

P. 19.415

A 46.538 - Bl. Case US

799.388/4566



256364

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

de

P A T E N T E     D E     I N V E N C I O N

fomulada el 9 de Marzo de 1960, con el Núm. 256.364

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de WARNER-LAMBERT PHARMACEUTICAL COMPANY, entidad norteamericana, establecida en 201 Tabor Road, Morris Plains, Nueva Jersey, Estados Unidos de América, por:

"UN DISPOSITIVO INDICADOR DE ENSAYO PARA DETERMINAR UNA  
SUSTANCIA BIOQUIMICA EN UN FLUIDO DEL CUERPO"

=====

Esta invención se refiere a una nueva tira de indicador adecuada para reacciones bioquímicas que abarcan la determinación de ciertas sustancias en líquidos del organismo y se refiere también a un método para el empleo de la tira en el análisis de líquido del organismo.

El análisis de líquidos del organismo tales como sangre, orina y análogos, se ha utilizado desde hace tiempo como instru-

256364



5       mento diagnóstico para determinar los niveles de sustancia producidos por reacciones bioquímicas cuya presencia o ausencia, en mayor o menor grado, indica un estado anormal. Ciertas sustancias bioquímicas primarias pueden detectarse directamente mediante ensayos colorimétricos relativamente sencillos. Otras solamente pueden determinarse por una reacción secundaria que comprende el tratamiento del líquido del organismo con varios sistemas reactivos y midiendo luego uno o más de los productos de reacción formados.

10       Algunas de estas últimas sustancias tales como nitrógeno de urea, tripsina e histidina pueden determinarse mediante reacciones químicas adecuadas en las que se forman y se miden productos de reacción gaseosos. Por ejemplo, el nitrógeno de urea en el suero puede determinarse convirtiendo el nitrógeno de la urea en amoniaco y midiendo el amoniaco desprendido. La medición de la concentración de nitrógeno de urea es un procedimiento diagnóstico importante, ya que los niveles elevados de nitrógeno de urea en el suero, se observan en pacientes que padecen uremia, nefritis crónica, hemorragia grave o leve obstrucción intestinal. Igualmente el nivel de tripsina enzimática en el suero aumenta en enfermedades del páncreas y el nivel del suero de este enzima puede determinarse midiendo su efecto en la reacción basada en la hidrólisis del hidrocloreto de  $\alpha$ -benzoil-L-arginina amida, que deja en libertad amoniaco. Pueden determinarse niveles de histidina en orina por  
15  
20  
25       una reacción que libera amoniaco en presencia del enzima histidina desaminasa o por la liberación de anhídrido carbónico en presencia del enzima histidina  $\alpha$ -descarboxilasa. Los niveles anormales de histidina son indicativos de embarazo.

30       En todos los ensayos arriba mencionados, la cantidad de gas que queda en libertad por la reacción secundaria tiene que deter-



252364

minarse para medir la concentración de la sustancia bioquímica primaria en el líquido del organismo ensayado. En los métodos analíticos hasta ahora disponibles, ha sido necesario absorber el gas formado por la reacción secundaria en una solución absorbente y determinar luego la concentración en la solución por volumetría o por otros medios. La naturaleza complicada de este método analítico ha exigido que su ejecución solo pudieran realizarla técnicos de laboratorio expertos. Igualmente, el procedimiento de ensayo exige, por su propia naturaleza, mucho tiempo.

Es un objeto de esta invención proporcionar un indicador de ensayo para la determinación cuantitativa rápida y sencilla de sustancias bioquímicas en líquidos del organismo que pueden experimentar una reacción química para formar un gas medible.

Otro objeto de esta invención es proporcionar un método para medir la cantidad de sustancias bioquímicas en líquidos del organismo, que puede realizarse por personal no especializado.

Otros objetos y las ventajas de esta invención se deducirán de la descripción que sigue.

Los objetos antes mencionados se cumplen de acuerdo con esta invención mediante una tira de papel u otro material absorbente que se impregna de tal manera que proporciona el sistema reactivo químico requerido para llevar a cabo la reacción química deseada de la sustancia bioquímica que se quiere medir para desprender un gas y, además, está provista de un indicador sensible al gas desprendido durante la reacción química que produce un cambio de color en grado proporcional a la cantidad de la sustancia bioquímica contenida en el líquido del organismo que se ensaya. El uso de la tira de indicador de acuerdo con esta invención consiste simplemente en insertar la tira en un tubo que contiene un pequeño volumen medido del líquido orgánico que se quiere ensayar, y comparar

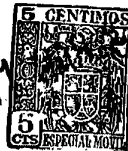
256364



luego el área del papel impregnada con el indicador, con un gráfico de colores patrón, al cabo de un intervalo de tiempo definido. Por consiguiente, se comprenderá fácilmente que el uso de la tira de indicador de la presente invención elimina los métodos analíticos complejos del procedimiento de ensayo disponible hasta  
5 ahora para medir la cantidad contenida en un líquido orgánico de ensayo de una sustancia bioquímica por su reacción química para formar un gas. La eliminación de estos procedimientos complicados y lentos de los métodos seguidos hasta ahora en esta técnica supone  
10 que el ensayo puede realizarse por personal no especializado. Por otra parte, no se necesita equipo de laboratorio, a excepción de un simple tubo de ensayo, resultando de aquí que pueden realizarse simultáneamente muchos ensayos diferentes.

De acuerdo con esta invención, se proporciona un indicador analítico para la determinación cuantitativa de la cantidad de  
15 una sustancia bioquímica en un líquido orgánico que comprende una tira de material absorbente impregnada con una pluralidad de sistemas reactivos en bandas que se extienden por la anchura de dicha tira, comprendiendo dichas bandas una primera banda de reacción en  
20 un extremo de dicha tira impregnada uniformemente con un sistema reactivo adaptado para experimentar una reacción con la citada sustancia bioquímica para formar un gas, una segunda banda adyacente a dicha primera banda de reacción, impregnada uniformemente con  
25 un material capaz de liberar el citado gas de la solución, una tercera banda adyacente a dicha segunda banda, impregnada uniformemente con un impregnante inerte capaz de prevenir el flujo capilar a través de dicha tercera banda y una cuarta banda adyacente a dicha  
30 tercera banda, impregnada uniformemente con un indicador capaz de cambiar el color en un grado proporcional a la cantidad de dicho gas formado por dicha reacción.

