

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2005.03.04</b>	(73) Titular(es): <b>F. HOFFMANN-LA ROCHE AG</b> <b>GRENZACHERSTRASSE 124 4070 BASEL CH</b>
(30) Prioridade(s): <b>2004.03.06 EP 04005385</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2014.03.12</b>	(72) Inventor(es): <b>PATRICK GRISS CH</b> <b>IRIO GIUSEPPE CALASSO CH</b> <b>RAINER JAEGGI CH</b> <b>EMAD SAROFIM CH</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2015.04.15</b> <b>130/2015</b>	(74) Mandatário: <b>ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO</b> <b>RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA PT</b>

(54) Epígrafe: **DISPOSITIVO DE AMOSTRAGEM DE FLUIDO CORPORAL**

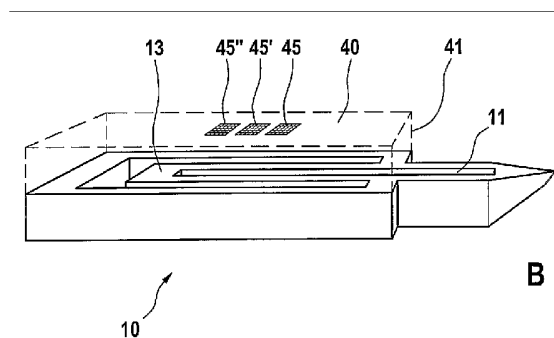
(57) Resumo:

DISPOSITIVO DE AMOSTRAGEM DE FLUIDO CORPORAL COMPREENDENDO UM ELEMENTO (10) DE PERFURAÇÃO DE PELE TENDO UM PERCURSO (11) DE FLUIDO PARA RECEBER FLUIDO CORPORAL, ESTANDO, PELO MENOS, UMA PARTE DO REFERIDO PERCURSO DE FLUIDO ABERTA AO AMBIENTE E COMPREENDENDO, AINDA, UM MEIO (40) DE RECEÇÃO DE FLUIDO QUE ESTÁ AFASTADO DO REFERIDO PERCURSO DE FLUIDO, DE MODO QUE O FLUIDO NO REFERIDO PERCURSO NÃO CONTACTE, INICIALMENTE, COM O MEIO DE RECEÇÃO DE FLUIDO. O REFERIDO MEIO DE RECEÇÃO DE FLUIDO PODE TER UMA ZONA (45) DE ENSAIO PARA REALIZAR UMA REAÇÃO ANALÍTICA. O FLUIDO DO REFERIDO CANAL ENTRA EM CONTACTO COM O REFERIDO MEIO DE RECEÇÃO DE FLUIDO AO COLOCAR-SE O MEIO DE RECEÇÃO DE FLUIDO E O FLUIDO EM CONTACTO MECÂNICO, OU AO TRANSPORTAR ELETRICAMENTE FLUIDO DO CANAL PARA O MEIO DE RECEÇÃO DE FLUIDO.

## RESUMO

### "DISPOSITIVO DE AMOSTRAGEM DE FLUIDO CORPORAL"

Dispositivo de amostragem de fluido corporal compreendendo um elemento (10) de perfuração de pele tendo um percurso (11) de fluido para receber fluido corporal, estando, pelo menos, uma parte do referido percurso de fluido aberta ao ambiente e compreendendo, ainda, um meio (40) de recepção de fluido que está afastado do referido percurso de fluido, de modo que o fluido no referido percurso não contacte, inicialmente, com o meio de recepção de fluido. O referido meio de recepção de fluido pode ter uma zona (45) de ensaio para realizar uma reação analítica. O fluido do referido canal entra em contacto com o referido meio de recepção de fluido ao colocar-se o meio de recepção de fluido e o fluido em contacto mecânico, ou ao transportar eletricamente fluido do canal para o meio de recepção de fluido.



## **DESCRIÇÃO**

### **"DISPOSITIVO DE AMOSTRAGEM DE FLUIDO CORPORAL"**

A presente invenção refere-se ao campo de análises de fluidos corporais de modo a fazer um diagnóstico ou monitorizar a concentração de analitos, tal como a concentração de glucose no sangue.

A invenção refere-se a um dispositivo ou sistema para amostragem de pequenas quantidades de fluido corporal. Um dispositivo de amostragem de fluido corporal pode compreender um elemento de perfuração de pele com um percurso de fluido para ali receber o fluido corporal. Pelo menos uma parte do percurso de fluido está aberta ao ambiente. O dispositivo de amostragem compreende, ainda, um meio de receção de fluido que está separado do percurso de fluido, de modo que o fluido no percurso não contacte o meio de receção de fluido num primeiro estado (separado). O dispositivo ou sistema pode ser colocado num segundo estado, no qual, pelo menos, uma parte do percurso contacta o meio de receção de fluido, de modo que o fluido seja transferido. Com base em sinais provenientes de um sensor do meio de receção de fluido, a concentração de analito pode ser determinada.

