su determinación se pueden inactivar, antes de la indicación del analito en la muestra.

Durante el desarrollo del ensayo del tejido los productos químicos se imprimieron sobre los tejidos que a continuación se cortaron en tiras. Las tiras se colocaron una al lado de la otra, formando una estructura similar a un tejido continuo, y se laminaron entre membranas de plástico. La elección inicial cayó sobre plástico de acetato de celulosa; no obstante, su naturaleza hidrófila hizo que el líquido se moviera en la interfase de plástico-tejido. El problema se resolvió utilizando plástico hidrófobo, que conservó el líquido de la muestra en el tejido. La Figura 1

representa un ejemplo de una estructura del método del tejido absorbente de humedad. Puede haber regiones diferentes del tejido que contengan diferentes reactivos. Los diferentes colores de la Figura 1 representan áreas de reactivos potenciales.

5 Por consiguiente, se proporciona un dispositivo de ensayo que comprende un material tejido, en donde el tejido comprende o bien un conjunto de tiras distintas combinadas entre sí en serie para formar un tejido continuo o bien un único tejido. Cada una de las distintas tiras comprende al menos un reactivo, preferiblemente solamente un reactivo, mientras el tejido único comprende más de un reactivo proporcionado sobre el tejido en un orden predeterminado y consecutivo. Dicho material tejido es laminado por dos capas impermeables, teniendo una de las
10 capas impermeables al menos una apertura, preferiblemente una pluralidad de aperturas. La forma de las aperturas puede ser redonda, triangular, rectangular, cuadrada o algo similar. El tamaño de las aperturas puede variar de perforaciones de 0,01 mm a más de 2 cm, mientras el tamaño de la apertura única puede exceder de 2 cm. Con el fin de facilitar el transporte, normalmente capilar, del fluido en el material de tejido, el miembro impermeable está formado típicamente por material hidrófobo. Los materiales adecuados incluyen un material de polipropileno no
15 tejido.

El dispositivo también puede proporcionar un formato que comprende al menos una apertura de muestreo seguido de un paso que comprende una serie de zonas de reactivos laminadas con dicha capa transparente o no transparente, impermeable, que termina en al menos una apertura no laminada o una capa de laminación transparente que comprende la región indicadora del ensayo.
20

Obviamente, el dispositivo de ensayo de limpieza o absorción puede tener cualquier forma que sea capaz de explotar el principio de la invención p. ej., para modificar la muestra que se va a someter a ensayo e inactivar los reactivos de interferencia. Por ejemplo, son posibles diferentes formatos que tienen una región indicadora de ensayo a ambos lados del dispositivo, p. ej., en el mismo lado o en el lado opuesto del área de limpieza o absorción de la muestra.
25

Como se ha descrito, las invención se refiere preferiblemente a un tejido en capa p. ej., un formato de ensayo de flujo lateral que comprende los reactivos aplicados sucesivamente en diferentes zonas. Resulta evidente para los expertos en la técnica que tales ensayos de flujo lateral pueden comprender diferentes diseños y enfoques técnicos y metodológicos.
30

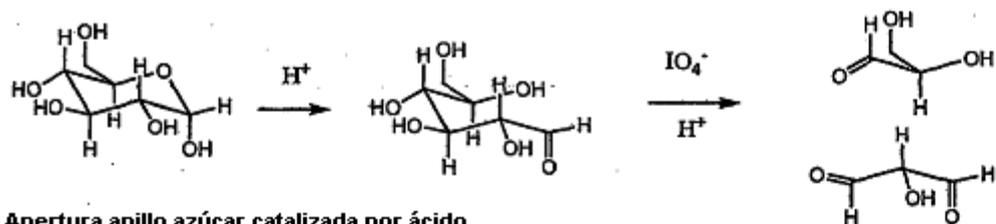
Opcionalmente el dispositivo puede comprender una capa de material de tejido que permita que la muestra pase a través a la vez que limite el flujo de retorno de los reactivos o de la muestra. Dicha capa se denomina a menudo también capa semi-permeable. Por ejemplo, la capa semi-permeable puede estar formada por un material hidrófobo. Un material hidrófobo adecuado es un material de polipropileno no tejido.
35