256364



Las figuras 1 y 2 ilustran la construcción de tiras de indicador de acuerdo con dos aspectos de esta invención.

5 Con referencia al dibujo, la tira de indicador comprende una banda de reacción 1, en un extremo de la tira y extendiéndose se a lo ancho de la misma. La tira en el área ocupada por la banda de reacción se impregna con un sistema reactivo químico que experimenta la reacción química deseada con la sustancia bioquímica cuya presencia en el líquido orgánico que se analiza ha de medirse. El sistema está diseñado de tal manera que deja en libertad en último extremo un gas, según se describe más adelante.

10 Adyacente a la banda de reacción hay una banda de liberación de gas que se extiende a lo ancho de la tira. La tira en el área ocupada por la banda de liberación de gas está impregnada con una sustancia química para liberar de la solución el gas formado por la reacción química que tiene lugar en la banda de reacción. Se proporciona una banda de barrera 3 que se extiende a lo ancho de la tira. La tira, en el área ocupada por la banda de barrera, está impregnada uniformemente con un material resinoso que tapa los poros en la tira para prevenir cualquier desplazamiento del líquido orgánico que se está examinando, asegurando así que cualquier cambio de color en el indicador se debe únicamente al gas desprendido en la reacción. Adyacente a la banda de barrera, hay una banda de indicador 4 que se extiende a lo ancho de la tira. La tira, en el área ocupada por la banda de indicador, está impregnada uniformemente con una sustancia capaz de neutralizar el gas desprendido y con un indicador que cambia de color dentro de los límites de pH que se alcanzan en la reacción de neutralización. El área de la banda de indicador que cambia de color es proporcional a la cantidad de gas formado por la reacción.

30 Las bandas de reacción, liberación de gas, barrera e indica-

253364



5           dor son comunes a los aspectos de esta invención en ambas figuras 1 y 2.

          En la estructura que se ilustra en la figura 2, algunas áreas de la tira están sin impregnar para formar bandas en blanco la, 2a y 4a. Igualmente, en el aspecto que se ilustra en la figura 2, se proporcionan capas de cinta sensible a la presión 5, que se indican cortadas parcialmente en la figura 2, para cubrir ambos lados de la tira en las áreas ocupadas por las bandas de reacción y liberación de gas.

10           Posteriormente se dará una explicación más completa de la construcción y función de las diversas bandas sobre las tiras de indicador preparadas de acuerdo con la invención, según se indica a manera de ejemplo por los aspectos ilustrados en las figuras 1 y 2.

15           El material que comprende la tira está formado de un material absorbente, es decir, cualquier material en hojas, absorbente, poroso que sea insoluble en agua o en disolventes orgánicos, pueda absorber y retener los líquidos aplicados al mismo, tenga una resistencia satisfactoria en húmedo y no reaccione en presencia de los diversos reactivos aplicados al mismo o con los líquidos orgánicos que se han de ensayar. El papel es un material absorbente muy eficaz para uso en la invención, Puede ser de cualquier espesor, siendo efectivos los espesores comprendidos entre 0,2 y 1 milímetro. La tira ha de tener una longitud y una anchura suficientes para permitir la impregnación de los diversos reactivos en bandas y, sin embargo, ser suficientemente pequeña para encajar en tubos de ensayo pequeños durante el uso. Es eficaz una tira que tenga una longitud de, aproximadamente, 6,35 a 10,16 cm. y una anchura de, aproximadamente 0,31 a 1,27 cm. Al dar las dimensiones de las diversas bandas sobre la tira en toda esta memoria descriptiva y

256364



en las reivindicaciones, el término "longitud" se utiliza para la dimensión en una dirección paralela a la dimensión longitudinal de la tira.

5 La tira se impregna con una serie de materiales diferentes para formar bandas paralelas adyacentes entre sí como se indica en la figura 1 o separadas entre sí a lo largo de la longitud de la tira por zonas sin impregnar, según se indica en la figura 2. La banda de reacción está situada adyacente a un extremo de la tira o separada del mismo por una banda en blanco o sin impregnar, según se indica por la banda en blanco la en la Fig. 2. La banda de reacción se impregna uniformemente con un sistema reactivo que, al contacto con un líquido orgánico, reacciona con un material - contenido en dicho líquido para producir un gas. El sistema de - reacción abarca el reactivo específico y un amortiguador adapta-  
10 do para mantener el pH en el valor óptimo para la reacción en -  
15 cuestión.

En la determinación de nitrógeno de urea del suero, la banda de reacción se impregna con ureasa y un amortiguador adaptado para mantener el pH de la banda entre 7 y 8 y preferiblemente a  
20 7,6, aproximadamente, cuando está en contacto con suero. Estos límites de pH son óptimos para la actividad del enzima ureasa sobre el nitrógeno de urea para dar amoníaco. Un amortiguador fosfato, por ejemplo una mezcla de  $K_2HPO_4$  y  $KH_2PO_4$  es particularmente efectivo para obtener el pH deseado de 7,6, aproximadamente,  
25 en la banda de reacción. La cantidad del reaccionante y amortiguador en la banda de reacción de una tira de indicador de acuerdo con esta invención puede variar dentro de amplios límites, con tal que la banda de reacción contenga, por lo menos, un exceso del - sistema reaccionante.

30 Como es natural, la banda de reacción puede impregnarse con

256364



otros reaccionantes en el caso de la determinación de sustancias diferentes del nitrógeno de urea en líquidos orgánicos. Para medir tripsina de suero, la banda de reacción se impregna con hidrocloreto de  $\alpha$ -benzoil-L-arginina amida. Para la determinación de histidina, la banda de reacción se impregna con histidina  $\alpha$ -descarboxilasa y un amortiguador adaptado para mantener el pH durante el ensayo entre 4, aproximadamente y 5, aproximadamente, o con histidina desaminasa y un amortiguador adaptado para mantener el pH durante el ensayo entre 7,5, aproximadamente y 8,5, aproximadamente .

La longitud de la banda de reacción puede variarse siendo efectivos los límites comprendidos entre 0,95 y 1,6 cm.

