

MINISTERIO DE INDUSTRIA 20 JUL. 1978

REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
Inscrito en el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente documentación y en el contenido de la presente solicitud.



ESPAÑA

PATENTE DE INVENCION

ES	11	NUMERO	A I
	21	459.894	
	22	FECHA DE PRESENTACION	
		17-6-77	

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO	18-6-76	SUECIA
7606999-6	29-11-76	SUECIA
7613334-7		

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G01N	

54 TITULO DE LA INVENCION
METODO PARA FABRICAR UN DISPOSITIVO PARA PRUEBAS DE REACTIVOS:

71 SOLICITANTE(S)
ALFA-LAVAL AB

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Postfack- S-147 00 TUMBA - SUECIA

72 INVENTOR (ES)
Ann-Marie Märta Skyle Grönberg, de nacionalidad sueca, el cual ha cedido sus derechos a la compañía solicitante.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU

POOR QUALITY

La presente invención se refiere a un método para fabricar un dispositivo destinado a efectuar pruebas de reactivos, que comprende un portador y al menos dos sustancias sustentadas por dicho portador y susceptibles de ser activadas al utilizar el dispositivo de pruebas mencionado. La invención comprende asimismo un dispositivo para efectuar pruebas de reactivos fabricado de acuerdo con este método.

Los dispositivos para pruebas de reactivos del tipo mencionado anteriormente se han fabricado hasta ahora de varios modos diferentes. De acuerdo con un método, se encapsula una de dichas sustancias en las denominadas microcápsulas, las cuales se suspenden en un líquido que contiene la otra sustancia, y después se aplican las microcápsulas y el líquido a un portador en una u otra forma. La fabricación de tales dispositivos para efectuar pruebas de reactivos resulta bastante costosa.

Según otro método, un dispositivo para pruebas de reactivos del tipo mencionado anteriormente se fabrica impregnando un portador provisto de una estructura porosa en dos zonas, separadas una de otra, con líquidos que contienen las sustancias. La fabricación de estos dispositivos para prueba de reactivos resulta complicada en razón de las dificultades que existen para impregnar uno e igual portador con dos líquidos diferentes.

La presente invención tiene por objeto proporcionar un método para fabricar un dispositivo destinado a efectuar pruebas de reactivos del tipo que se menciona anteriormente, cuyo método resulta simple y barato, y que produce dispositivos para prueba de reactivos que hacen posible un análisis cuantitativo de gran precisión.

De acuerdo con la presente invención, en un método

para fabricar un dispositivo para efectuar pruebas de reactivos del tipo mencionado a modo de introducción, se aplican al menos dos líquidos, cada uno de los cuales contiene una de dichas sustancias, directamente a una superficie del portador de tal manera que dichas sustancias permanecerán sobre la superficie separadas por un espacio intermedio predeterminado a lo largo de la misma, utilizándose técnicas de impresión conocidas per se para obtener dicho espacio intermedio predeterminado.

Con preferencia se aplica al portador una de dichas sustancias de tal modo que permanece fija al mismo incluso al utilizar el dispositivo de prueba de reactivos que se indica.

De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, las sustancias en cuestión se aplican a dicha superficie del portador en una pluralidad de lugares, separados entre sí por pequeños espacios intermedios, como por ejemplo puntos y/o rayas sobre la superficie. Los citados lugares de aplicación pueden mezclarse sobre la superficie.

La invención es aplicable a varios sistemas indicadores o de pruebas de reactivos. Únicamente a título de ejemplo se hace referencia a las patentes de EE.UU. Nos. 3 092 463, 3 511 608, 3 549 328 y 3 926 732.

Según se menciona anteriormente, según una forma de realización preferida de la invención, las sustancias que actúan cuando se utiliza el dispositivo indicador, se aplican a una pluralidad de puntos situados sobre la superficie del portador con espacios intermedios muy reducidos entre los mismos. Esto sin embargo no significa que el ámbito de la invención se halle limitado a casos en los cuales sean necesarios espacios intermedios de orden microscópica. Incluso en tales casos, en que las distancias entre las sustancias deban ser algo mayores, por

ejemplo de aproximadamente 1 mm, también es aplicable la invención. Tal acción recíproca entre diferentes sustancias sobre la superficie de un portador de un dispositivo para pruebas de reactivos es también posible en los casos en que el espacio intermedio entre las sustancias sea de esta dimensión, si un líquido susceptible de ser puesto en contacto con el dispositivo de prueba del reactivo ha de ser capaz de penetrar a través de las sustancias a fin de proporcionar un medio de difusión, por ejemplo para parte de una de las sustancias en su desplazamiento hacia la otra sustancia. En tal caso es obvio que se precisa la máxima precisión en lo que respecta al espacio intermedio entre dichas sustancias, posiblemente una precisión del orden de algunas centésimas de milímetro.