Já são conhecidos na técnica anterior sistemas para amostragem de fluidos corporais em que o fluido corporal é recolhido num elemento descartável. Recolha de sangue e sistemas analíticos são, e. g., conhecidos do documento EP 0199484, o

qual compreende uma unidade descartável com um capilar para recolher fluido corporal e para transportar o fluido corporal para uma área de deteção. O desenvolvimento ulterior deste conceito é descrito no documento WO 97/42888. A configuração descrita nesta patente é particularmente apropriada para recolher quantidades de fluidos corporais relativamente pequenas, o que é obtido, essencialmente, pressionando um anel sobre a área envolvendo um local de recolha e um movimento de bombagem. Um sistema para análise com base em pequenas quantidades de fluido intersticial é conhecido do documento EP 0723418. Uma agulha oca fechada muito fina é introduzida, com esta finalidade, na derme e fluido intersticial é transportado através da agulha até uma zona de ensaio, aplicando pressão à área envolvente do local de punção. Uma configuração altamente miniaturizada que utiliza, igualmente, uma agulha fechada para extrair fluido corporal é conhecida do documento US 5801057. Uma vantagem particular desta configuração é a agulha extremamente fina que pode ser introduzida na região do braço de um doente sem praticamente qualquer dor.

Considerando que a configuração descrita no documento US 5801057 já cumpre numerosas exigências práticas, algumas características necessitam de melhoramento. Um problema geral com os dispositivos de amostragem, de acordo com o documento previamente mencionado, é fabricar a agulha oca de forma rentável e tão pequena quanto possível.

Com este objetivo, são contemplados dispositivos de amostragem de fluido corporal que têm uma estrutura de percurso de fluido aberto. Ambos os documentos US 2003/0018282 e US 2003/0028125 descrevem dispositivos de perfuração de pele que têm um canal aberto para amostragem de fluido corporal que está,

pelo menos parcialmente, localizado numa região de uma agulha perfurante. O fluido corporal recolhido no percurso de fluido é transferido para uma zona de ensaio que está fixa ao elemento de perfuração de pele. Em particular, o documento US 2003/0028125 descreve que o elemento de perfuração de pele está integrado numa parte de uma tira de análise. Um outro documento que contempla um dispositivo de amostragem e análise semelhante, dotado com uma área de utilização comum, é descrito no documento US 2002/0168290.

Os dispositivos de amostragem e análise da técnica anterior descrevem formas de realização onde a amostra proveniente de um canal capilar é transferida diretamente para uma zona de ensaio que está em contacto com o canal. Ao contrário disto, a presente invenção propõe dispositivos de amostragem e análise de fluido corporal em que o percurso de fluido, numa fase na qual a amostra é recolhida, não está em contacto de fluido com uma zona de ensaio. Após ter recolhido uma amostra de fluido no percurso de fluido, pelo menos, uma parte do percurso de fluido está em contacto com um meio de receção de fluido que recebe fluido proveniente do percurso. O meio de receção de fluido pode ser uma zona de ensaio ou pode ser uma zona que transporta a amostra para uma zona de ensaio. A molhagem da zona de ensaio pode, conseqüentemente, ser iniciada de um modo controlado pelo passo de contacto. Este desencadeamento da molhagem de zona de ensaio tem a vantagem do tempo de reação (*i. e.*, o tempo entre o contacto de um químico de análise com fluido de amostra e a leitura dos resultados de análise) poder ser controlado, o que conduz a uma precisão mais elevada da determinação do analito. Uma outra vantagem em comparação com os dispositivos de amostragem da técnica anterior é que a amostragem de fluido e o contacto do dispositivo de amostragem com uma zona de ensaio

podem ser realizados em locais diferentes. A amostragem de fluido, por exemplo, pode ser feita na extremidade frontal de um aparelho portátil, enquanto que o contacto com uma zona de ensaio pode ser feito dentro do aparelho. Devido a esta função de transporte do elemento de perfuração de pele, um meio ótico ou outro meio de avaliação podem ser movidos para o interior de um alojamento, o que é vantajoso, considerando o espaço limitado na extremidade frontal. Uma outra vantagem de contactar a zona de ensaio ou o meio de receção de fluido com uma amostra já presente no percurso de fluido, é que o contacto pode ser feito com uma parte do percurso de fluido que não contém o primeiro fluido que emerge do corpo. Por este motivo, influências do plasma e substâncias da superfície do corpo podem ser evitadas ou reduzidas.