En el aspecto ilustrado en la figura 2, una banda en blanco o sin impregnar la está situada en el extremo de la tira de indicador adyacente a la banda de reacción. Esta banda en blanco es particularmente útil cuando las áreas de reacción y liberación de gas están cubiertas con cinta sensible a la presión como se indica en la figura 2. La banda en blanco la, proporciona un área controlada para absorción de líquido en la tira desde el líquido que se esta examinando. El líquido se desplaza desde la banda en blanco por acción capilar, hasta la banda de reacción. La banda en blanco tiene normalmente una longitud de 0,31 a 0,95 cm.

Al impregnar la tira para formar la banda de reacción, se emplea una solución del sistema reactivo. Por ejemplo, al preparar tiras de indicador para uso en la determinación de nitrógeno de urea del suero, el área de la tira que ha de formar la banda de reacción se impregna con una solución de ureasa y amortiguador en un disolvente adecuado. Puede utilizarse agua o mezclas de agua con disolventes orgánicos volátiles, tales como etanol. Preferiblemente, el disolvente debe contener la mayor cantidad posible de disol-



256364<sup>31</sup>

5      vente orgánico volátil para facilitar el secado de la tira después de impregnación. Pueden usarse preparaciones de ureasa comerciales como fuente de enzima ureasa o pueden prepararse extractos de ureasa recientes por extracción a partir de fuentes naturales del enzima tal como harina de haba de soja o harina de haba "jack" con etanol acuoso.

10      La banda de liberación de gas está situada sobre la tira adyacente a la banda de reacción, y está impregnada uniformemente con un material adaptado para liberar de la solución el gas formado por reacción química entre la sustancia bioquímica contenida en el líquido orgánico que se ensaya y el sistema reactivo contenido en la banda de reacción. La reacción que se produce en la banda de reacción se verifica en fase líquida, puesto que la banda de reacción queda saturada con el líquido orgánico que se ensaya por desplazamiento del líquido que asciende por la tira por acción capilar. El gas formado por la reacción química se disuelve inicialmente en la fase líquida con la que se satura la banda de reacción. Para proporcionar una medición exacta de la cantidad de la sustancia bioquímica contenida en el líquido orgánico examinado, es evidente que el gas formado por la reacción que se produce en la banda de reacción tiene que liberarse por completo de la solución. Esto es particularmente cierto puesto que la cantidad de gas formada es extraordinariamente pequeña. El pH en la banda de reacción para realizar la reacción con la sustancia bioquímica es frecuentemente tal que por lo menos una porción del gas formado tenderá a permanecer en solución.

30      Por ejemplo, en la determinación de nitrógeno de urea en suero, la banda de reacción se amortigua para dar un pH entre 7 y 8, aproximadamente. Bajo tales condiciones ligeramente alcalinas, por lo menos una porción del amoniaco formado en la reacción

256364



permanecerá en solución.

5 El material empleado para impregnar la tira para formar la banda de liberación de gas está diseñado para dar un pH en la banda de liberación de gas a un valor adecuado para asegurar la liberación completa de la solución del gas formado por la reacción. En el caso de tiras de indicador de acuerdo con esta invención en las que se libera amoniaco en la banda de reacción, la banda de liberación de gas debe estar impregnada con un material básico para dar un pH de 10, por lo menos, en la banda de liberación de gas cuando está húmeda. Se prefieren límites de pH entre 10 y 11. Cuando el sistema reactivo contenido en la banda de reacción reacciona con la sustancia bioquímica contenida en el líquido orgánico que se ensaya para dar anhídrido carbónico, la banda de liberación de gas debe estar impregnada con un material ácido adecuado para producir un pH menor de 4 en la banda de liberación de gas cuando está húmeda.

15 Cuando el ensayo se realiza utilizando una tira de indicador de acuerdo con esta invención, el líquido orgánico que se ensaya se mueve, por acción capilar, en sentido ascendente por la tira, entrando primeramente en contacto con la banda de reacción donde tiene lugar la reacción y se forma un gas. Este gas se disuelve inicialmente en el líquido con el cual se satura la tira durante el ensayo. El líquido que contiene el gas formado por la reacción continúa moviéndose en sentido ascendente por la tira, por acción capilar, hasta la banda de liberación de gas. En la banda de liberación de gas, debido a la presencia del material con el que está impregnada la banda, el pH del líquido cambia a un valor que asegura la liberación completa del gas de la solución. La banda de liberación de gas en tiras de indicador de acuerdo con esta invención proporciona una medición exacta de la cantidad de la sustan-



406084

cia bioquímica contenida en el líquido orgánico que se ensaya, puesto que asegura la liberación completa de la solución del gas formado por la reacción.

5 El material ácido o básico empleado debe ser no higroscópico ni deliquescente, no volátil, soluble en agua y estar exento de toda tendencia al arrastre o efectos destructores sobre el material absorbente de la tira. Entre los materiales básicos adecuados figuran los carbonatos, fosfatos y acetatos de metal alcalino, tal como fosfato potásico, carbonato de litio, carbonato sódico, 10 carbonato potásico, acetato sódico, acetato potásico, fosfato sódico y análogos. El carbonato potásico es un material básico particularmente efectivo para uso en la banda de liberación de gas en tiras preparadas para la medición de nitrógeno de urea en suero u otros materiales que, bajo las condiciones del ensayo, dejan en 15 libertad amoniaco. Entre los materiales ácidos convenientes para uso en la banda de liberación de gas cuando se libera anhídrido carbónico bajo las condiciones del ensayo, figuran: ácido benzóico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido salicílico, ácido sulfosalicílico, ácido tartárico, ácido oxálico y análogos.

20 La cantidad de material ácido o básico que ha de emplearse tiene que ser suficiente para asegurar que se producirá la liberación de gas efectiva durante todo el periodo de ensayo, y ha de ser suficiente para superar toda basicidad o acidez en el líquido orgánico que se está ensayando que se desplaza por acción capilar 25 en sentido ascendente por la tira. En el caso de tiras de indicador para medir nitrógeno de urea en 0,1 a 0,2 ml. de suero, es particularmente efectiva la presencia de una cantidad de carbonato potásico comprendida entre 0,05 y 1,0 mgrs., aproximadamente.