La presente invención tuvo su origen cuando el inventor por pura casualidad entró en conocimiento de los detalles relativos a las técnicas de impresión convencionales. El inventor comprobó que un texto o lámina impresa puede constar de una pluralidad de puntos diminutos, situados a distancias microscópicas uno de otro, cuyas distancias no pueden normalmente detectarse a simple vista. El inventor pudo asimismo darse cuenta de que una lámina impresa en color, que el ojo percibe como de un solo color, puede de hecho estar compuesta de una pluralidad de puntos de diferentes colores. Así una imagen que la retina percibe como verde puede consistir en una pluralidad de puntos azules y amarillos.

El conocimiento adquirido por el inventor sobre las técnicas de impresión convencionales le condujo a realizar el único potencial de técnicas de impresión para aplicar dos o más sustancias reactivas a la superficie de un portador para pruebas de reactivos, determinándose de antemano con precisión

el espacio de separación entre dichas sustancias.

5 Por consiguiente, el dispositivo para pruebas de reactivos según la presente invención se fabrica según técnicas de impresión, conocidas per se, como impresión en fotogra- bado, lo cual significa que las sustancias, disueltas en di- solventes apropiados, se aplican a la superficie del portador por medio de cilindros de impresión dotados de diminutas de- presiones o poros de diferentes profundidades.

10 El estarcido de seda forma asimismo parte de técni- cas de impresión bien conocidas. Esto significa que la sustan- cia en cuestión se disuelve en un disolvente apropiado que se presiona a través de un tamiz dotado de finas mallas. El tamiz se coloca en torno a un cilindro giratorio.

15 Existen varios tipos de técnicas de impresión, cono- cidas per se, que generalmente no se denominan "convencionales". Son por ejemplo diferentes clases de técnicas de impresión sin placa, como impresión electrostática directa, impresión elec- trostática indirecta e impresión por chorro de tinta, que últi- mamente han cobrado más y más importancia.

20 Impresión electrostática directa significa que se crean directamente cargas electrostáticas y se mantienen sobre papel especialmente revestido que posee una capa conductora cubierta por una capa aislante. La carga electrostática es re- velada y convertida en imagen visible por medio de un vehículo impresor que puede ser un líquido que contenga la sustancia reactiva deseada.

25 Impresión electrostática indirecta es un procedimien- to de impresión en offset en el cual se mantiene la carga elec- trostática en una superficie intermedia (tal como un tambor) y solamente el vehículo impresor, en este caso polvo, que con-

30

tiene la sustancia reactiva deseada, es transferido y fijado al papel. Este método se utiliza en el sistema de copia denominado Xerox [®].

5 La impresión por chorro de tinta se ha desarrollado con gran rapidez últimamente. Existen muchos sistemas diferentes, pero todos ellos se basan en flujos continuos o discontinuos de chorros de líquido muy finos que se dirigen con gran precisión en la dirección deseada hacia el portador en cuestión.

10 Puede utilizarse cualquier tipo de técnicas gráficas de reproducción para poner en práctica la presente invención.

Respecto a la forma de realización de la invención según la cual se aplican las sustancias a una pluralidad de puntos con espacios intermedios entre sí muy reducidos, conviene hacer observar que existe la ventaja de que un cambio de color, debido a la activación de las sustancias mientras se está utilizando el dispositivo de prueba del reactivo, será percibido como un cambio de color simultáneo sobre un área relativamente amplia. (Las partes circundantes del portador del dispositivo de prueba del reactivo deben tener con preferencia el mismo color que tenía dicha superficie antes de producirse el cambio de tonalidad). Tal dispositivo para pruebas de reactivos, que comprenda por ejemplo dos sustancias, facilitará una indicación más exacta de una reacción que haya tenido lugar que un dispositivo de dichas características que disponga de una superficie cubierta con una de las sustancias solamente, que cambie gradualmente su color de una parte a otra, mientras la segunda sustancia se difunde a lo largo de dicha superficie. Así pues, si la referida sustancia se consume completamente antes de haberse difundido por toda el área superficial, con lo cual se producirá un cambio de color justamente en parte de

15
20
25
30

la misma, pueden surgir dudas respecto a la confiabilidad del dispositivo de prueba del reactivo. También se mejora la posibilidad de utilizar un dispositivo para pruebas de reactivos para llevar a cabo un análisis cuantitativo, si se produce un cambio de color en un área superficial relativamente amplia.