El método del peryodato de sodio-tiosulfato de sodio utilizado en el método del tubo de ensayo se transfirió al tejido imprimiendo cada reactivo sobre un tejido separado con la prensa de impresión de ensayo de sobremesa. El propósito del ensayo de múltiples etapas es romper los anillos de azúcar en condiciones ácidas y a continuación oxidar la cadena de azúcar con peryodato de sodio a cadenas más cortas que contienen un grupo aldehído reductor. El peryodato de sodio en exceso, que interfiere en el método de BCA, se neutraliza con tiosulfato de sodio antes de la indicación y las cadenas carbonadas resultantes que contienen una cadena de grupo aldehído reducen el cobre y se forma un complejo fuertemente absorbente.
40
45

El tejido utilizado fue tejido de poliéster, que se trató previamente con tampón carbonato 0,1 M con un pH de 10,2. Los reactivos de BCA se imprimieron sobre este tejido tratado previamente a una razón A+%B. Otros reactivos se imprimieron sobre tejidos no tratados.
50

Se prefiere no utilizar el método que implica tiosulfato de sodio, que neutraliza el peryodato de sodio, sobre el tejido ya que las pequeñas cantidades de tiosulfato de sodio en exceso durante los ensayos pueden causar una reacción cero. Además, el límite de detección con este método es elevado; las disoluciones de azúcar con concentraciones por debajo de 1 g/l no lograron ocasionar un cambio de color visual. Se prefiere utilizar sulfato ferroso en lugar de tiosulfato de sodio. El sulfato ferroso reduce el peryodato a yodato, oxidando simultáneamente a ión férrico trivalente.
55

Se imprimieron sulfato de hierro (II) ($\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$) con una concentración de 72 g/l, peryodato de sodio con una concentración 11,3 g/l, ácido sulfúrico con una concentración de 0,1 M y reactivos de BCA A + $\frac{1}{2}$ B sobre tejidos separados. Se laminaron en una única estructura de manera que el ácido sulfúrico fuera primero, seguido de peryodato de sodio y finalmente sulfato ferroso. Esto estuvo seguido de una tira limpia de tejido como área de reacción y a continuación los reactivos de BCA. A medida que la muestra se mueve a lo largo del tejido, se espera que se produzca la serie de reacción mostrada más abajo (Waffenschmidt *et al.*, Más arriba; Clayden *et al.*, Organic Chemistry, OLIP 2001, 146, 344, 1369; Caldwell *et al.*, J. Biol. Chem. 1938, 123, 595-606).
60

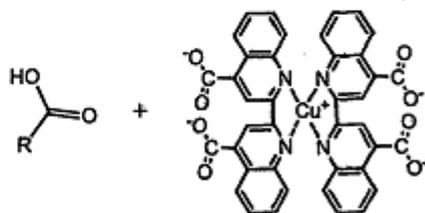


Apertura anillo azúcar catalizada por ácido

Diol escindido por peryodato (Una de las posibilidades)



El exceso de peryodato es reducido por sulfato ferroso



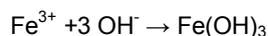
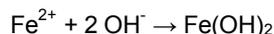
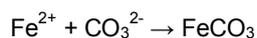
El aldehído es oxidado y el cobre reducido. Cu+ forma un complejo altamente coloreado con ácido bicincónico

Serie de reacción supuesta en un tejido.

5 En la primera fase las estructuras anulares se abren con un ácido sulfúrico. En la siguiente el peryodato escinde los dioles y oxida los azúcares a aldehídos. El peryodato se neutraliza con sulfato ferroso y en la fase final el cobre es reducido por los aldehídos formados mediante la formación de un complejo coloreado con BCA.

10 A medida que la muestra se movía a lo largo del tejido, se encontró que el sulfuro ferroso era llevado hasta el área indicadora y causaba una reacción positiva falsa. Esto se debía al hierro bivalente que reaccionaba con el cobre, dando como resultado la oxidación del hierro y la reducción del cobre; $\text{Fe}^{2+} + \text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{Cu}^{+}$. El sulfato ferroso debe estar presente en la cantidad adecuada para ser completamente oxidado por el peryodato de sodio y no causar una reacción cero. Si bien el hierro trivalente ya no reacciona con el cobre, está siendo llevado al área indicadora y sin embargo debilita el límite de detección puesto que su color pardo rojizo puede cubrir el color violeta del complejo de cobre - BCA formado.