30 La longitud de la banda de liberación de gas es normalmente la misma que la de la banda de reacción, es decir, entre 0,95 y



1,5 cm.

La banda de liberación de gas se impregna de una manera análoga a la descrita al tratar de la impregnación de la banda de reacción. El material ácido o básico, en agua o preferiblemente en una mezcla de agua y disolvente orgánico volátil, se aplica en la tira en el área que ha de ser ocupada por la banda de liberación de gas y la tira se seca luego para eliminar el disolvente.

De acuerdo con el aspecto de la presente invención ilustrado en la figura 2, las bandas de reacción y de liberación de gas se cubren sobre ambas superficies de la tira con cinta de cierre, tal como cinta de papel sensible a la presión. El uso de cinta es particularmente conveniente por varias razones. En primer lugar, sirve para dar rigidez a la tira en la región donde se humedece con el líquido orgánico que se está ensayando. Sin el uso de la cinta, la tira tiene tendencia a hundirse contra los lados del tubo donde se realiza el ensayo, con la posibilidad de que, por la acción capilar, el líquido del cuerpo pueda no solamente esquivar el área de reacción, sino humedecer el área de indicador, dando lugar así a resultados erróneos. En segundo lugar, la presencia de la cinta impermeable al gas permite la liberación de todo el gas desde la parte superior de la banda de liberación de gas, lo más próximo posible a la banda de indicador, mejorando así la exactitud y la reproducibilidad de los resultados. Por último, la cinta protege el enzima ureasa en la banda de reacción del contacto del aire durante el almacenaje de la tira y asegura una larga duración de la tira en almacén.

La banda de barrera está situada sobre la tira adyacente a la banda de liberación de gas o separada de la misma por una banda en blanco 2a según se indica en la figura 2. El objeto de la banda de barrera en la tira de indicador de acuerdo con esta in-



258384

vención es prevenir el desplazamiento de líquido por acción capilar en sentido ascendente de la tira. La presencia de una barrera efectiva asegurará que cualquier cambio de color en la banda de indicador se debe solamente al gas liberado de la banda de liberación de gas y no a la acidez o a la alcalinidad de cualquiera de los reactivos contenidos en las otras bandas de la tira. Puede usarse cualquiera de los impregnantes de papel corrientes que son adecuados para prevenir el flujo capilar de líquido a través del papel, para crear una banda de barrera efectiva en la tira de indicador de acuerdo con esta invención. El impregnante usado debe ser inerte, es decir, químicamente estable, y mantenerse tenazmente en el material absorbente de la tira. Por ejemplo, la tira en el área que forma la banda de barrera puede impregnarse con materiales tales como pintura, barniz, esmaltes, composiciones plásticas, y análogos. Entre las composiciones plásticas útiles figuran polímeros y copolímeros de cloruro de vinilo, acetato de vinilo, ácido acrílico y sus esteres, ácido metilacrílico y sus esteres y análogos. Se ha encontrado que el metilacrilato de metilo polimerizado es un plástico particularmente efectivo para uso en la creación de una banda de barrera en la tira de indicador de la presente invención. La longitud de la banda de barrera ha de ser suficiente para asegurar que no hay desplazamiento de líquido a través de la misma hacia la banda de indicador y, sin embargo, debe ser suficientemente corta de manera que el gas desprendido de la banda de liberación de gas tenga que recorrer solo una corta distancia antes de entrar en contacto con la banda de indicador. Se prefiere una longitud de 0,15 a 0,63 cm.

De acuerdo con el aspecto de la presente invención ilustrada en la figura 2, en el que las bandas de reacción y liberación de gas se cubren con cinta plástica, es conveniente proporcionar



23038431

un área controlada para liberación de gas desde el borde superior de la banda de liberación de gas.

Para crear la banda de barrera, el material impregnante se aplica a la tira en el área que ha de ser ocupada por la banda de barrera. Para asegurar una viscosidad satisfactoria para impregnación, los impregnantes se aplican de modo corriente en forma de soluciones en disolventes volátiles y, después de impregnación, se deja secar la tira para asegurar la evaporación completa de los disolventes. En el caso de impregnantes tales como pinturas y barnices, la tira puede someterse a la acción del calor durante el secado para acelerar el curado del impregnante.

La tira de indicador de acuerdo con la invención está provista de una banda de indicador adyacente a la banda de barrera. La función de la banda de indicador es absorber el gas liberado de la banda de liberación de gas y proporcionar un medio para medir su cantidad. El área de la tira ocupada por la banda de indicador se impregna uniformemente con una sustancia adecuada para neutralizar el gas desprendido (una sustancia ácida, cuando se libera amoníaco y una sustancia básica, cuando se libera anhídrido carbónico) y un indicador adecuado para cambiar de color en el punto final de la neutralización o antes del mismo. El indicador empleado ha de presentar un cambio de color fácilmente apreciable dentro de los límites de pH alcanzados durante la neutralización que se produce en la tira. Esta reacción tiene lugar en condiciones prácticamente secas, puesto que la única humedad presente es la que corresponde al contenido de humedad en equilibrio del papel que, normalmente, está comprendido dentro de los límites de 5 a 10%, en peso aproximadamente.

En el caso de tiras de indicador en que el gas desprendido es amoníaco ( como sucede al medir nitrógeno de urea de suero) las



235394

sustancias ácidas que son agentes neutralizantes útiles en la banda de indicador comprenden ácidos tales como ácido cítrico, ácido oxalíco, ácido maléico, ácido sulfosalicílico, ácido benzoíco, ácido tartárico y análogos. Los límites de pH del indicador empleado para marcar el punto final de la neutralización son críticos. El indicador tiene que estar completamente en la forma ácida en presencia de la sustancia ácida presente en la banda de indicador. Además, el indicador tiene que estar completamente en su forma básica a un pH no mayor que aquel en el que el amoniaco no es ya absorbido en la banda de indicador. Se ha encontrado que no hay absorción de amoniaco en papel impregnado con una sustancia ácida a un pH mayor de 6,5, aproximadamente. Así, el indicador debe estar en su forma básica a un pH de 6,5 o menos. Por lo tanto, los indicadores útiles abarcan azul de bromotimol, rojo de alizarina S, azul de bromofenol, púrpura de bromocresol, verde de bromocresol, rojo de metilo y análogos. Cuando la banda de indicador se impregna con un ácido relativamente fuerte, tal como ácido sulfosalicílico, se prefiere generalmente un indicador tal como azul de bromofenol, puesto que cambia de color dentro de límites de pH de 3 a 4,6. Con un ácido más débil, tal como ácido cítrico, da resultado satisfactorio un indicador más alcalino tal como púrpura de bromocresol, que cambia de color entre límites de pH 5,2 a 6,7. El verde de bromocresol es un indicador preferido y una tira de indicador en la que la banda de indicador está impregnada con ácido tartárico y verde de bromocresol, es particularmente efectiva para medir nitrógeno de urea de suero.

