

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 322**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/26 (2006.01)

C12Q 1/28 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/553 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2018 E 18211201 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3498859**

54 Título: **Determinación de sarcosina utilizando sarcosina oxidasa y peroxidasa de rábano picante unidas a nanopartículas de Fe₂O₃/AU mediante quitosano**

30 Prioridad:

18.12.2017 CZ 20170812

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

01.09.2020

73 Titular/es:

PREVENTION MEDICALS S.R.O. (100.0%)

Tovarni 342

742 13 Studenka - Butovice, CZ

72 Inventor/es:

UHLIROVÁ, DAGMAR;

DOCEKALOVÁ, MICHAELA;

STANKOVÁ, MARTINA;

RUZICKA, JOSEF y

KIZEK, RENÉ

74 Agente/Representante:

DE PABLOS RIBA, Julio

ES 2 781 322 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

Determinación de sarcosina utilizando sarcosina oxidasa y peroxidasa de rábano picante unidas a nanopartículas de Fe₂O₃/Au mediante quitosano

5

Campo de la invención

La presente invención guarda relación con un método de unión de las enzimas de sarcosina oxidasa y de peroxidasa de rábano picante a nanopartículas de Fe₂O₃/Au mediante quitosano para la determinación cualitativa y cuantitativa de la sarcosina en una muestra biológica o ambiental con la evaluación de una reacción en una solución o sobre una tira de diagnóstico.

10

Antecedentes de la invención

En el siglo XXI, se han realizado grandes esfuerzos para conseguir un diagnóstico específico, sencillo y rápido de sarcosina como un marcador y su determinación sencilla y fiable bajo condiciones normales de laboratorios clínicos. Un aumento significativo en los diagnósticos permite un desarrollo rápido de las nanotecnologías y, sobre todo, su uso en la asistencia sanitaria. Se han propuesto varios enfoques tecnológicos diferentes que han permitido mejorar y ampliar métodos y procedimientos de diagnóstico. Un grupo importante se compone de nanopartículas de hierro que muestran propiedades magnéticas (las cuales frecuentemente se denominan SPIONs: nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas) [1,2]. Basándose en el hecho de que algunos grupos de químicos o de nanomateriales, tales como las nanopartículas de oro (AuNPs), pueden mostrar una actividad enzimática (también de peroxidasa), estas partículas han pasado a un primer plano de la investigación. Se descubrió que las nanopartículas de paladio tienen una actividad de peroxidasa mayor que la de la peroxidasa de rábano picante (*HRP*, por sus siglas en inglés). Estas nanopartículas y la sarcosina oxidasa se utilizaron en ensayos colorimétricos para la determinación de sarcosina en muestras de orina de carcinoma prostático [17]. Las nanopartículas de oro (AuNPs) se han utilizado durante mucho tiempo como una herramienta idónea para experimentos moleculares y biológicos. Las partículas se pueden modificar por una variedad de biomoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos, etc.). Las nanopartículas se pueden modificar, por ejemplo, mediante quitosano, el cual preferiblemente puede servir para inmovilizar enzimas o encapsular fármacos a modo de un portador, tal y como se describe en la invención CN106265597. También se aborda un medio medicinal basado en quitosano a modo de una estructura de soporte en el documento de patente europeo EP 2792375. Las micropartículas magnéticas recubiertas en quitosano para la inmovilización de enzimas se presentaron en el expediente CN105695442. El documento de patente europeo EP 2995627 guarda relación con la síntesis de los sistemas de portadores de gen de nanopartículas basadas en quitosano. El documento CN102703418 presenta un método de preparación de micropartículas de quitosano magnéticas a modo de un portador con peroxidasa de rábano picante unida para el uso necesario de esta enzima. Las nanopartículas magnéticas se pueden modificar mediante un polímero y en complejo con nanopartículas de oro crean un soporte de enzima como el que se describe en la publicación [18], donde la enzima de peroxidasa de rábano picante se unió al complejo de Fe₃O₄/carboximetilquitosano/nanoro. La enzima unida de esta manera mostró una actividad mayor que la enzima libre. En varios estudios científicos, se ha mostrado que el aminoácido sarcosina está involucrado en el metabolismo de los aminoácidos y en los procesos de metilación. El nivel de sarcosina en orina en pacientes diagnosticados con cáncer de próstata es elevado [3-9]. Para detectar la sarcosina, se ha descrito en publicaciones científicas [10], así como en expedientes de pacientes [11-13], la detección enzimática utilizando sarcosina oxidasa. El documento [13] establece un método de determinación de sarcosina en una muestra biológica utilizando una tira de diagnóstico con nanopartículas de oro conjugadas con un anticuerpo antisarcosina específico. Las propias nanopartículas tienen una actividad de peroxidasa. La sarcosina oxidasa es una enzima que hace que la sarcosina se adhiera a la glicina, al formaldehído y al peróxido de hidrógeno [14]. El peróxido de hidrógeno que se forma se utiliza en reacciones químicas posteriores. Los cambios resultantes se observan como interacciones con un sustrato idóneo, tal como el 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y otros [15]. En los últimos cinco años, ha aumentado el interés por usar una prueba sencilla de sarcosina en una muestra biológica (principalmente orina o suero). Algunas técnicas analíticas conocidas que se utilizan frecuentemente, tales como la HPLC, los sistemas de microfluidos, la

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

espectrofotometría o los detectores de peso, son sensibles, pero consumen mucho tiempo y necesitan una preparación de muestra complicada.

- 5 Hasta ahora no se ha desarrollado una prueba que no consuma tanto tiempo utilizando enzimas inmovilizadas, que se modifique para la determinación rutinaria de la sarcosina en un entorno doméstico y que sea lo suficientemente sensible para dar un diagnóstico precoz de un aumento de la cantidad de sarcosina en un cuerpo, lo cual se asocia, entre otras cosas, al cáncer.
- 10 Publicaciones:
1. Mahmoudi, M.; Sant, S.; Wang, B.; Laurent, S.; Sen, T. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (spions): Development, surface modification and applications in chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2011, 63, 24-46.
 - 15 2. Wahajuddin; Arora, S. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Magnetic nanoplatforms as drug carriers. *Int. J. Nanomed.* 2012, 7, 3445-3471.
 3. Cernei, N.; Heger, Z.; Gumulec, J.; Zitka, O.; Masarik, M.; Babula, P.; Eckschlager, T.; Stiborova, M.; Kizek, R.; Adam, V. Sarcosine as a potential prostate cancer biomarker-a review. *International Journal of Molecular Sciences* 2013, 14, 13893-13908.
 - 20 4. Cernei, N.; Zitka, O.; Ryvolova, M.; Adam, V.; Masarik, M.; Hubalek, J.; Kizek, R. Spectrometric and electrochemical analysis of sarcosine as a potential prostate carcinoma marker. *International Journal of Electrochemical Science* 2012, 7, 4286-4301.
 - 5.Khan,A.P.;Rajendiran,T.M.;Ateeq,B.;Asangani, I.A.; Athanikar, J.N.; Yocum, A.K.; Mehra, R.; Siddiqui, J.; Palapattu, G.; Wei, J.T., et al. The role of sarcosine metabolism in prostate cancer progression. *Neoplasia* 2013, 15, 491-+.
 - 25 6. Sreekumar, A.; Poisson, L.M.; Rajendiran, T.M.; Khan, A.P.; Cao, Q.; Yu, J.D.; Laxman, B.; Mehra, R.; Lonigro, R.J.; Li, Y., et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature* 2009, 457, 910-914.
 - 30 7. Heger, Z.; Cernei, N.; Krizkova, S.; Masarik, M.; Kopel, P.; Hodek, P.; Zitka, O.; Adam, V.; Kizek, R. Paramagnetic nanoparticles as a platform for fret-based sarcosine picomolar detection. *Sci Rep* 2015, 5.
 8. Zitka, O.; Cernei, N.; Heger, Z.; Matousek, M.; Kopel, P.; Kynicky, J.; Masarik, M.; Kizek, R.; Adam, V. Microfluidic chip coupled with modified paramagnetic particles for sarcosine isolation in urine. *Electrophoresis* 2013, 34, 2639-2647.
 - 35 9. Zitka, O.; Heger, Z.; Kominkova, M.; Skalickova, S.; Krizkova, S.; Adam, V.; Kizek, R. Preconcentration based on paramagnetic microparticles for the separation of sarcosine using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with coulometric detection. *J. Sep. Sci.* 2014, 37, 465-475.
 - 40 10. Mayr, U.; Moellering, H.; Siedel, J.; Seidel, H. Hydrogen peroxide-forming sarcosine oxidase uspatent-4743549. May 10 1988. US 4743549, 1988.
 11. Uhlířova, D.; Dočekalova, M.; Stankova, M.; Ruzicka, J.; Kizek, R. Reakční směs pro kvantitativní stanovení sarkosinu ve vzorku lidské moci, sera nebo plazmy. UV c. záp. 30896 2017, 08.08.2017.