15 Se introdujo una zona de tampón carbonato para evitar que el hierro fuera llevado al área indicadora. El tejido se lavó con tampón carbonato 0,1 M, pH 10,2, y se secó en un horno a 60 grados centígrados. La capa de carbonato se colocó después del sulfato ferroso y antes del área indicadora. El hierro reacciona con los iones carbonato y los iones hidróxido de la capa de carbonato alcalina, formando los compuestos mostrados más abajo (Smith *et al.*, Más arriba).



30 En lugar de ser solubles, los compuestos de hierro presentados precipitan, lo que detiene el movimiento del compuesto que se acumula sobre el tejido.

El ensayo resultante fue funcional y se obtuvo una respuesta con las muestras que contenían azúcar mientras la

muestra de control negativo permaneció incolora. El límite de detección del método fue de 0,5 g/l. Un ejemplo de una concepción de ensayo funcional de un ensayo de azúcares sobre un tejido se muestra en la Figura 2 que comprende: 1. Área de limpieza 2. Ácido sulfúrico 3. Peryodato de sodio 4. Sulfato ferroso 5. Tampón carbonato y 6. BCA, A + ½ B. Se debe observar que las capas de peryodato de sodio y ácido sulfúrico pueden ser substituidas por ácido peryódico.

El método descrito en la presente invención comprende típicamente la impresión de productos químicos uno al lado del otro sobre el tejido o de manera separada sobre diferentes tejidos, que se laminan adicionalmente uno al lado del otro para formar una estructura de tejido continua. Estas capas fueron viables durante el desarrollo del ensayo puesto que este estaba confeccionado con tiras de tejido separadas. Sin embargo, se prevé que se utilizará un trozo continuo de tejido en la producción en masa rodillo a rodillo, lo que hará difícil en la práctica lavar las partes del tejido con el tampón carbonato. Por lo tanto, la cantidad requerida de tampón carbonato tiene que ser transferible mediante impresión. Se imprimió un tampón carbonato unimolar en el área de indicación. La cantidad del tampón carbonato sobre el tejido en el área donde precipita el hierro se incrementó aumentando la polaridad de la disolución de tampón carbonato p. ej., una disolución saturada con un pH de 10,2. La disolución se imprimió dos veces sobre un tejido utilizando un cilindro de impresión capaz de transferir 24,9 ml/m². En el área impresa el hierro precipita en forma de carbonato y se evita su movimiento con el líquido de muestra, eliminando de ese modo la necesidad de optimizar la cantidad de sulfato ferroso. Ajustando la molaridad de la disolución tampón y cambiando el tamaño de la malla y la profundidad de la copa en el cilindro de impresión se puede controlar la cantidad de reactivo que se va a transferir.

Como se ha descrito anteriormente, la cantidad de productos químicos se puede reducir además remplazando el peryodato de sodio por ácido ortoperiódico H₅IO₆ (HIO₄ x 2 H₂O) (Masuda et al., J. Org. Chem. 1994, 59, 5550-5555). El ácido ortoperiódico se encuentra disponible en forma sólida y permanece estable sobre el tejido. El valor de pK_A del ácido ortoperiódico es de 1,64; de este modo sustituye al ácido sulfúrico débil en la rotura de los anillos de azúcar.

Con el fin de mejorar la sensibilidad del ensayo, se ha optimizado adicionalmente la razón de los reactivos de BCA en el tejido. En los métodos de tubos de ensayo, las disoluciones A y B de se mezclaron conjuntamente en la proporción de 50:1. Se utilizaron razones significativamente mayores 1:1 (A + B) y 2:1 (A + ½ B) cuando se imprimieron los reactivos en el tejido, en cuyo caso el color azul del cobre interfirió en la observación del complejo de violeta:BCA. La disolución de cobre se diluyó a 1:10 (1/10 B) con agua. La reducción de la cantidad de cobre disminuyó el límite de detección y se pudo detectar el cambio de color de una disolución de azúcar de 0,1 g/l en lugar de la disolución de azúcar de 0,5 g/l utilizada anteriormente.