En el caso de tiras de indicador en que el gas desprendido es anhídrido carbónico, la banda de indicador se impregna con una sustancia básica adaptada para neutralizar el anhídrido carbónico desprendido y un indicador. Entre las sustancias básicas útiles



236364

se incluyen carbonatos, fosfatos y acetatos de metal alcalino tal como fosfato potásico, carbonato de litio, carbonato sódico, carbonato potásico, acetato sódico, acetato potásico, fosfato sódico y análogos. El indicador ha de estar por completo en su forma básica en presencia de la sustancia básica presente en la banda de indicador y tiene que estar totalmente convertido en su forma ácida a un pH no menor que aquel en el que el anhídrido carbónico no es ya absorbido en la banda de indicador. Entre los indicadores útiles figuran fenolftaleína, timolftaleína, azul de timol, púrpura de metacresol y análogos.

La banda de indicador se forma por contacto de la tira en el área que ha de ser ocupada por la banda de indicador, con una solución en un disolvente volátil de la sustancia ácida o básica y el indicador, después de lo cual se seca la tira.

Como el gas desprendido de la banda de liberación de gas se valora realmente en la banda de indicador, es evidente que la sensibilidad de la tira de indicador puede variarse fácilmente ajustando la cantidad de la sustancia ácida o básica aplicada a la banda de indicador. Para tiras de indicador de gran sensibilidad, solo hay presente en la banda de indicador una pequeña cantidad de la sustancia ácida o básica, mientras que, para tiras destinadas a medir mayores cantidades de la sustancia bioquímica contenida en el líquido orgánico, se utiliza una cantidad mayor de sustancia ácida o básica. La cantidad de sustancia ácida o básica aplicada para formar la banda de indicador se ajusta variando la concentración de la solución impregnante o el volumen aplicado a la tira, o ambas cosas.

El cambio de color que se observa en la banda de indicador es proporcional a la cantidad de gas desprendida de la banda de liberación de gas la cual, a su vez, es proporcional a la canti-

256364



dad de la sustancia bioquímica contenida en el líquido orgánico que se está ensayando. Con una concentración pequeña de la sustancia bioquímica, la banda de indicador cambia de color solo sobre una proporción pequeña de su longitud, mientras que con concentraciones progresivamente mayores, exhiben un cambio de color proporciones cada vez mayores de la longitud de la banda de indicador. Así, pues, la tira de indicador de esta invención proporciona medios para medir con exactitud la cantidad de la sustancia bioquímica contenida en el líquido orgánico que se está ensayando.

De acuerdo con la realización de la presente invención ilustrada en la figura 2, se proporciona una banda en blanco o sin impregnar 4a por encima de la banda de indicador en la parte superior de la tira. Esto es conveniente para proporcionar un área en la que la tira de indicador pueda mantenerse sin posibilidad de ninguna contaminación de la banda de indicador por sustancias de las manos del técnico que está realizando el ensayo. La banda en blanco 4a debe tener preferiblemente una longitud de 1,27 cm., por lo menos.

Al preparar tiras de indicador de acuerdo con la presente invención, una hoja de material absorbente, por ejemplo, papel, que tenga una anchura igual a la longitud de la tira acabada, puede impregnarse en las áreas adecuadas con los diversos sistemas reactivos necesarios para producir las bandas en el área acabada, y la hoja se seca para eliminar todos los disolventes volátiles presentes en las soluciones impregnantes. En la impregnación, hay que tomar precauciones para asegurar que no hay superposición de los diversos sistemas reactivos aplicados. Después de secar, la hoja se corta transversalmente en tiras estrechas que pueden secarse luego en desecadores y empaquetarse en

256364



cajas, en tubos de ensayo con tapón o en otros recipientes adecuados.

Al emplear las tiras de indicador preparadas de acuerdo con la presente invención, se coloca una pequeña cantidad del líquido orgánico corporal que se quiere ensayar, por ejemplo 0,1 a 0,2 ml., aproximadamente, en un pequeño tubo de ensayo que tiene una profundidad por lo menos ligeramente mayor que la longitud de la tira de indicador. Se inserta luego una tira en el tubo con la banda de reacción hacia el fondo y se deja que transcurra la reacción durante un tiempo controlado. Al terminar el periodo de ensayo, se compara la altura del color desarrollado en la banda de indicador con un gráfico de colores patrón que se ha preparado previamente realizando el ensayo con una cantidad conocida del material que se quiere ensayar. Como la reacción produce un gas, es particularmente importante realizar el ensayo al margen de cualquier corriente de aire que pueda dispersar el gas e impedirle que entre en contacto con la banda de indicador de la tira.

Los siguientes ejemplos que ilustran la preparación de tiras de indicador para uso en la medición de nitrógeno de urea en suero, se presentan para explicar más a fondo la invención presente.

#### EJEMPLO I

Una hoja de papel Whatman 3 MM, de 10,16 cm. de ancho, 30,48 cm. de largo y 0,4 mm. de espesor, se selecciona para hacer tiras de indicador útiles en la medición de nitrógeno de urea en suero. Uno de los lados de 30,48 cm. se designa como borde de referencia.

Se aplica una perla de solución de resina de metacrilato de metilo (revestimiento claro Krylon Nº 150, Krylon, Inc., Norristown Pa. E.U.) sobre la hoja para impregnar el papel en una banda de 0,31 cm. de ancho, situada a 3,81-4,12 cm. del borde de referencia.