12. Uhlirova, D.; Docekalova, M.; Stankova, M.; Melichar, L.; Ruzicka, J.; Kizek, R. Diagnosticky prouzek pro stanovení množství sarkosinu, kreatininu a peroxidu vodíku v biologickém nebo environmentálním vzorku. UV c. záp. 30831 2017, 11.07.2017.
- 5 13. Uhlirova, D.; Docekalova, M.; Stankova, M.; Melichar, L.; Ruzicka, J.; Kizek, R. Diagnosticky prouzek pro kvantitativní stanovení sarkosinu v biologickém vzorku pomocí protilátek proti sarkosinu a nanočástic zlata s peroxidázovou aktivitou nebo kvantovýchčteček. UV c .záp. 30902 2017, 08.08.2017.
- 10 14. Chen, Z.-w.; Hassan-Abdulah, A.; Zhao, G.; Jorns, M.S.; Mathews, F.S. Heterotetrameric sarcosine oxidase: Structure of a diflavin metalloenzyme at 1.85 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 2006, 360, 1000-1018.
- 15 15. Mayr, U.; Moellering, H.; Siedel, J.; Seidel, H. Method for the determination of sarcosine creatinine or creatinine us patent-4845029. July 4 1989. US 4845029, 1989.
- 16 16. Mahmoudi, M.; Simchi, A.; Milani, A.S.; Stroeve, P. Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* 2009, 336, 510-518.
- 20 17. Lan J. et al: Colorimetric determination of sarcosine in urine samples of prostatic carcinoma by mimic enzyme palladium nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, 825, 2014, 63-68
18. Nie L. et al: Magnetic/polymer/nanogold complex using as a novel enzyme support. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 11(6), 2011, 5233-5227.

Resumen de las imágenes

- 25 Figura 1: Esquema simplificado de las nanopartículas de oro magnéticas preparadas ($\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ NPs); CHITO = quitosano; SOX = sarcosina oxidasa; HRP = peroxidasa de rábano picante.
- 30 (A) $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ NPs con una superficie modificada con ácido cítrico;
 (B) $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}/\text{CHITO}$ NPs;
 (C) $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}/\text{CHITO}/\text{SOX}/\text{NPs}$;
 (D) $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}/\text{CHITO}/\text{SOX}/\text{HRP}$ NPs.

- 35 Figura 2: Características biofísicas de las nanopartículas SPION que se utilizaron en una cantidad de 40 mg/ml en una solución de fosfato de 50mM con un pH de 8,0. La medición se realizó en una cubeta de 100 μl UV. (A) Espectro típico de las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ NPs (40 mg/ml); (B) $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}/\text{CHITO}$ NPs; (C) $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}/\text{CHITO}/\text{SOX}$ NPs; (D) $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}/\text{CHITO}/\text{SOX}/\text{HRP}$ NPs; el espectro típico de una actividad de pseudoperoxidasa de las nanopartículas utilizadas y la distribución del tamaño (el tamaño de las nanopartículas puede ser de 20 a 30 nm de media) se muestran en los recuadros. Las nanopartículas se modificaron: 8 kU/l SOX, 5 kU/l HRP.

- 40 Figura 3: Prueba de las propiedades funcionales de los tipos individuales de partículas: columna 1 - $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ NPs; columna 2 - $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}/\text{CHITO}$ NPs; columna 3 - $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}/\text{CHITO}/\text{SOX}$ NPs; columna 4 - $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}/\text{CHITO}/\text{SOX}/\text{HRP}$ NPs; concentración de TMB de 5 mM, 30% de peróxido de hidrógeno, tampón de acetato con un pH de 4,0, concentración de 0,5 M.
- 45 Línea A – una actividad de peroxidasa de tipos individuales de partículas que dependen de su cantidad (pH 8,0); línea B – una línea temporal de la reacción de la peroxidasa de los tipos individuales de partículas en concentraciones de 0 a 40 mg/ml; serie C – una línea temporal de la reacción de la peroxidasa (de 0 a 30 minutos) de cada tipo de partícula a 40 mg/ml (una

curva con diamantes), a 20 mg/ml (una curva con cuadrados), a 10 mg/ml (una curva con triángulos), a 5 mg/ml (una curva con cruces), a 2,5 mg/ml (una curva con estrellas), a 1,25 mg/ml (una curva con puntos); a 0,63 mg/ml (una curva con una suma), a 0,31 mg/ml (una curva casi horizontal cerca de la curva con cuadrados), a 0,16 mg/ml (cerca de la curva casi horizontal con cuadrados), a 0,08 mg/ml (muy cerca de una curva casi horizontal con cuadrados), y a 0 mg/ml (una curva casi horizontal con cuadrados); línea D – una intensidad de señal de la reacción de peroxidasa de tipos individuales de partículas dependiendo de su cantidad (de 0 a 40 mg/ml).

Figura 4: Actividad de peroxidasa de Fe₂O₃/AU/CHITO/SOX NPs.

(A) Evolución de la reacción en tiempo: en un pocillo llano, había 10 µl de Fe₂O₃/AU/CHITO/SOX NPs en 50 mM de la solución de fosfato con un pH de 8,0 y 0,5 mg/ml de sarcosina; las señales individuales representaban las medidas en intervalos de 15 minutos, el último registro fue en el minuto 180. (B) Dependencia de temperatura: una actividad de sarcosina oxidada que depende de la temperatura de incubación. La mezcla contenía: 10 µg/ml de SOX; la temperatura se estableció en el termobloque durante 30 minutos, y se midió sobre una placa de poliestireno; escaneo de 300 a 700 nm; solamente la solución de fosfato estaba a cero. La muestra se preparó: 25 µl de sarcosina (1 mg/ml) a 125 µl de mezcla de reacción (AAP, fenol, HRP, en una solución de fosfato con un pH de 8,0). (C) Dependencia del tiempo del curso de la reacción. (D) Determinación de una actividad de SOX que depende de la concentración de sarcosina. (E) Dependencia de absorbancia sobre la concentración de la sarcosina utilizada.

Figura 5: Actividad de peroxidasa de Fe₂O₃/AU/CHITO/SOX NPs de 5 a 50 µl de partículas en una concentración de 0 a 100 µg/ml de sarcosina en la muestra. Las señales individuales representan las medidas en un intervalo de 15 minutos; el último registro es el del minuto 180. Las medidas se realizaron a una temperatura de 25°C durante 3 horas. A) 50 µl de partículas en el pocillo; B) Calibración con 50 µl de partículas en el pocillo; C) 40 µl de partículas en el pocillo; D) Calibración con 40 µl de partículas en el pocillo; E) 30 µl de partículas en el pocillo; F) Calibración con 30 µl de partículas en el pocillo; G) 20 µl de partículas en el pocillo; H) Calibración con 20 µl de partículas en el pocillo; I) 10 µl de partículas en el pocillo; J) Calibración con 10 µl de partículas en el pocillo; K) 5 µl de partículas en el pocillo; L) Calibración con 5 µl de partículas en el pocillo.

Figura 6: Prueba de toxicidad de tipos individuales de nanopartículas sobre el modelo celular eucariótico y procariótico.

Serie 1 - Fe₂O₃/Au NPs; Serie 2 - Fe₂O₃/Au/CHITO NPs; Serie 3 - Fe₂O₃/Au/CHITO/SOX NPs; Serie 4 - Fe₂O₃/Au/CHITO/SOX/HRP NPs; Columna A – *S. cerevisiae*; Columna B – *E. Coli*; Columna C – *S. aureus*.