Ejemplo 4

En una realización, el dispositivo de ensayo para la detección de azúcar a la temperatura ambiente contenía cinco regiones diferentes y cinco productos químicos diferentes y/o líquidos reactivos impresos en estas áreas. Como primer área hay un área de limpieza o succión que no contiene ningún producto químico. Después de eso, la muestra líquida se desplaza a un área que contiene ácido ortoperiódico impreso donde se rompen los enlaces éter de las estructuras de anillo de los azúcares y entre los monómeros. Además, los azúcares se oxidan a aldehídos en esta área por el ácido ortoperiódico. La siguiente área contiene el sulfato ferroso que reduce el peryodato a yodato, oxidando simultáneamente a férrico trivalente. Los iones ferrosos y férricos se precipitan en forma de carbonato de hierro e hidróxidos de hierro en el área siguiente, que contiene el tampón carbonato. La última capa funcional contiene disolución A pura impresa y disolución B diluida 1:10 del ensayo de BCA impresas con un cilindro capaz de transferir 24,9 ml/m² de tinta. Se produce color violeta para las muestras de 300 µg que contienen 0,5 g/l de azúcar, lo que demuestra la capacidad para detectar una cantidad de 150 µg de azúcar, tal como fructosa, sacarosa, lactosa, maltosa o dextrina en la muestra de fluido. Sin embargo, la sensibilidad del ensayo disminuye junto con el orden de azúcar dado anteriormente y por lo tanto se pueden detectar concentraciones de azúcar incluso más pequeñas con los primeros azúcares mencionados.

El ácido ortoperiódico puede ser substituido por un ácido separado, por ejemplo ácido sulfúrico débil, y capas de peryodato de sodio. En lugar de sulfato ferroso, también se puede utilizar tiosulfato de sodio para la inactivación del peryodato como se muestra en la Figura 2.

El concepto anterior del tejido absorbente de humedad también fue sometido a ensayo en un tubo de ensayo. Utilizando los reactivos de esta realización del ensayo, se midieron los productos químicos en un tubo de ensayo en el orden indicado en la Tabla 5.1. Después se añadió sulfato ferroso, la solución se volvió algo turbia puesto que se habían formado iones férricos trivalentes en la disolución. Los carbonatos e hidróxidos ferrosos y férricos se sedimentaron en el fondo del tubo de ensayo en el plazo de cinco minutos después de la adición de la disolución A incluida en la mezcla de BCA.

Tabla 5.1. Ensayo de carbohidratos de BCA funcional a la temperatura ambiente

Reactivo	Volumen
Disolución de azúcar 1 g/l	1 ml
Ácido periódico 11,3 g/l	100 µl
Sulfato ferroso 72 g/l	30 µl
Mezcla de BCA, disolución B	10 µl
Mezcla de BCA, disolución A	1 ml

5 A una concentración de azúcar de 1 g/l, la disolución cambió de color inmediatamente a violeta. El color siguió oscureciéndose con el tiempo, lo que se puede suponer que se debe a la lenta reducción del cobre. A una concentración de azúcar de 0,01 g/l, el desarrollo de color a un nivel detectable visualmente llevó siete minutos con los mono- y di-sacáridos; el desarrollo fue lento con la dextrina y el almidón.

10 Una ventaja de la presente invención y del ensayo relacionado fue su capacidad de procesamiento con los métodos de impresión rodillo a rodillo. Por esta razón, todos los productos químicos utilizados en el ensayo se pueden transferir al tejido mediante métodos de impresión. La fabricación del ensayo preferido implica cinco productos químicos que se imprimen en un tejido sucesivamente. El tejido se estira durante la impresión, lo que requiere una capacidad de alineación de alta precisión de los equipos. Además, muchos reactivos son incoloros, lo que complica aún más el control de la calidad de impresión y el alineamiento de las diferentes áreas. De acuerdo con la invención, la impresión es más fácil con una prensa en la que el número de unidades de impresión corresponde a la cantidad de reactivos utilizados. En este caso el número recomendado de unidades de impresión es de cinco para el ensayo preferido. Esta clase de equipo hace posible la impresión de todos los productos químicos en los tejidos en una ronda. Esto reduce el impacto de los problemas asociados con el alineamiento de las diferentes capas químicas y el estiramiento ya que el estiramiento afectaría a todas las unidades de impresión de forma idéntica.