256364



La hoja se deja secar en aire en reposo para expulsar todo el disolvente de la banda impregnada (banda de barrera). Se aplica una cantidad suficiente para saturar el papel.

Se prepara un extracto de ureasa, amortiguado a pH 7,6, de la manera siguiente:

Se disuelven en agua 616 mgrs. de  $K_2HPO_4$ , 63,2 mgrs. de  $NH_4PO_4$  y 0,1 ml. de amortiguador de acetato (preparado mezclando 15 gramos de acetato sódico con 1 ml. de ácido acético glacial y diluyendo a 100 ml. con agua) y se diluye en agua hasta 7 ml. de volumen final. El volumen se lleva a 10 ml. por adición de alcohol etílico de 95%. Se añaden 3 gramos de harina de habas "jack" y la mezcla se agita durante 15 minutos a la temperatura ambiente. El líquido cremoso verde-amarillento se centrifuga bajo una fuerza de 1000 g. a 0° C. durante 1 hora para dar un extracto de ureasa amortiguado amarillo translucido.

El extracto se aplica para impregnar la hoja en una banda de 1,27 cm. de ancho, a 0,63-1,89 cm. del borde de referencia. La hoja se deja secar en aire en reposo a la temperatura ambiente. Se necesita una cantidad de 0,5 ml., aproximadamente, de extracto.

Se aplica luego una solución de carbonato potásico 0,05N en alcohol etílico de 70% para impregnar la hoja en una banda de 1,27 cm. de ancho, desde 1,89-3,17 cm. del borde de referencia.

La hoja se deja secar nuevamente a la temperatura ambiente en aire en reposo. Se necesita una cantidad de 0,48 ml. de solución.

Se aplica cinta de papel (cinta "Scotch" Nº 267, amarillo, Minnesota Mining and Manufacturing Co.), de 2,54 cm. de ancho, con un rodillo de caucho sobre la tira de 0,63 a 3,17 cm. del borde de referencia.

256364 31



La anchura de la hoja se reduce después a 8,25 cm. cortando dicha distancia desde el borde de referencia.

5 Se aplica una solución de 0,1 % en peso de púrpura de bromocresol en ácido cítrico 0,008 M en alcohol etílico de 95% en una banda de 1,27 cm. de ancho desde 4,12-5,4 cm. del borde de referencia. La hoja se deja secar en aire en reposo. Se necesita una cantidad de 0,5 ml. de solución, aproximadamente. La hoja se corta después perpendicularmente al borde de referencia en 48 tiras, cada una de 8,25 cm. de largo y 0,63 cm. de ancho. Las tiras se empaquetan en tubos de ensayo Pyrex, se secan en un desecador y se tapan los tubos.

10

#### EJEMPLO II

15 Se emplea una hoja larga de papel Whatman 3 MM, de 8,25 cm. de ancho y 0,4 milímetros de espesor, como material de reserva para hacer tiras de indicador para medir nitrógeno de urea suero. Uno de los bordes largos del papel se designa como borde de referencia.

20 Se aplica un extracto de ureasa amortiguado, preparado según se ha descrito en el Ejemplo I, para impregnar la hoja en una banda de 1,27 cm. de ancho, ocupando la distancia desde 0,63 a 1,89 cm. del borde de referencia. Se aplica una cantidad de 0,5 ml. de extracto por cada 30,48 cm. de papel.

25 Se aplica luego una solución de 4,5 por ciento de carbonato potásico en peso en alcohol etílico al 50 por ciento, sobre la hoja, en una banda de 1,27 cm. de ancho que se extiende desde 1,89 a 3,17 cm. del borde de referencia. Se aplica una cantidad de 0,5 ml. de la solución por cada 30,48 cm. de papel. La hoja se seca a temperatura ambiente en aire en reposo para evaporar los disolventes presentes en las soluciones de carbonato potásico y extracto

30



256384

de ureasa. Las porciones impregnadas de la hoja se cubren luego por los dos lados de la hoja con una tira de 2,54 cm. de anchura de cinta de papel (cinta "Scotch" N° 267, amarilla, Minnesota Mining and Manufacturing Co.). La cinta de papel cubre de este modo la hoja en una banda desde 0,63 a 3,17 cm. desde el borde de referencia.

Se aplica una solución de resina de metacrilato de metilo polimerizado (revestimiento claro Krylon N° 150, Krylon, Inc. Norristown, Pa., E.U. 2 partes - alcohol etílico - una parte) en una cantidad suficiente para saturar el papel en una banda de 0,31 cm. de ancho que se extiende desde 3,81 cm. a 4,12 cm. desde el borde de referencia.

Se aplica luego una solución que contiene 0,2 por ciento de verde de bromocresol en peso y 0,6 por ciento de ácido tartárico en peso en alcohol etílico de 95 por ciento, en una banda de 1,27 cm. de ancho que se extiende desde 4,12 cm. a 5,4 cm. desde el borde de referencia. Se necesita una cantidad de 0,5 ml. de solución por cada 30,48 cm. de papel. La hoja se deja luego secar en aire en reposo para evaporar los disolventes presentes en las soluciones de resina y ácido tartárico-verde de bromocresol. La hoja se corta luego perpendicularmente al borde de referencia en una serie de tiras cada una de 8,25 cm. de largo y 0,63 cm. de ancho. Las tiras de indicador resultantes se empaquetan en tubos de ensayo, se secan en un desecador y los tubos se tapan.

Las tiras de indicador preparadas de acuerdo con los ejemplos tienen las siguientes características, con referencia a la figura 2:



23354

31 N. 6

Referencia	Descripción	Distancia desde el borde de referencia (cm.)	Longitud de la banda (cm.)
<u>1a</u>	Banda en blanco	0 — 0,63	0,63
5 1	Banda de reacción(&)	0,63— 1,89	1,27
2	Banda de liberación de gas (&)	1,89— 3,17	1,27
2a	Banda en blanco	3,17— 3,81	0,63
3	Banda de barrera	3,81— 4,12	0,31
4	Banda de indicador	4,12— 5,39	1,27
10 4a	Banda en blanco	5,39— 8,25	2,85

(&) Bandas cubiertas con cinta de papel (referencia 5)

15 Tiras de indicador preparadas como se ha descrito anteriormente sirven para la determinación cuantitativa de nitrógeno de urea presente en 0,1 a 0,2 ml. de suero humano. La exactitud del análisis utilizando estas tiras es  $\pm 3$  mgrs. de N de urea en 100 grs. de suero en el que los niveles de nitrógeno de urea son del orden de 10 a 60 mgrs./100 ml. de suero.