Todas las nanopartículas se probaron en las siguientes concentraciones: 0, 0,08, 0,16, 0,31, 0,63, 1,25, 2,5, 5 y 10 mg/ml (estos datos se corresponden con las curvas individuales, donde la curva más baja se corresponde con la concentración más alta). Los valores IC₅₀ se determinaron de la curva de crecimiento en un período de tiempo de 12 h desde la inoculación primaria (inicial para todos los organismos de DO de 0,1).

La figura 7: Tira de diagnóstico de Fe₂O₃/AU/CHITO/SOX/HRP NPs.

(A) Diseño esquemático de la tira de diagnóstico con zonas individuales: A) Ancho 0,4 cm, B – Longitud 6,0 cm; V – zona de muestra de 1,5cm de largo con nanopartículas modificadas sobre una malla de fibra de vidrio; D – zona de reacción - 2cm para la adhesión de la malla de fibra de vidrio de 5,0 cm de largo (TOPS, AAP); E – zona de detección de 2,0 cm de largo – papel de filtro; F – zona final de 0,5 cm de largo – cera; G – la malla de fibra de vidrio (zona de reacción D) excede en 0,5 cm el extremo de la tira con la zona de muestra V (malla de fibra de refuerzo) y en 0,5 cm la zona de detección E.

- (B) La tira de diagnóstico con nanopartículas aplicadas en un diseño real antes de la prueba.
- (C) La disposición de la prueba real con una solución de desarrollo, a la que se agrega la muestra de la prueba del fluido biológico y se sumerge la sección de la zona de muestra de la tira de diagnóstico.

Resumen de la invención

El quitosano, u otros agentes de polimerización idóneos, tiene la capacidad de inmovilizar las enzimas utilizando tripolifosfato (TPP) e iones de zinc. Un método en el que las enzimas de sarcosina oxidasa y de peroxidasa de rábano picante están unidas a las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ con una actividad de peroxidasa utilizando quitosano y tripolifosfato resuelve el inconveniente mencionado anteriormente de la determinación de sarcosina en la muestra biológica.

Este método para unir enzimas bajo condiciones específicas transmite propiedades específicas a las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$, lo que permite detectar la sarcosina en una muestra biológica en una cantidad de 1 a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en función de la reacción en la solución o utilizando una tira de diagnóstico.

Un método de unión de enzimas de sarcosina oxidasa y de peroxidasa de rábano picante a nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ utilizando quitosano de conformidad con la invención se caracteriza en que, en una cantidad de 20 a 60 mg, a las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ se agrega lo siguiente: quitosano en una concentración de 4 a 12 mg/ml en la solución de ácido acético al 1%; la solución de unión de 70 a 500 μl en volumen que contiene sarcosina oxidasa con una actividad de 1 a 45 kU/l; peroxidasa de rábano picante con una actividad de 15 a 35 kU/l en una solución de fosfato en una concentración de 40 a 60 mM y con un pH de 8,0; y tripolifosfato (TPP) en una concentración de 1,7 a 3,2 mM en un ambiente de ácido acético al 1% con un pH de 4. Las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ con la adición de quitosano, de la solución de unión y del tripolifosfato se incuban posteriormente durante 60 minutos a temperatura ambiente y se agitó constantemente; esto va acompañado de la producción de las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ modificadas con un tamaño de 20 a 60 nm, las cuales se almacenan a oscuras a una temperatura de 5 a 10°C. Las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ modificadas que se producen se pueden liofilizar preferiblemente durante 5 horas a una temperatura de -50°C y a una presión de 3 mbar.

El sujeto de la invención también incluye el uso de nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ con enzimas unidas producidas por el método mencionado anteriormente de conformidad con la invención para la determinación cualitativa y cuantitativa de sarcosina en una cantidad de 1 a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en una muestra biológica.

El sujeto de la invención también incluye el método de determinación cualitativa y cuantitativa de sarcosina en una cantidad de 1 a 100 $\mu\text{g}/\text{l}$ en una muestra biológica utilizando las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ con enzimas unidas por el método de conformidad con la invención, caracterizado en que la solución de sustrato de reacción que contiene 4-amino-2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazolin-5-ona (AAP), sal de sodio de ácido 3-(N-etil-3-metilanilina) propanesulfónico (TOPS), fenol y la muestra se añaden a las nanopartículas modificadas de oro en una concentración de 0,1 a 0,5 mg/ml en la solución de fosfato en 40 a 60 mM con un pH de 0,8. La concentración de 4-amino-2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazolin-5-ona es de 0,1 a 5 mM; la concentración de sal de sodio de ácido 3-(N-etil-3-metilanilina) propanesulfónico es de 0,1 a 4 mM; y la concentración del fenol es de 1 a 25 mM en el volumen total de la mezcla de reacción con la muestra, y la proporción de volumen de la solución de sustrato de reacción respecto de la muestra es de 5:1. La mezcla de reacción se incubaba durante 30 minutos a una temperatura de entre 25°C y 40°C; mientras se forman los colores. La intensidad del color resultante se mide por fotometría a 546 nm y después la curva de calibración de la dependencia de absorbancia de la concentración de sarcosina indicará la concentración de sarcosina dentro de la muestra.

- El sujeto de la invención también incluye la tira de diagnóstico para la determinación cualitativa y cuantitativa de sarcosina en una muestra biológica en la cantidad de 1 a 100 $\mu\text{g/ml}$ con el uso de las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ con enzimas unidas por el método de conformidad con la invención. La tira de diagnóstico contiene una zona de muestra saturada con una solución para la zona de muestra que contiene nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ en la cantidad de 0,1 a 0,5 mg/ml en el ambiente de ácido acético al 1% con enzimas unidas de sarcosina oxidasa con una actividad de 1 a 15 kU/l y de peroxidasa de rábano picante con una actividad de 1 a 20 kU/l utilizando quitosano en una forma de unión de las enzimas a las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ (modificación de las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$) de conformidad con la invención. La tira de diagnóstico también contiene una zona de reacción saturada con una solución de sustrato para la zona de reacción que contiene 4-amino-2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazolin-5-ona (AAP) en una concentración de 0,1 a 5 mM , sal de sodio de ácido 3-(N-etil-3-metilnilina) propanesulfónico (TOPS) en una concentración de 0,1 a 4 mM en la solución de fosfato de 40 a 60 mM con un pH de 8,0. La tira de diagnóstico también contiene una zona de detección y una zona final.
- La tira de diagnóstico de conformidad con la invención preferiblemente se compone de una membrana que tiene las partes adherentes de 0,4 cm de ancho en ambos extremos. La membrana preferiblemente tiene un ancho de 0,4 cm y una longitud de 6,0 cm . En un extremo, está provista de una zona de muestra de 1,5 cm de largo, a la que le sigue en la dirección longitudinal una zona de reacción de 5 cm de largo; a la zona de reacción le sigue la zona de detección de 2 cm de largo, y el segundo extremo de la tira está provisto de una zona final de cera de abeja de 0,5 cm de largo.

La zona de muestra y la zona de reacción están hechas preferiblemente de una malla de fibra de vidrio; la zona de detección en la parte superior de la membrana se compone de papel de filtro (Whatman 2, 5), y la zona final está compuesta de cera de abeja en el otro extremo de la tira para frenar el aumento por la acción capilar. La malla fibra de vidrio de 10 cm de largo de la zona de reacción se pega sobre la membrana con una cinta de manera que la malla de fibra se pliegue por la mitad y, una vez que se pega sobre la membrana, se superpone a la zona de detección longitudinalmente en 0,5 cm y al mismo tiempo se superpone al extremo de la tira con la zona de muestra en 0,5 cm .

- El sujeto de la invención también incluye el método de determinación cualitativa y cuantitativa de la sarcosina en la muestra biológica utilizando la tira de diagnóstico de conformidad con la invención añadiendo una muestra biológica dentro de la solución de desarrollo que contiene las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ en una cantidad de 0,1 a 0,5 mg/ml en la solución de fosfato de 40 a 60 mM con un pH de 8,0 modificadas por la sarcosina oxidasa que tiene una actividad de 1 a 15 kU/l y por la peroxidasa de rábano picante que tiene una actividad de 1 a 20 kU/l mediante quitosano de una forma de conformidad con la invención y fenol que tiene una concentración de 1 a 25 mM . La proporción de volumen de la solución de desarrollo respecto de la muestra es de 5:1; después, se deja incubar la solución de desarrollo con la muestra durante 15 minutos, luego la zona de muestra de la tira de diagnóstico se sumerge dentro de la solución y se deja inmersa para que incube durante 30 minutos, mientras se produce la coloración de la zona de detección. Después de que haya aumentado durante 30 minutos y de que se haya producido la reacción en la zona de reacción, el resultado se muestra en la zona de detección de la tira por la coloración de la zona de detección, cuya intensidad se evalúa por densitometría, y después la curva de calibración de la dependencia de la señal de la concentración de sarcosina indicará la concentración de sarcosina dentro de la muestra. La muestra biológica puede ser orina, suero, plasma o esperma.