20 El ensayo desarrollado en virtud de la invención es el primer ensayo no enzimático para la determinación de azúcares que funciona a la temperatura ambiente. El método también es capaz de determinar azúcares neutros, que muchos ensayos no logran detectar. Las perspectivas importantes proporcionadas por la invención son la modificación química del analito p. ej., la modificación química de los azúcares con ácido periódico, y la inactivación de los reactivos de interferencia antes de la etapa indicadora y el uso del tejido. Una realización de la invención proporciona un ensayo flexible basado en un tejido absorbente de humedad, lo que facilita la precipitación de los productos químicos de interferencia en el tejido, deteniendo así su movimiento adicional en el tejido.

25

REIVINDICACIONES

1. Un método no enzimático para la determinación de la presencia o la cantidad de un analito carbohidratado en una muestra, comprendiendo dicho método:
- 5 aplicar la muestra a un tejido sintético;
 modificar químicamente dicho carbohidrato si está presente en la muestra con un agente oxidante con potencial de oxidación suficiente para escindir el carbohidrato entre dos grupos hidroxilo;
 detectar la presencia o la cantidad de dicho carbohidrato modificado químicamente;
 10 en donde la modificación química y la detección se llevan a cabo a la temperatura ambiente y en regiones separadas del tejido.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el carbohidrato comprende un azúcar, opcionalmente en donde el azúcar comprende fructosa, dextrina, lactosa, maltosa o sacarosa.
- 15 3. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente la inactivación de un agente que podría interferir en la detección de carbohidratos modificados químicamente, opcionalmente en donde la modificación química y la inactivación del agente de interferencia se llevan a cabo antes de la detección del carbohidrato modificado químicamente.
- 20 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la inactivación del agente de interferencia se lleva a cabo en una región del tejido sintético que es posterior a aquella en la que tiene lugar la modificación química y a través de la cual pasa el carbohidrato modificado químicamente.
- 25 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la modificación química es la reacción con un oxidante para abrir un enlace éter en un anillo de azúcar y/o para producir un grupo aldehído.
6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el agente modificador químico es ácido periódico o una sal peryodato.
- 30 7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde después de la reacción de modificación química y antes de la detección del carbohidrato modificado químicamente, se inactiva el exceso de oxidante que pueda interferir en la detección del carbohidrato modificado químicamente.
- 35 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, 6 ó 7, en donde la detección del carbohidrato modificado químicamente es con un compuesto que contiene cobre para producir un cambio de color visible en presencia del carbohidrato modificado químicamente.
9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el tejido sintético es un tejido de poliéster.
- 40 10. Un método de acuerdo con la reivindicación 3 ó 7, en donde la muestra se desplaza a través del tejido sintético por la acción capilar y los medios para la modificación química, los medios para la inactivación del agente de interferencia y los medios de detección están en regiones sucesivas del tejido sintético a través de las cuales se desplaza la muestra, opcionalmente en donde el tejido sintético comprende peryodato de sodio o ácido peryódico como un agente oxidante para el azúcar, y en donde el método comprende neutralizar dicho peryodato de sodio o ácido periódico con tiosulfato de sodio o sulfato ferroso.
- 45 11. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la muestra se aplica al tejido sintético mediante un método que comprende poner en contacto el tejido sintético con una superficie y limpiar la superficie o absorber la muestra de la superficie, opcionalmente en donde el tejido sintético o la superficie se ponen en contacto con una solución tampón antes de que el tejido sintético y la superficie se pongan en contacto uno con el otro.
- 50 12. Un dispositivo de ensayo que es adecuado para llevar a cabo el método no enzimático de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, cuyo dispositivo comprende un tejido sintético al que se puede aplicar la muestra, llevando el tejido sintético en regiones separadas un medio para modificar químicamente un carbohidrato a la temperatura ambiente con un agente oxidante con potencial de oxidación suficiente para escindir el carbohidrato entre dos grupos hidroxilo; y un medio para detectar a la temperatura ambiente el carbohidrato modificado químicamente; y, opcionalmente, un medio para inactivar un agente de interferencia.
- 55 60 13. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el tejido sintético se lamina con una capa impermeable y/o un material de la capa que permite el paso en una dirección de la muestra o el reactivo, opcionalmente en donde la capa impermeable de laminación comprende al menos una apertura; o

en donde la capa laminada que permite el flujo en una dirección de la muestra o el reactivo limita el flujo de retorno de la muestra o el reactivo hacia la superficie con la muestra.