20 Al medir la cantidad de nitrógeno de urea presente en suero utilizando una tira de indicador preparada como se ha descrito en los ejemplos anteriores, se colocan 0,1 ml. de suero en un pequeño tubo de ensayo. El tubo debe tener una longitud total por lo menos mayor de la de la tira de indicador que, como en el ejemplo, tiene una longitud de 8,25 cm. La tira se inserta en el tubo de ensayo que contiene el suero de tal manera que la banda en blanco 1a esté en contacto con el suero. Se tapa entonces el tubo de ensayo, se  
25 coloca en posición vertical y, al cabo de 30 minutos, se compara el aspecto de la banda de indicador con un gráfico de colores patrón que se ha preparado haciendo el ensayo con suero que contenga  
30 cantidades variables de nitrógeno de urea.



258384

Tan pronto como la banda en blanco la entra en contacto con el suero contenido en el tubo de ensayo, el suero comienza a desplazarse en sentido ascendente por la tira, por acción capilar, y hacia la banda de reacción. La ureasa amortiguada contenida en la banda de reacción reacciona con nitrógeno de urea presente en el suero para formar amoniaco. En presencia del amortiguador fosfato, el pH en la banda de reacción húmeda es 7,6. En estas condiciones, una proporción considerable del amoniaco formado por la reacción química de ureasa con nitrógeno de urea se disuelve en el líquido que moja la banda de reacción. El desplazamiento de líquido en sentido ascendente por la tira continúa por acción capilar llevando líquido que contiene amoniaco disuelto hacia la banda de liberación de gas. El carbonato potásico presente en la banda de liberación de gas se disuelve en el líquido que moja la banda de liberación de gas, haciendo que el pH aumente rápidamente a 10 o más. En estas condiciones alcalinas, el amoniaco disuelto queda en libertad en forma gaseosa y se desprende de la parte superior de la banda de liberación de gas, es decir, en el extremo superior de la cinta de papel que cubre la banda de liberación de gas y la banda de reacción. El amoniaco gaseoso liberado neutraliza la sustancia ácida contenida en la banda de indicador originando un aumento en el pH en la banda de indicador con el cambio de color resultante en el indicador. Debido a la presencia de la banda de barrera que está impregnada con una resina de metacrilato de metilo impermeable, es imposible el flujo capilar del líquido alcalino presente en la banda de liberación de gas hacia la banda de indicador. Por tanto, todo cambio de color observado en la banda de indicador se debe solamente al amoniaco formado por la reacción de ureasa con nitrógeno de urea en el suero que se ensaya.

El cambio de color observado en la banda de indicador ocupa



953364 31

proporciones cada vez mayores de la longitud de la banda de indicador a medida que aumenta la concentración de nitrógeno de urea suero. Por ejemplo, con un periodo de ensayo de 30 minutos, una tira de indicador del Ejemplo II y 0,1 ml. de suero, con un nivel de nitrógeno de urea normal (10 mgrs. por ciento), la banda de indicador acusa una coloración azul que se extiende en sentido ascendente aproximadamente 10 por ciento de la longitud de la banda de indicador. A 30 mgrs. por ciento, una banda azul se extiende en sentido ascendente aproximadamente 30 por ciento de la longitud de la banda de indicador. A 75 mgrs. por ciento, la banda completa de indicador es azul.

A niveles marcadamente elevados de nitrógeno de urea de suero, que pueden llegar hasta 900 mgrs. por ciento en casos de uremia, se producirá un cambio de color neto sobre la longitud total de la banda de indicador en un tiempo de menos de 2 minutos después de que el suero alcanza la banda de liberación de gas. Esto hace que una banda de indicador preparada de acuerdo con esta invención sea extraordinariamente útil en cirugía próxima a la vejiga. Las tiras de indicador de acuerdo con esta invención son también útiles en la selección masiva de grupos de población en los casos en que los métodos hasta ahora empleados han resultado excesivamente complicados.

Se sobrentiende que la descripción detallada precedente se da simplemente a título ilustrativo y que pueden introducirse muchas variaciones sin apartarse del espíritu de la invención.

Esta solicitud que corresponde a las presentadas en los Estados Unidos de América el 13 de Marzo de 1959, bajo el Núm. 799.388 y 25 de Enero de 1960, bajo el Núm. 4566, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.



258364

- N O T A -

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta Patente de Invención en España, por -  
5 VEINTE años, son los siguientes:

10 1º.- Un dispositivo indicador de ensayo para determinar cuantitativamente la cantidad de una sustancia bioquímica en un fluido del cuerpo, caracterizado por una tira de material absorbente impregnada con una pluralidad de sistemas reactivos en bandas que se  
15 extienden a lo ancho de dicha tira, comprendiendo dichas bandas una primera banda de reacción en un extremo de dicha tira uniformemente impregnada con un sistema reactivo adaptado para sufrir una reacción con dicha sustancia bioquímica para formar un gas, una segunda banda adyacente a la primera banda de reacción citada, uniformemente  
20 impregnada con un material destinado a liberar gas desde solución, una tercera banda adyacente a dicha segunda banda uniformemente impregnada con un impregnante inerte destinado a impedir el flujo capilar a través de dicha tercera banda y una cuarta banda adyacente a dicha tercera banda uniformemente impregnada con un indicador  
destinado a cambiar de color en un grado proporcional a la cantidad de dicho gas formada por dicha reacción.

25 2º.- Un dispositivo según el punto 1º, caracterizado porque dicha primera banda de reacción está espaciada desde un extremo de dicha tira por una estrecha banda no impregnada.

30 3º.- Un dispositivo según los puntos 1º o 2º, caracterizado porque dicha tercera banda está espaciada de dicha segunda banda por una estrecha banda no impregnada.