Ejemplos de la invención

Preparación de las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$

- Tetrahidroborato de sodio que tiene una concentración de 0,04 a 0,07 M se disuelve en un 3,5% de solución de amoníaco y después se agrega en dosis pequeñas agitando constantemente de 300 a 400 rpm para disolver el nitrato de hierro que tiene una concentración de 0,02 a 0,06 M , y se agita de 5 a 10 minutos para que reaccione. El calentamiento tiene lugar a 100°C durante una agitación constante de 300 a 400 rpm por 1,5 a 2,5 horas. Una vez que ha

transcurrido el tiempo, continua la agitación durante otras 12 a 16 horas a RT. Posteriormente, las partículas se separan por un imán y se lavan tres veces con 18 MΩ de agua; después del tercer lavado, las partículas se separan y se les añade una solución de ácido tetracloroáurico que tiene una concentración de 0,5 a 2 mM. La agitación tiene lugar durante 2,5 a 4 horas de 300 a 400 rpm a RT. Después, se añade una solución del citrato de trisodio que tiene una concentración de 0,3 a 1,2 mM, y se continua agitando por otras 18 a 24 horas de 300 a 400 rpm y RT. Posteriormente, las partículas se separan por un imán y se lavan tres veces con 18 MΩ de agua. Después del lavado, las partículas se separan por un imán y se secan a 45°C; después, se rascan y se pulverizan.

10

Preparación de una solución de quitosano

Una solución de quitosano se prepara pesando de 4 a 12 mg de quitosano y disolviéndolo en 1 mililitro de ácido acético al 1% durante una agitación constante de 150 a 350 rpm y RT durante al menos 1 hora. La solución preparada se almacena a una temperatura de 10 a 5°C a oscuras durante un máximo de un mes.

15

Solución de modificación

La solución de modificación para las partículas magnéticas se prepara con NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM y con KH₂PO₄ 1,8 mM (pH 7,2) en agua estéril (18 MΩ).

Solución de unión para las nanopartículas

La solución de unión para las enzimas utilizadas se compone de agua estéril (18 MΩ), sarcosina oxidasa que tiene una actividad de 1 a 45 kU/l, peroxidasa de rábano picante con una actividad de 15 a 35 kU/l y una solución de fosfato con un pH de 8,0 con una concentración final de 40 a 60 mM.

20

Enzima unida a las nanopartículas

Después de mezclar de 20 a 60 mg de nanopartículas de Fe₂O₃/Au que se han lavado tres veces en la solución de modificación (véase más arriba), de 40 a 70 μl de quitosano que tiene una concentración de 4 a 12 mg/ml en un ácido acético al 1% y de 70 a 150 μl de la solución de unión para las nanopartículas (véase más arriba) se añaden a una solución de tripolifosfato (TPP) de 400 a 600 μl en una concentración de 1,7 a 3,2 mM en el ambiente de un ácido acético al 1%. La incubación continua durante una hora a temperatura ambiente y agitando constantemente.

30

Ajuste final de las nanopartículas

Las nanopartículas modificadas preparadas mantienen sus propiedades en la solución a bajas temperaturas (de 5°C a 10°C) en un ambiente ácido (ácido acético al 1%) y a oscuras. Para aumentar la estabilidad y mejorar las propiedades físicas, es preferible liofilizar las partículas (a una temperatura de -50°C, 3 mbar, durante 5 horas) y después ponerlas en el desecador. Las nanopartículas se deben homogeneizar a fondo antes de que se utilicen.

35

Solución de sustrato de reacción

La solución contiene 4-amino-2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazolin-5-ona (AAP) con una concentración de 0,1 a 5 mM, sal de sodio de ácido 3-(N-etil-3-metilnilina) propanesulfónico (TOPS) en una concentración de 0,1 a 4 mM y fenol en una concentración de 1 a 25 mM.

40

Prueba de la actividad de peroxidasa con cantidades diferentes de las nanopartículas de Fe₂O₃/Au/CHITO/SOX NPs utilizando diferentes cantidades de sarcosina dentro de la muestra

Se pipetearon de 5 a 50 μl de las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}/\text{CHITO}/\text{SOX}$ NPs sobre la placa de poliestireno – 5 μl , 10 μl , 20 μl , 30 μl , 40 μl y 50 μl . Se drenaron hasta secarse y se les añadieron 125 μl de un sustrato coloreado (AAP, fenol, HRP en una solución de fosfato con un pH de 8,0) y 25 μl de concentraciones diferentes de sarcosina (de 0 a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Los espectros (de 300 a 700 nm) se registraron con los pasos de medida de 2-nm. Las señales individuales representaban las medidas en un intervalo de 15 minutos; el último registro se realizó en el minuto 180 (Figura 5). Las medidas se tomaron a 25°C durante 3 horas. Los resultados muestran que la medida en una concentración de 0,1 a 0,5 mg/ml de las nanopartículas para una cantidad de 0 a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de sarcosina dentro la muestra es lineal ($r=0,99$ y la pendiente de la línea oscilaba entre 0,0148 y 0,0189; el límite de detección oscilaba entre 0,5 y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Prueba de toxicidad de los tipos de nanopartículas seleccionadas de conformidad con las metodologías disponibles [16]

La medición se realizó en un intervalo de 30 minutos durante 18 horas sobre una microplaca. El medio de cultivo LB se utilizó en una cantidad total de 250 μl por pocillo; el cultivo se produjo a oscuras. La placa estaba protegida contra la evaporación mediante una lámina transparente. La temperatura de la incubación de todos los organismos fue de 35°C. En intervalos de tiempo de 30 minutos, las muestras se agitaron en una amplitud de 6 durante un período de 3 segundos. La toxicidad de las células eucarióticas *S. Cerevisiae* y de las células procarióticas *E. Coli* y *S. Aureus* se analizó para las nanopartículas de los siguientes tipos: $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ NPs, $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}/\text{CHITO}$ NPs, $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}/\text{CHITO}/\text{SOX}$ NPs y $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}/\text{CHITO}/\text{SOX}/\text{HRP}$ NPs. Los valores IC 50 se determinaron por la curva de crecimiento en un período de tiempo de 12 horas desde la inoculación primaria (inicial para todos los organismos de DO de 0,1) y por un análisis de probit utilizando un paquete de software integrado dentro del sistema de información LADYS de cinco repeticiones independientes de la muestra analizada; la curva promedio de crecimiento calculada se utilizó para la evaluación matemática. Se descubrió que las nanopartículas que se utilizaron en concentraciones por debajo de 1,25 mg/ml no eran tóxicas para los modelos de células procarióticas y eucarióticas analizados (Figura 6).

Determinación de la cantidad de sarcosina en orina

Se añadió la solución de sustrato de reacción (véase más arriba) en unas cantidades de 250 μl y de 50 μl de la muestra de orina a las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ liofilizadas y modificadas por el procedimiento anterior por la sarcosina oxidasa y la peroxidasa de rábano picante utilizando una solución de unión (véase más arriba) colocada en un tubo o en una placa, donde la cantidad de las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ liofilizadas constituía del 0,1 al 0,5 mg/ml de la solución de sustrato de reacción. La mezcla de reacción se incubó durante 30 minutos a una temperatura de 25°C a 40°C, después la intensidad del color resultante se midió por fonometría a 546 nm, y la curva de calibración de la dependencia de absorbancia de la concentración de sarcosina indicó la concentración de sarcosina dentro de la muestra. Si no se produce la coloración, la prueba es negativa.