Além disso, uma separação física da zona de ensaio do sangue, durante o passo de amostragem, evita que o químico da análise se difunda no corpo humano durante a amostragem.

A presente invenção tem, conseqüentemente, vantagens significativas sobre os dispositivos de amostragem de fluidos da técnica anterior.

Uma área particular de aplicação de sistemas e dispositivos para recolher pequenas quantidades de fluido corporal é a denominada monitorização no local, em que a concentração de analitos particulares, presentes em fluidos corporais, é determinada num momento particular. Tais medições podem ser realizadas repetidamente em intervalos de tempo de modo a vigiar uma alteração da concentração do analito. Tal análise empregando elementos de análise descartáveis provou ser particularmente vantajosa, especialmente no campo da medição de açúcar no sangue

por diabéticos. Se valores excessivamente elevados de açúcar no sangue (hiperglicemia) ocorrerem num diabético durante um período de tempo, isto pode conduzir a problemas graves a longo prazo, tais como cegueira e gangrena. Se, por outro lado, um diabético entrar num estado de hipoglicemia porque, por exemplo, injetou uma dose demasiado elevada de insulina, isto pode resultar em risco de vida se o diabético cair num denominado choque hipoglicémico. Um controlo regular do nível de açúcar no sangue permite ao diabético evitar estados hiperglicémicos e hipoglicémicos e aprender, igualmente, como coordenar os seus hábitos alimentares, atividade corporal e medicação com insulina. Além de melhorar e manter a saúde dos diabéticos, a vigilância regular do açúcar no sangue tem, igualmente, consideráveis vantagens económicas gerais, dado que os elevados custos com doenças secundárias podem ser evitados. As razões que impedem uma utilização mais difundida e consequente da monitorização do açúcar no sangue são, em primeiro lugar, a dor provocada pela recolha exigida de fluido corporal e os múltiplos passos de manuseamento dos sistemas presentemente no mercado. Com os sistemas presentemente utilizados, o diabético ou o pessoal médico devem, em primeiro lugar, obter uma gota de sangue, a qual é habitualmente obtida a partir da almofada do dedo. Os denominados dispositivos de lancetamento podem ser utilizados para reduzir a dor. Um dispositivo de lancetamento deve, em primeiro lugar, ser carregado com uma lanceta, ser colocado sob tensão, colocado sobre a superfície do corpo e ser acionado. Após o processo de lancetamento, o utilizador tem que apertar o seu dedo, de modo a fazer sair uma gota de sangue do ferimento de punção. Antes deste procedimento, o diabético tem que, previamente, colocar uma tira de análise num instrumento de medição de açúcar no sangue e ativá-lo. A gota de sangue pode, agora, ser aplicada à tira de análise e após, por exemplo, 10

segundos, uma medição do açúcar no sangue fica disponível. Finalmente, o utilizador tem que descartar a lanceta e a tira de análise gastas. A presente invenção permite que o processo de medição de açúcar no sangue seja extremamente simplificado.

A simplificação é conseguida empregando um elemento de perfuração que recebe fluido corporal num percurso de fluido e este fluido pode, depois, ser automaticamente colocado em contacto com um meio de receção de fluido, incluindo uma zona de ensaio. Uma simplificação da análise de glicemia é não apenas vantajosa para os presentes utilizadores, mas espera-se que tenha, igualmente, o efeito que mais pessoas tendo diabetes verificaram a sua concentração de glucose no sangue numa base regular.

Um dispositivo e sistema de amostragem de acordo com a presente invenção servem para extrair pequenas quantidades de fluido corporal. Neste contexto, entende-se por fluidos corporais, em particular, sangue, fluido intersticial e misturas destes fluidos corporais. Enquanto em sistemas convencionais de recolha de sangue, isto é habitualmente realizado sobre a almofada do dedo, o sistema de recolha de acordo com a invenção pode ser igualmente utilizado para retirar sangue de locais alternativos no corpo, tais como o antebraço e a palma da mão.