5

A continuación se describe la presente invención con mayor detalle, haciéndose referencia al plano adjunto. Las figuras 1 - 4 muestran esquemáticamente diferentes formas de realización de un dispositivo para pruebas de reactivos, fabricado de acuerdo con la invención. La figura 5 muestra esquemáticamente, solo a título de ejemplo, la preparación de un dispositivo indicador según las figuras 1 - 4.

10

Refiriéndonos a las figuras 1 - 4, se muestran tres dispositivos para pruebas de reactivos diferentes, previstos por ejemplo para indicar cualquier presencia de cierta enzima en un líquido. Los dispositivos de prueba de reactivos comprenden portadores 1, 2, 3 y 4. Se han imprimido dos sustancias reactivas A, B, mediante técnica de impresión convencional en diversos grafismos sobre estos portadores. Puede preverse un dispositivo para prueba de reactivo de esta clase para sumergirlo en una muestra de dicho líquido y retirarlo de la misma dejando que una fina capa de líquido permanezca sobre el portador. Puede hacerse luego que una de las sustancias contenidas en el portador, por ejemplo la sustancia A, se difunda a través de la fina capa de líquido, en dirección a la otra sustancia, o sea la sustancia B. La enzima susceptible de ser indicada en el líquido puede reaccionar con la sustancia A, o catalizar una reacción química causada por la sustancia A. La sustancia A se consume por tanto total o parcialmente durante su desplazamiento hacia la sustancia B según la concentración

15

20

25

30

de dicha enzima en el líquido. Si la sustancia A es consumida completamente por la enzima contenida en el líquido, no puede producirse ninguna reacción entre las sustancias A y B. Si parte de la sustancia A alcanza la sustancia B, ambas reaccionarán, siendo de tal naturaleza las sustancias A y B que se producirá un cambio de color. Tal reacción hará que a simple vista se observe un cambio de color sobre toda el área superficial sobre la cual se apliquen las sustancias A y B. La intensidad de este cambio de color depende de la concentración de la enzima cuantitativamente estimada en el líquido. Las sustancias A y B pueden por supuesto actuar recíprocamente de uno u otro modo. Por ejemplo, pueden reaccionar entre sí en una primera fase, dando lugar a una sustancia intermedia sin ningún cambio de color. Después en una segunda fase este compuesto intermedio puede reaccionar con cualquier enzima presente para producir un cambio de color. Como alternativa, puede producirse un primer cambio de color cuando se forme la sustancia intermedia, y un segundo cambio de color cuando la sustancia intermedia reaccione con la enzima. Tal sistema haría posible decidir con exactitud, si ya se ha utilizado un dispositivo de prueba de reactivo, incluso si no se produjese la reacción de la enzima en razón de la no existencia de esta última.

En la figura 4 se representa un dispositivo de prueba de reactivo para la indicación de cualquier enzima catalizadora presente en un líquido. El dispositivo para prueba de reactivos comprende un portador 4 y sustancias A, B, y C aplicadas al mismo con técnica de impresión convencional.

La sustancia A contiene una enzima de peroxidasa y un colorante de o-tolidina semejante a tinte. La sustancia B contiene la enzima oxidasa de glucosa y la sustancia C glucosa.

Las enzimas peroxidasa y oxidasa de glucosa se fijan ambas químicamente a partículas de celulosa, que se fijan al portador por medio de cualquier agente aglutinante apropiado utilizando la técnica de impresión. Tras la aplicación de las sustancias A y B quedan en relación inmóvil entre sí y con respecto al portador 4.

El dispositivo de prueba de reactivos descrito funcionará de la siguiente forma cuando se pone en contacto con el líquido que ha de ser sometido a prueba.

- 10 1) La glucosa contenida en la sustancia C es disuelta por el líquido y extendida sobre el portador 4.
- 2) En las proximidades de la sustancia B la enzima oxidasa de glucosa cataliza la reacción entre glucosa y oxígeno, con lo cual se obtiene peróxido de oxígeno como producto de reacción.
- 15 3) El peróxido de hidrógeno se difunde a través del líquido provisto en las áreas comprendidas entre las sustancias A y B, a los puntos ocupados por la sustancia A.
- 4) En los puntos ocupados por la sustancia A el colorante de o-tolidina es oxidado por peróxido de hidrógeno en presencia de la enzima peroxidasa, y se obtiene un color azul.
- 20 5) Si existe alguna enzima catalasa presente en el líquido, el peróxido de hidrógeno se descompone total o parcialmente. La catalasa en elevada concentración en el líquido descompondrá el peróxido de hidrógeno completamente antes de que haya tenido tiempo de difundirse a los puntos ocupados por la sustancia A, y no se obtiene ningún color azul. Una pequeña concentración de catalasa descompondrá el peróxido de hidrógeno parcialmente, y parte del peróxido de hidrógeno se difundirá a los puntos ocupados por la sustancia A
- 25
- 30

produciendo un color azul. Así, en razón de la concentración de enzima catalasa en el líquido se obtiene un cambio de color más o menos intensivo en el dispositivo de prueba del reactivo.