Tira de diagnóstico para la determinación cuantitativa y cualitativa de la sarcosina en una muestra biológica

La tira de diagnóstico 1 se compone de una lámina de plástico de 6,0 cm de largo y de 0,4 cm de ancho, sobre la que está pegada una membrana de nitrocelulosa. Sobre un extremo de la membrana, está pegada una malla de fibra de vidrio de 1,5 cm, constituyendo una zona de muestra V que contiene nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ modificadas con la sarcosina oxidasa y con la peroxidasa de rábano picante. Al lado de la zona de muestra V, longitudinalmente a lo largo de la tira 1, sigue una malla de fibra de vidrio de 5 cm de largo en forma de una zona de reacción D que contiene 4-amino-2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazolin-5-ona (AAP) y sal de sodio de ácido 3-(N-etil-3-metilanilina) propanesulfónico (TOPS). A la zona de reacción D le sigue la zona de detección E, la cual consiste en un papel de filtro Whatman (2, 5) de 2 cm de largo, y el segundo extremo de la tira 1 se compone de una zona final E de cera de abeja de 0,5 cm de largo.

Zona de muestra

Una membrana de vidrio que contiene nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ (liofilizadas) modificadas con sarcosina oxidasa que tiene una actividad de 1 a 15 kU/l y con peroxidasa de rábano picante que tiene una actividad de 1 a 20 kU/l utilizando quitosano mediante el método descrito anteriormente de modificación de nanopartículas de oro utilizando una solución de unión.

Solución para la zona de muestra

Las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ en una cantidad de 0,1 a 0,5 de un ácido acético al 1% con las enzimas unidas de sarcosina oxidasa que tiene una actividad de 1 a 15 kU/l y de peroxidasa de rábano picante que tiene una actividad de 1 a 20 kU/l utilizando quitosano mediante el método descrito anteriormente de unión de nanopartículas de oro utilizando una solución de unión.

Zona de reacción

Una membrana de vidrio que contiene 4-amino-2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazolin-5-ona (AAP) en una concentración de 0,1 a 5 mM y sal de sodio de ácido 3-(N-etil-3-metilnilina) propanesulfónico (TOPS) en una concentración de 0,1 a 4 mM en la solución de fosfato de 40 a 60 mM con un pH de 8,0.

Solución de sustrato para la zona de reacción

4-amino-2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazolin-5-ona (AAP) en una concentración de 0,1 a 5 mM y sal de sodio de ácido 3-(N-etil-3-metilnilina) propanesulfónico (TOPS) en una concentración de 0,1 a 4 mM en la solución de fosfato de 40 a 60 mM con un pH de 8,0.

Solución de desarrollo

Nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ en una cantidad de 0,1 a 0,5 mg/ml en la solución de fosfato de 40 a 60 mm con un pH de 8,0 con las enzimas unidas de sarcosina oxidasa que tiene una actividad de 1 a 15 kU/l y peroxidasa de rábano picante que tiene una actividad de 1 a 20 kU/l utilizando quitosano mediante el método descrito anteriormente de unión de nanopartículas de oro utilizando una solución de unión y fenol de 1 a 25 mM.

Procedimiento de preparación de la tira de diagnóstico

Una lámina de vidrio de 1,5 cm de largo y de 0,4 cm de ancho se sumerge dentro de la solución para la zona de muestra V (véase más arriba) y se deja secar a temperatura de laboratorio durante 30 minutos, o se puede liofilizar a una temperatura de -50°C , a 3 mbar, durante 5 horas.

La segunda lámina de vidrio de 10 cm de largo y de 0,4 cm de ancho se sumerge dentro de la solución de sustrato para la zona de reacción D (véase más arriba) y se deja secar a temperatura de laboratorio durante 30 minutos, o se puede liofilizar a una temperatura de -50°C , a 3 mbar, durante 5 horas.

Una lámina de plástico de 6 cm de largo y de 0,4 cm de ancho que tiene una membrana de nitrocelulosa pegada sobre la superficie, recubierta con una cinta adhesiva. Un papel de filtro de 2,5 cm de largo y de 0,4 cm de ancho que constituye la zona de detección E se pega sobre la membrana después de quitar la cinta del extremo. El extremo de la lámina con la zona de detección E de 0,5 cm de largo se satura en cera de abeja caliente durante 5 segundos, y se deja secar durante 1 minuto sobre la tira 1 a temperatura de laboratorio. La zona de cera de abeja sirve como la zona final F para frenar el aumento por la acción capilar. Después, la cinta adhesiva se quita del otro extremo de la membrana de 1,5 cm de largo, y una malla de fibra de vidrio saturada con una solución para la zona de muestra V (véase más arriba) se pega sobre ella una vez que se haya secado por completo o que se haya liofilizado; la solución contiene nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ con enzimas unidas cerradas dentro de la jaula de quitosano. Por

encima de la zona de muestra V, se pega la segunda malla de fibra de vidrio, la cual constituye la zona de reacción D, saturada con una solución de sustrato para la zona de reacción D que contiene 4-amino-2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazolin-5-ona (AAP) y la sal de sodio de ácido 3-(N-etil-3-metil-anilina) propanesulfónico (TOPS). Esta malla de fibra de vidrio de 10 cm de largo se pliega por la mitad y se pega a la membrana de manera que uno de sus extremos se superponga en 0,5 cm al principio de la zona de detección E y su otro extremo se superponga en 0,5 cm al extremo de la tira con la zona de muestra V. La zona de reacción D está pegada mediante una cinta a la membrana, de manera que la cinta se pega a 0,5 cm del extremo de la zona de muestra V y el otro extremo de la cinta está pegado a la zona de detección E – sobre la membrana de vidrio (Figura 7).

Método de determinación cualitativa y cuantitativa de la sarcosina en plasma utilizando una tira de detección

Utilizando un cuentagotas que forma parte del kit de diagnóstico, se añade una gota (50µ l) de la muestra 3 del plasma dentro del recipiente con la solución de desarrollo 2 (véase más arriba) de 100 µl en volumen. Se deja que el contenido del recipiente incube durante 15 minutos. Tras la incubación, se sumerge la zona de muestra V de la tira de diagnóstico 1 en el recipiente y se deja sumergida durante 30 minutos para que aumente por la acción capilar. La reacción se produce en la zona de reacción D y el resultado se manifestará en la zona de detección E de la tira 1 (Figura 7) por su coloración. La intensidad de la coloración de la zona de detección E se evalúa por densitometría y la curva de calibración de la dependencia de la señal de la concentración de sarcosina indicará la concentración de sarcosina dentro de la muestra de plasma. Si no se produce la coloración, la prueba es negativa.

Aplicabilidad industrial

La prueba es adecuada para la determinación rutinaria de la sarcosina en una muestra biológica, especialmente de orina. El diseño es apropiado para la determinación rutinaria de la sarcosina en laboratorios de diagnóstico y posiblemente en hogares. En función de esta prueba, la información sobre el nivel de la sarcosina dentro de una muestra desconocida se puede obtener con una alta sensibilidad. La determinación es viable en un período de tiempo de entre 0,5 a 1 hora utilizando aparatos normalmente disponibles. En comparación con los procedimientos convencionales (el análisis de los aminoácidos por cromatografía líquida), el tiempo de determinación es significativamente más corto y se requiere un procesamiento mínimo de la muestra.