Um elemento de perfuração de pele para retirar pequenas quantidades de fluido corporal de acordo com a presente invenção tem uma parte saliente com uma extremidade afiada para perfurar a pele. No interior de uma região da parte saliente está localizado um percurso de fluido que tem, pelo menos, uma atividade capilar para transportar fluido corporal. Pelo menos, uma parte da estrutura capilar, de um modo preferido todo o



capilar, está aberta para o exterior ao longo da sua extensão. No âmbito da invenção, entende-se por uma estrutura capilar, um corpo que transporta fluido corporal em resultado de forças capilares na direção da extremidade proximal da estrutura capilar quando a área distal é contactada com fluido corporal. Relativamente a esta função, a estrutura capilar de acordo com a invenção é semelhante às estruturas de agulha abertas descritas nos documentos US 2003/0018282 e US 2003/0028125. Porém, uma diferença importante é que estes documentos descrevem microagulhas onde o canal capilar está firmemente em contacto de fluido com uma zona de ensaio de modo que o fluido corporal recebido no canal capilar seja aplicado diretamente à zona de ensaio e, por isso, inicie a reação.

A extensão longitudinal do elemento de perfuração de pele estende-se desde uma extremidade proximal, a qual proporciona uma área de retenção, até uma extremidade distal tendo uma parte saliente que se destina a ser introduzida na pele. As agulhas ocas da técnica anterior têm uma abertura na sua extremidade distal, através da qual o fluido corporal pode entrar, e o percurso de fluido transforma-se, em seguida, num canal fechado ou câmara na qual a zona de ensaio está localizada. Em contraste, a estrutura capilar de acordo com a presente invenção está, de um modo preferido, aberta para o exterior ao longo de toda a sua extensão longitudinal e o percurso de fluido não é fechado por uma zona de ensaio.

Os capilares abertos podem ser fabricados por métodos fotolitográficos, como os descritos no documento US 5801057 e os quais são conhecidos no campo da tecnologia de semicondutores. É igualmente possível proporcionar canais, sulcos, etc., os quais sejam abertos para o exterior, em agulhas sólidas, por fresagem,

gravação por ácido, e semelhantes. Tais depressões que proporcionam o canal capilar podem estender-se desde a ponta ou, pelo menos, desde uma região contígua à ponta do elemento de perfuração de pele, até uma região proximal de retenção que pode ser ligada a um dispositivo de retenção. As depressões ou capilares não têm, necessariamente, que se desenvolver em linhas retas, mas também podem, por exemplo, adotar formas em serpentina, em espiral, etc. Além disso, os capilares podem estar dispostos numa rede com bifurcações, capilares seccionados, etc. A secção dos capilares pode, por exemplo, ter uma forma em V, semicircular ou também retangular.

Estes canais são de, um modo preferido, produzidos por processos de gravação química, como fresagem fotoquímica (PCM). O PCM é a maquinagem de estruturas de metal sem aquecer ou fresar mecanicamente o material inicial. O PCM é baseado em processos de transferência ótica e gravura química de padrões. É conhecido como sendo uma tecnologia de micromaquinagem.

Os materiais iniciais são folhas de metal. Existe uma vasta gama de diferentes materiais a escolher, variando do aço médico ao alumínio e invar. No caso do aço, a maioria dos tipos médicos padrão estão disponíveis. Quando comparado com silício, vidro ou quartzo, o custo da matéria-prima em aço é muito mais reduzido.

O PCM é um método de fabrico baseado em fotolitografia, *i. e.*, o contorno de uma estrutura a ser maquinada é transferido óticamente. Um polímero fotossensível é aplicado sobre a folha de metal numa película. O polímero é referido como fotorresistente e apresenta-se em dois tipos:

1. Resistente a seco (folha laminada sobre o substrato)

2. Resistente por via húmida (líquido espalhado e curado sobre o substrato)

Após iluminação seletiva do fotorresistente, por meio de uma máscara de sombra, o fotorresistente pode ser removido seletivamente do substrato (o que é, frequentemente, referido como transferência de padrão).

Quando o substrato gravado é exposto a uma solução aquosa (e. g., cloreto de Ferro (III) para o aço) o qual reage com o material do substrato, o material é removido seletivamente das áreas onde já não existe qualquer fotorresistente (referido como a "gravação"). Existem dois princípios fundamentais para a colocação do substrato em contacto com o substrato.

1. imersão do substrato num banho de reagente de gravação
2. spray do reagente de gravação sobre o substrato

O passo de gravação tem uma natureza geralmente isotrópica, i. e., a velocidade de gravação é aproximadamente igual em todas as direções. O isotropismo pode ser influenciado por um grande número de parâmetros durante a fotolitografia e durante a gravação, pelo que é possível controlar o perfil de gravação dentro de determinados limites.

A gravação química por spray oferece maior flexibilidade no controlo de velocidades e perfis de gravação quando comparados com a gravação química por imersão.

Na maioria dos casos, é imperativo que a camada

fotorresistente seja removida do substrato para obter os dispositivos de amostragem. A remoção da camada fotorresistente é normalmente um processo por via húmida.