5 Los dispositivos para pruebas de reactivos que se muestran en las figuras 1 - 4 se preparan mediante técnicas de impresión, según se menciona anteriormente. Se hace referencia a la figura 5, que muestra el principio de impresión convencional. Una hoja 5 es alimentada en la dirección de la flecha.

10 Con dos cilindros de impresión 6 y 7 se imprimen sobre la hoja dos líquidos diferentes, que contienen las sustancias A y B. Según ya se ha mencionado existen muchos tipos de cilindros, bien conocidos para los versados en la técnica, por lo cual no se precisa ninguna descripción detallada.

15 Por supuesto es necesario ajustar la viscosidad de los líquidos, que contienen las sustancias en cuestión, según la técnica de impresión escogida.

Ejemplo

20 10 gramos de CMC (carboxi metil celulosa) particulada fueron activados en la forma bien conocida para los expertos en la técnica.

 Oxidasa de glucosa (Boehringer) y peroxidasa (Sigma Co) fueron inmovilizadas en diferentes muestras de la CMC activada, también según métodos bien conocidos. Las mezclas para impresión

25 fueron preparadas de la forma siguiente:

Oxidasa de glucosa/CMC

 Se agitaron 2,5 gramos de GO/CMC húmeda en 20 mls de agua destilada con ayuda de un agitador magnético. Se agregaron 0,085 gramos de CMC coloidal para ajustar la viscosidad de la mezcla.

Peroxidasa/CMC

Se agitaron 2,5 gramos de PO/GMC húmeda en 20 mls de agua destilada con ayuda de un agitador magnético. Se agregaron 0,085 gramos de CMC coloidal para ajustar la viscosidad de la mezcla. También se agregaron 0,033 gramos de colorante o-tolidina mediante agitación a la mezcla.

Se imprimieron las dos mezclas así obtenidas mediante estarcido de seda como líneas paralelas precisas, según el sistema GO-PO-GO-PO etc., sobre un papel de filtro que había sido sumergido en una solución de glucosa al 10% en agua y se había secado a 35°C.

En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

1. Método para fabricar un dispositivo para pruebas de reactivos que comprende un portador y al menos dos sustancias (A, B), sustentadas por dicho portador, susceptibles de ser activadas al utilizar el dispositivo de pruebas mencionado, caracterizado por aplicar al menos dos líquidos, cada uno de los cuales contiene una de dichas sustancias, directamente a una superficie del portador de tal manera que dichas sustancias (A, B) permanecerán sobre la superficie separadas por un espacio intermedio predeterminado a lo largo de la misma, utilizándose técnicas de impresión conocidas per se para obtener dicho espacio intermedio predeterminado.

2. Método según la reivindicación 1, caracterizado por aplicar al menos una de dichas sustancias (A, B) a la superficie de dicho portador de tal modo que permanece fija al mismo incluso al utilizar el dispositivo de prueba de reactivos.

3. Método según las reivindicaciones 1 o 2, caracte-



rizado por aplicar dichas sustancias (A, B) a dicha superficie en una pluralidad de lugares con pequeños espacios intermedios entre los mismos.

5

4. Método según la reivindicación 3, caracterizado por aplicar dichos lugares mezclados sobre dicha superficie.

5. Método según las reivindicaciones 3 a 4, caracterizado por aplicar al menos una de las sustancias (A,B) como puntos sobre dicha superficie.

10

6. Método según las reivindicaciones 3 o 4, caracterizado por aplicar al menos una de las sustancias (A, B) como rayas sobre dicha superficie.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, caracterizado por aplicar dichas sustancias (A,B) por impresión en fotograbado.

15

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, caracterizado por aplicar dichas sustancias (A, B) por estarcido de seda.

20

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, caracterizado por aplicar dichas sustancias (A, B) mediante impresión por chorro de tinta.

10. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: METODO PARA FABRICAR UN DISPOSITIVO PARA PRUEBAS DE REACTIVOS.

25

30



Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de trece páginas mecanografiadas y dibujos adjuntos.

5

Madrid, 17 junio 1.977

BERNARDO UNGRIA

R.P.



10

15

20

25

30



**POOR
QUALITY**