Lista de números de referencia

- 1 – tira de diagnóstico
- 2 – solución de desarrollo
- 3 – muestra
- A – ancho de la tira
- B – largo de la tira
- V – zona de muestra
- D – zona de reacción
- E – zona de detección
- F – zona final

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de unión de las enzimas sarcosina oxidasa y peroxidasa de rábano picante a las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ utilizando quitosano, **caracterizado en que** tanto el quitosano en una concentración de 4 a 12 mg/ml en una solución de ácido acético al 1%, como la solución de unión de 70 a 500 μl en volumen que contiene sarcosina oxidasa con una actividad de 1 a 45 kU/l, como la peroxidasa de rábano picante con una actividad de 15 a 35 KU/l en una solución de fosfato en una concentración de 40 a 60 mM y con un pH de 8,0, y el tripolifosfato que tiene una concentración de 1,7 a 3,2 mM en el ambiente de ácido acético al 1% con un pH de 4 se agregan a las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ de en una cantidad de 20 – 60 mg, las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ con la adición del quitosano, de la solución de unión y del tripolifosfato posteriormente se incuban durante 60 minutos a temperatura ambiente y se agitan constantemente, lo cual da como resultado la formación de las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ con las enzimas unidas con un tamaño de 20 a 60 nm, las cuales después se almacenan a oscuras a una temperatura comprendida entre los 5 y los 10°C.
- 10
- 15
- 20 2. Método de unión de enzimas a las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ según la reivindicación número 1, **caracterizado en que** las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ formadas con las enzimas unidas se liofilizan durante 5 horas a una temperatura de -50°C y a una presión de 3 mbar.
- 25 3. Uso de las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ con las enzimas unidas obtenidas con el método según las reivindicaciones que van de la 1 a la 2 para la determinación cualitativa y cuantitativa de la sarcosina en una cantidad de 1 a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en una muestra biológica.
- 30 4. Uso de las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ según la reivindicación número 3, **caracterizado en que** la muestra biológica es orina, suero, plasma o esperma.
- 35 5. Método de determinación cualitativa y cuantitativa de la sarcosina en una cantidad de 1 a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en una muestra biológica utilizando las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ con las enzimas unidas por el método según las reivindicaciones que van de la 1 a la 2, **caracterizado en que** estas nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ que tienen una concentración de 0,1 a 0,5 mg/ml en una solución de fosfato de 40 a 60 mM con un pH de 8,0, se añade la solución de sustrato de reacción, la cual contiene 4-amino-2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazolin-5-ona, sal de sodio de ácido 3-(N-etil-3-metil-anilina) propanesulfónico, fenol y la muestra, donde la concentración de 4-amino-2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazolin-5-ona es de 0,1 a 5 mM, la concentración de la sal de sodio de ácido 3-(N-etil-3-metil-anilina), propanesulfónico es de 0,1 a 4 mM y la concentración del fenol es de 1 a 25 mM en el volumen total de la mezcla de reacción con la muestra, donde la proporción de volumen de la solución de sustrato de reacción respecto de la muestra es de 5:1, la mezcla de reacción después se incuba durante 30 minutos a una temperatura de 25°C a 40°C mientras se produce la coloración, cuya intensidad se mide por fotometría a 546 nm, y después la curva de calibración de la dependencia de absorbancia de la concentración de sarcosina indicará la concentración de sarcosina dentro de la muestra.
- 40
- 45
- 50 6. Método de determinación cualitativa y cuantitativa de la sarcosina en la muestra biológica según la reivindicación número 5, **caracterizado en que** la muestra biológica es orina, suero, plasma o esperma.
- 55 7. Tira de diagnóstico (1) para la determinación cualitativa y cuantitativa de la sarcosina en una muestra biológica en una cantidad de 1 a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ utilizando las nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ con las enzimas unidas por el método según las reivindicaciones que van de la 1 a la 2, **caracterizada en que** se compone de una zona de muestra (V) saturada de una solución para la zona de muestra (V) que contiene nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ en una cantidad de 0,1 a 0,5 mg/ml en el ambiente del
- 60

- ácido acético al 1% con las enzimas unidas desarcosina oxidasa que tiene una actividad de 1 a 15 kU/l y deperoxidasa de rábano picante que tiene una actividad de 1 a 20 kU/l, de una zona de reacción (D) saturada con una solución de sustrato para la zona de reacción (D) que contiene 4-amino-2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazolin-5-ona que tiene una concentración de 0,1 a 5 mM, sal de sodio de ácido 3-(N-etil-3-metil-anilina) propanesulfónico que tiene una concentración de 0,1 a 4 mM en una solución de fosfato de 40 a 60 mM con un pH de 8,0, así como también de una zona de detección (E) y de una zona final (F).
- 5
- 10 8. Tira de diagnóstico (1) según la reivindicación número 7, **caracterizada en que** consiste en una membrana de 0,4 cm de ancho y de 6 cm de largo, la cual en un extremo está provista de una zona de muestra (V) de 1,5 cm de largo, al lado de la cual hay una zona de reacción (D) de 5 cm de largo en el sentido longitudinal de la tira (1), y a la zona de reacción (D) le sigue una zona de detección (E) de 2 cm de largo, y el otro extremo de la tira (1) está provisto de una zona final (F) de 0,5 cm de largo, donde la zona de reacción (D) se superpone al extremo de la tira (1) con la zona de muestra (V) en 0,5 cm y la zona de detección (E) longitudinalmente en 0,5 cm.
- 15
- 20 9. Tira de diagnóstico (1) según las reivindicaciones que van de la 7 a la 8, **caracterizada en que** la zona de muestra (V) y la zona de reacción (D) están hechas de malla de fibra de vidrio, la zona de detección (E) está hecha de papel de filtro y la zona final (F) está hecha de cera de abeja.
- 25 10. Método de determinación cualitativa y cuantitativa de la sarcosina en una muestra biológica utilizando la tira de diagnóstico (1) según las reivindicaciones que van de la 7 a la 9, **caracterizado en que** la muestra (3) se agrega a una solución de desarrollo (2) que contiene nanopartículas de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$ en una cantidad de 0,1 a 0,5 mg/ml en la solución de fosfato de 40 a 60 mM con un pH de 8,0 con las enzimas unidas de sarcosina oxidasa con una actividad de 1 a 15 kU/l y deperoxidasa de rábano picante con una actividad de 1 a 20 kU/l y fenol que tiene una concentración de 1 a 25 mM, donde la proporción de volumen de la solución de desarrollo respecto de la muestra es de 5:1, después se deja incubar la solución de desarrollo con la muestra durante 15 minutos, luego la zona de muestra (V) de la tira de diagnóstico (1) se sumerge dentro de la solución y se deja inmersa para que incube durante 30 minutos mientras se produce la coloración de la zona de detección (E), cuya intensidad se evalúa por densitometría, y después la curva de calibración de la dependencia de la señal de la concentración de sarcosina indicará la concentración de sarcosina dentro de la muestra.
- 30
- 35
- 40 11. Método de determinación cualitativa y cuantitativa de la sarcosina en la muestra biológica según la reivindicación número 10, **caracterizado en que** la muestra biológica es orina, suero, plasma o esperma.