- 5 **14.** Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 12 ó 13, para la detección no enzimática de la presencia o la cantidad de un carbohidrato en una muestra, comprendiendo dicho dispositivo una capa de tejido sintético adaptada para el movimiento sucesivo de la muestra a través de la capa de tejido sintético, comprendiendo la capa de tejido sintético
- 10 un área de modificación química que comprende un medio para modificar químicamente el carbohidrato a la temperatura ambiente con un agente oxidante con un potencial de oxidación suficiente para escindir el carbohidrato entre dos grupos hidroxilo;
- 10 un área de inactivación que comprende un medio para inactivar un agente que interfiere en la detección del carbohidrato modificado químicamente; y
- 10 un área indicadora que comprende medios para detectar a la temperatura ambiente el carbohidrato modificado químicamente que comprende;
- 15 en donde el área de modificación química y el área de detección se encuentran en regiones separadas del tejido sintético.
- 15.** Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el área de inactivación está en una región del tejido sintético posterior al área de modificación química y adaptada para que el carbohidrato modificado químicamente
- 20 pase a través de ella.
- 16.** Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 12, cuyo dispositivo comprende una capa de material de tejido sintético que comprende ácido peryódico o peryodato de sodio como reactivo para la modificación química del carbohidrato a la temperatura ambiente y comprende, adicionalmente, tiosulfato de sodio o sulfato ferroso para la
- 25 neutralización de dicho reactivo de modificación química antes de detectar el carbohidrato modificado químicamente, siendo el carbohidrato modificado químicamente adecuado para la detección a la temperatura ambiente usando un agente complejante de cobre que utiliza ácido bicinconínico.
- 17.** Un método de fabricación de un dispositivo de ensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, adecuado para llevar a cabo el método no enzimático de la reivindicación 1 y que comprende un tejido sintético
- 30 al que se puede aplicar la muestra, comprendiendo el método de fabricación:
- 30 aplicar al material de tejido sintético mediante impresión un reactivo para modificar químicamente un carbohidrato a la temperatura ambiente con un agente oxidante con potencial de oxidación suficiente para escindir el carbohidrato entre dos grupos hidroxilo y un reactivo para detectar a la temperatura ambiente el
- 35 carbohidrato modificado químicamente, en donde la impresión rodillo a rodillo se pone en contacto con el material de tejido sintético, mientras que el rodillo de contacto se hace girar y el rodillo de contacto y el material de tejido sintético se mueven relativamente y el reactivo para la modificación química de un carbohidrato y el reactivo de detección se aplican a regiones separadas del tejido sintético; y
- 40 laminar el material de tejido sintético entre dos capas impermeables, teniendo una de las capas impermeables al menos una apertura alineada con el material de tejido sintético y a través del cual una muestra puede ser absorbida en el material de tejido sintético a partir de una superficie
- 40 opcionalmente en donde dicha impresión rodillo a rodillo es la impresión por huecograbado.
- 18.** Un kit para la determinación no enzimática de la presencia o la cantidad de un carbohidrato en una muestra, comprendiendo dicho kit un dispositivo de ensayo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16,
- 45 para llevar a cabo el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11;
- 45 y que comprende adicionalmente una solución tampón para humedecer el material de tejido sintético o una superficie de la que se va a tomar la muestra para crear dicha muestra.
- 19.** El uso de un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para detectar la presencia de un carbohidrato sobre una superficie para indicar la contaminación de la superficie, en particular la
- 50 contaminación con una sustancia que facilita el crecimiento microbiano.

55

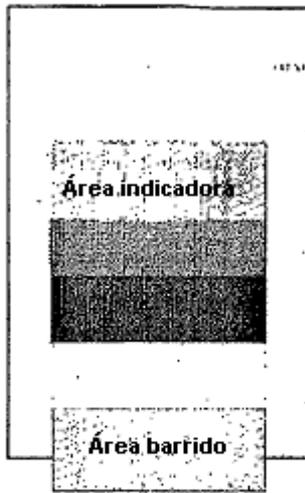


Figura 1.



Figura 2.