4º.- Un dispositivo según cualquiera de los puntos anteriores, caracterizado porque las partes de dicha tira ocupadas por  
dichas bandas primera y segunda están cubiertas a ambos lados de

250364



dicha tira con capas adherentes de cinta sensible a la presión.

5 5º.- Un dispositivo según cualquiera de los puntos anteriores, caracterizado porque la primera banda de reacción está uniformemente impregnada con un sistema reactivo destinado a sufrir una reacción con dicha sustancia bioquímica para formar amoniaco.

6º.- Un dispositivo según cualquiera de los puntos anteriores, caracterizado porque la segunda banda está uniformemente impregnada con un material básico.

10 7º.- Un dispositivo según cualquiera de los puntos anteriores, caracterizado porque el sistema reactivo en dicha primera banda comprende ureasa y un tampón destinado a mantener el pH dentro de dicha primera banda de reacción entre aproximadamente 7 y aproximadamente 8 cuando está mojado con dicho fluido.

15 8º.- Un dispositivo según cualquiera de los puntos anteriores, caracterizado porque dicha segunda banda está impregnada uniformemente con un material básico destinado a mantener el pH dentro de dicha segunda banda a por lo menos 10 cuando está mojada con dicho fluido.

20 9º.- Un dispositivo según cualquiera de los puntos anteriores, caracterizado porque dicha cuarta banda está uniformemente impregnada con una sustancia ácida y un indicador destinado a cambiar de color dentro de la gama del pH por debajo de 6,5 aproximadamente.

25 10º.- Un dispositivo según el punto 9º, caracterizado porque dicha sustancia ácida es ácido cítrico, tartárico o sulfosalicílico y dicho indicador es púrpura de bromocresol, verde de bromocresol o azul de bromofenol.

30 11º.- Un dispositivo según cualquiera de los puntos 1º a 4º, caracterizado porque la primera banda de reacción está impregnada uniformemente con un sistema reactivo destinado a sufrir reacción

256364



con dicha sustancia bioquímica para formar bióxido de carbono.

12º.- Un dispositivo según el punto 11º, caracterizado porque la segunda banda está uniformemente impregnada con un material ácido.

5            13º.- Un dispositivo según cualquiera de los puntos anteriores, caracterizado porque dichas bandas primera y segunda están cubiertas a ambos lados de dichas tiras por capas adherentes de cinta sensible a la presión.

10            14º.- Un dispositivo según cualquiera de los puntos anteriores, caracterizado porque dicha primera banda de reacción tiene una longitud de unos 10 mms. a unos 16 mms. y está separada desde un extremo de dicha tira por una banda no impregnada que tiene una longitud de aproximadamente 3 mms. a aproximadamente 10 mms., dicha segunda banda tiene una longitud de unos 10 mms. a aproximadamente  
15            16 mms., dicha tercera banda tiene una longitud de unos 1,6 mms. a aproximadamente 7 mms. y está separada de dicha segunda banda por una banda sin impregnar que tiene una longitud de unos 3 mms. a unos 10 mms. y dicha cuarta banda tiene una longitud de unos 10 mms. a unos 16 mms. y está separada del extremo opuesto de dicha tira por una distancia de por lo menos 12 mms.  
20

          15º.- Un método para determinar cuantitativamente la cantidad de una sustancia bioquímica en un fluido del cuerpo, caracterizado por añadir un volumen pequeño y medido de dicho fluido a un tubo de ensayo, insertar en dicho tubo de ensayo una tira de  
25            un material absorbente impregnado con una pluralidad de sistemas reactivos en bandas que se extienden a lo ancho de la tira; comprendiendo dichas bandas una primera banda de reacción en un extremo de dicha tira uniformemente impregnada con un sistema reactivo destinado a sufrir una reacción con dicha sustancia bioquímica para formar un gas, una segunda banda adyacente a dicha pri-  
30

256364



5 mera banda de reacción, uniformemente impregnada con un material destinado a liberar dicho gas desde solución, una tercera banda adyacente a dicha segunda banda uniformemente impregnada con un impregnante inerte destinado a impedir el flujo capilar a través de dicha tercera banda y una cuarta banda adyacente a dicha tercera banda impregnada uniformemente con un indicador destinado a cambiar de color en un grado proporcional a la cantidad de dicho gas formado por dicha reacción, siendo dicha tira insertada en dicho tubo de ensayo de manera que dicha primera banda de reacción sea mojada con dicho fluido y, despues de un intervalo de tiempo

10 definido, comparar el color desarrollado en dicha cuarta banda con una carta de colores patrón.

16º.- Un dispositivo indicador de ensayo para determinar una sustancia bioquímica en un fluido del cuerpo.

15 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en el dibujo que se acompaña y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de veintiocho hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 31 MAR 1960

P.A.

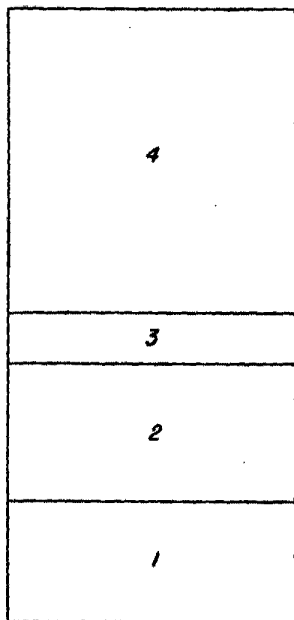
*[Handwritten signature]*  
Departamento de Investigación y Desarrollo

AVS. *[Handwritten signature]*

19415

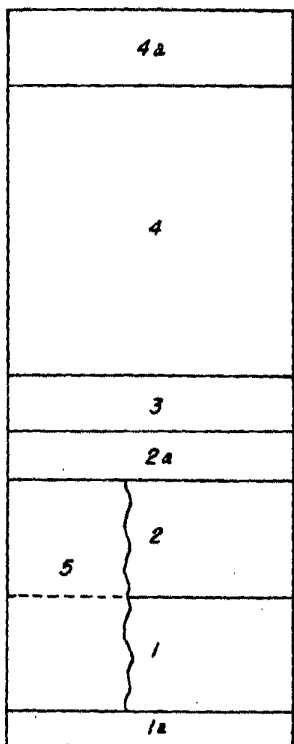


Fig. 1



256364

Fig. 2



*Carla*