Fig. 1

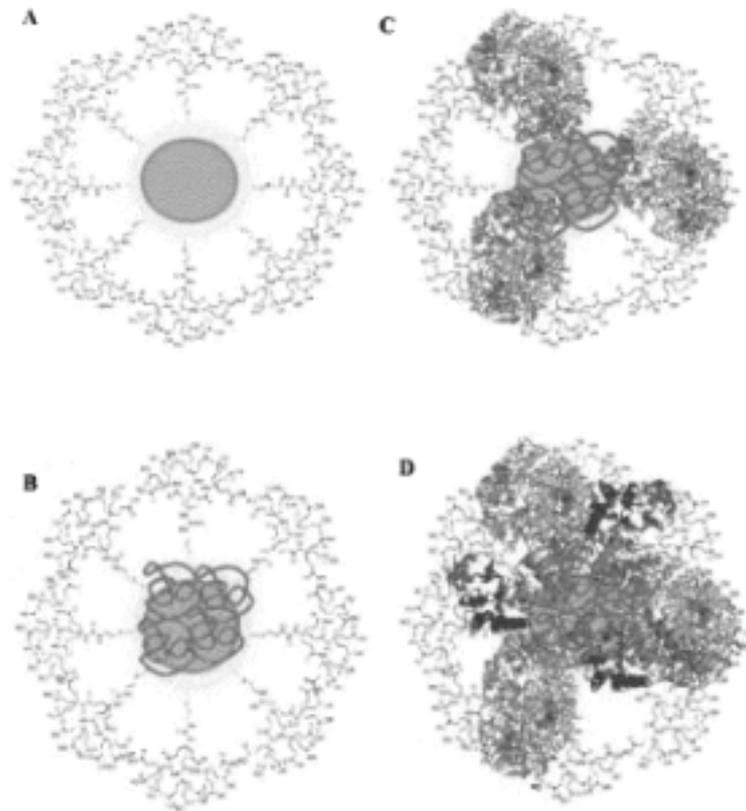


Fig. 2

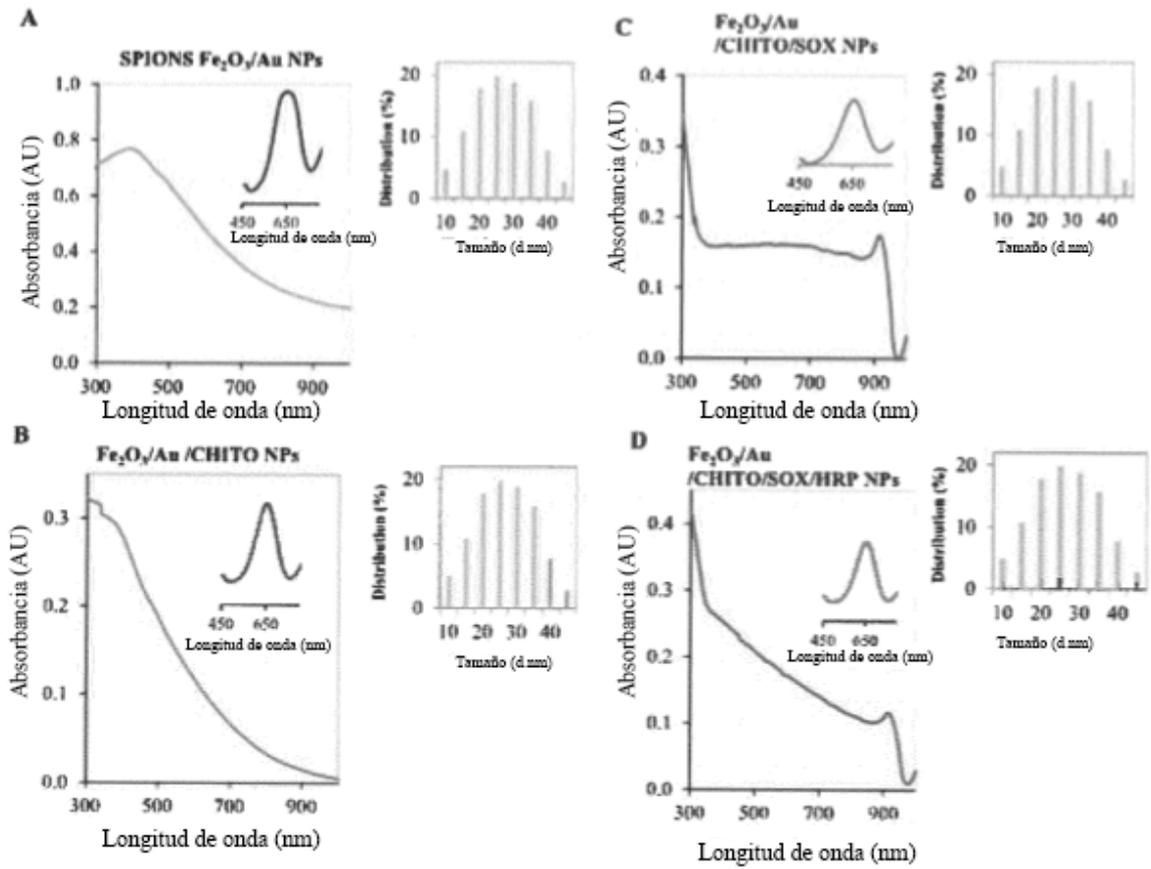


Fig. 3

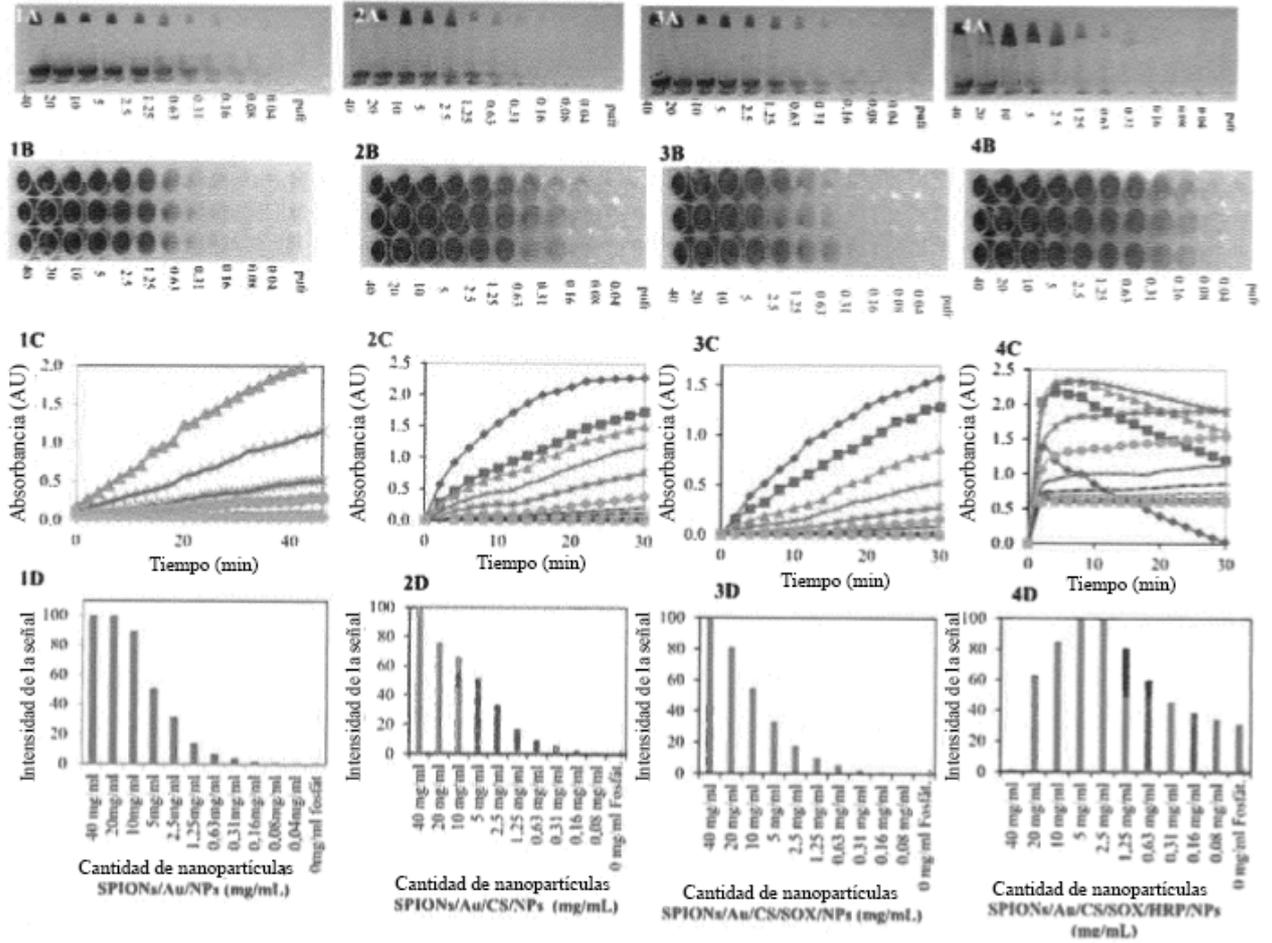


Fig. 4

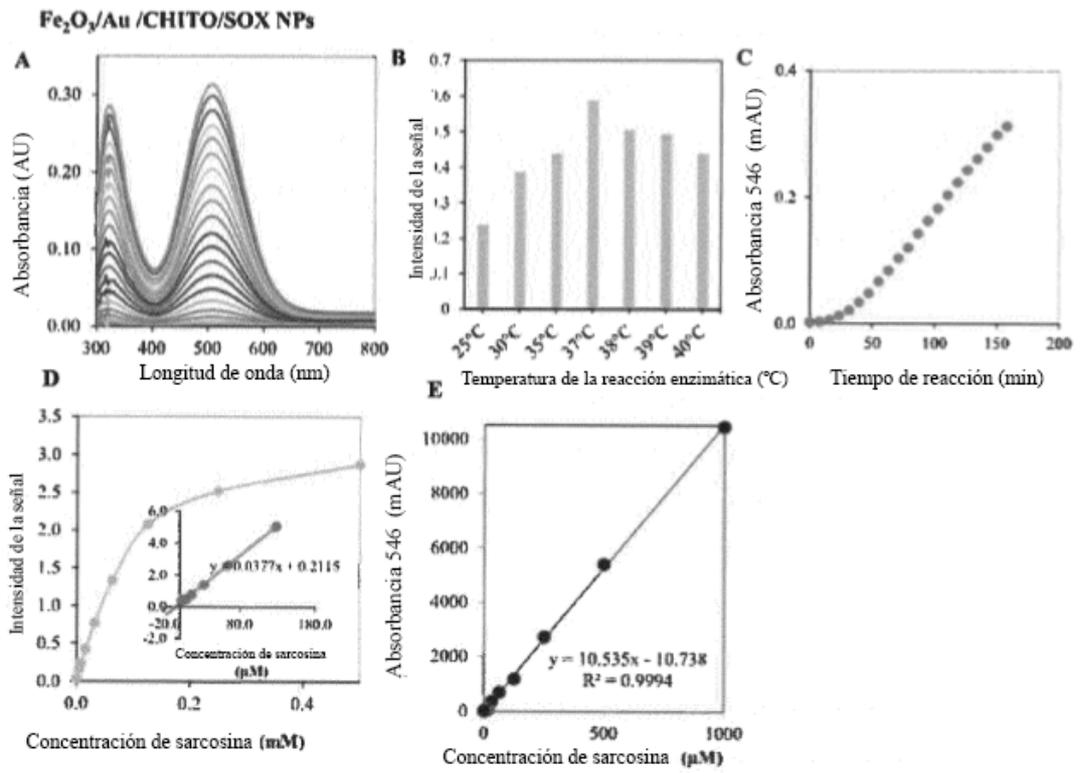


Fig. 5

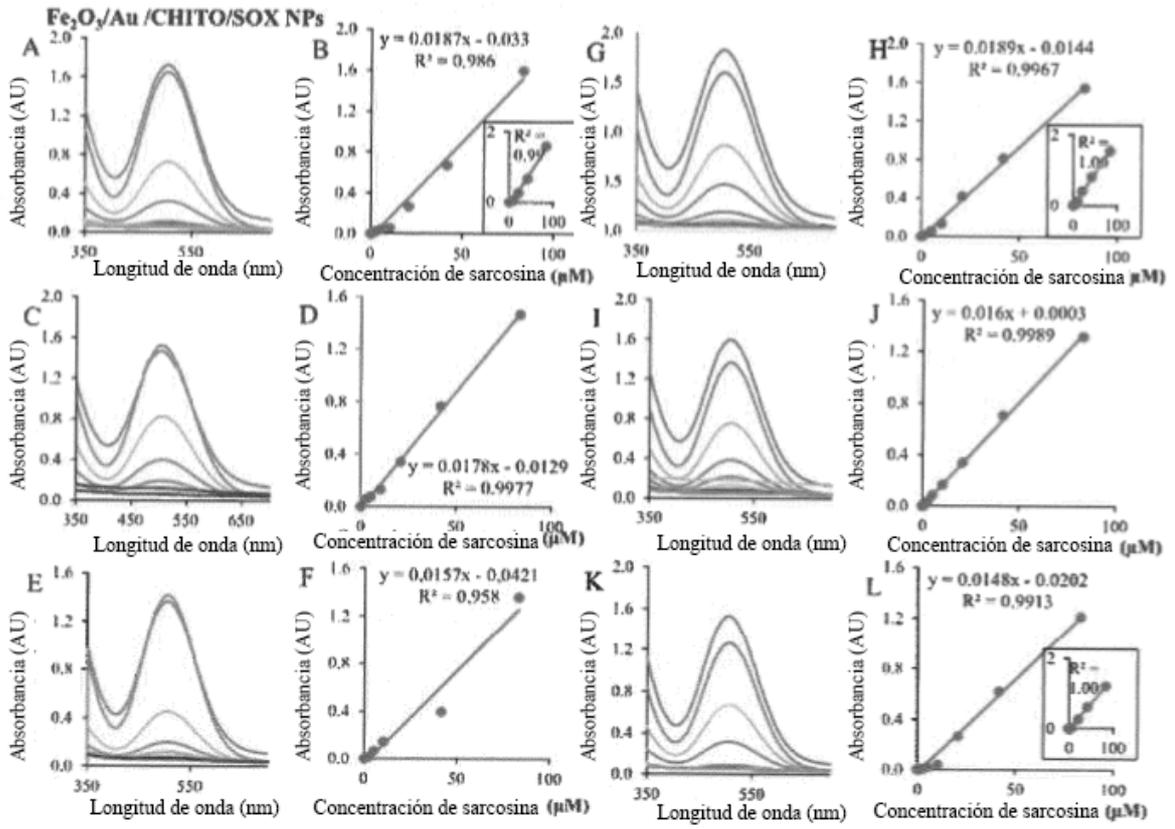
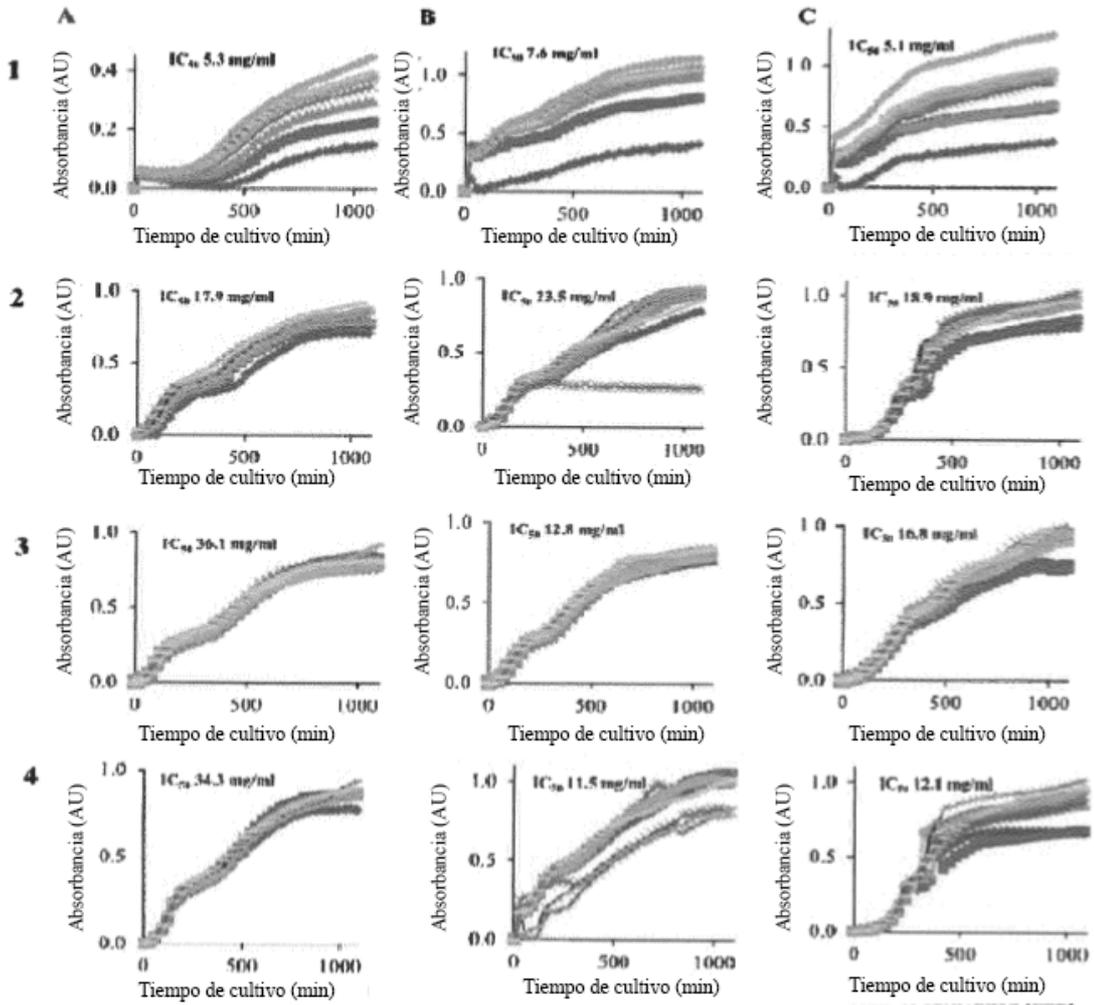


Fig. 6



6/7

Fig. 7