Além dos métodos já mencionados para incorporar canais capilares em superfícies, é igualmente possível produzir os canais capilares montando corpos de modo a criar aberturas capilares. Assim, por exemplo, é possível fixar duas ou mais agulhas sólidas entre si, por exemplo, por soldadura, de modo que as áreas em contacto das agulhas sólidas formem canais capilares. Também é, assim, possível torcer fios em conjunto na forma de um fio entrançado, de modo a formar inúmeras áreas de contacto que geram os canais capilares. Outros elementos de perfuração de pele com percursos de fluido podem ser criados aplicando uma ou mais camadas de materiais (e. g., folhas laminadas) sobre uma agulha achatada de modo a criar uma abertura capilar entre as camadas ou a criá-la numa tal camada.

Os canais capilares que proporcionam o percurso de fluido têm, tipicamente, uma profundidade maior do que a largura. A relação da profundidade para a largura (geralmente referida como relação de aspeto) está compreendida, de um modo preferido, entre 0,3 e 3. A secção do canal capilar é, tipicamente, superior a  $2500 \mu\text{m}^2$  e inferior a  $1 \text{ mm}^2$ . De um modo preferido, a largura do canal capilar está compreendida entre 50 e 450 micrones e tem, de um modo muito preferido, cerca de 200 micrones. Como já indicado acima, é vantajoso que os canais capilares estejam abertos para o exterior, de modo a poderem receber fluido corporal quando a estrutura capilar é introduzida no corpo. De modo a conseguir uma boa colheita de fluido corporal, a área da estrutura capilar que está aberta para o exterior deve ter um comprimento de 0,5 mm ou mais.

A forma do elemento de perfuração de pele não é, relativamente, crítica. Este pode, por exemplo, ter a forma de um pequeno cubo. Não são habitualmente necessárias medidas especiais para montar o elemento de perfuração de pele numa unidade de acionamento, mas uma região de retenção situada na extremidade proximal do elemento de perfuração de pele é preferida. De um modo vantajoso, a área de retenção é formada solidariamente com as outras regiões do elemento de perfuração de pele. Podem ser empregues conceções de elemento perfurante que são conhecidas para lancetas descartáveis de sistemas convencionais de amostragem de sangue. Por exemplo, a região de retenção pode ter afunilamentos nos quais elementos de mola de um suporte de uma unidade de acionamento se engatam de modo a reter o elemento de perfuração. O elemento de perfuração é posicionado, de um modo vantajoso, dentro de um suporte de modo (por exemplo, pressionando a extremidade do elemento de perfuração orientada para o lado contrário à ponta contra um batente) a permitir um bom controlo da profundidade de perfuração. O documento EP B 0565970 refere tal suporte e a interação entre o suporte e a unidade de lancetamento descartável.

O dispositivo de amostragem de fluido corporal, além do elemento de perfuração de pele, tem um meio de receção de fluido que está espacialmente separado do percurso de fluido do elemento de perfuração de pele, de modo que o fluido nesse percurso não contacte o meio de receção de fluido durante o enchimento. O meio de receção de fluido e o percurso, porém, estão em contacto entre si após a amostra de fluido ter sido recebida em, pelo menos, uma parte do percurso de fluido e quando se deseja o início da reação analítica.

A separação espacial do elemento de perfuração de pele e do meio de receção de fluido permite formas de realização onde os elementos de perfuração de pele são empregues como um transportador para transportar fluido amostrado para um meio de receção de fluido. Isto é particularmente vantajoso quando a amostragem de fluido é realizada numa área espacialmente limitada (e. g., a extremidade frontal do aparelho) e o meio de receção de fluido não se adapta bem a este espaço limitado. O último caso é, em particular, o caso de meios de receção de fluido fixos a uma fita como, e. g., descrito no pedido de patente Europeia 1424040, US 4218421 e EP 0299517. A função de transporte permite um processo de análise com os seguintes passos

- perfurar a pele com o elemento de perfuração de pele
- recolher fluido corporal no elemento de perfuração de pele
- transportar o fluido corporal recolhido com o elemento de perfuração de pele para um meio de receção de fluido
- fazer contactar o meio de receção de fluido com fluido corporal no elemento de perfuração de pele,
- detetar uma modificação do meio de receção de fluido que se relaciona com a concentração de um analito.

Quando é empregue um compartimento com meios de receção de fluido, podem existir, ainda, os passos de expor um meio de receção de fluido específico proveniente do meio de receção de

fluido armazenado para contactar o elemento de perfuração de pele carregado com fluido de amostra. Quando o meio de recepção de fluido específico tiver sido avaliado, um outro meio de recepção de fluido pode ser exposto para contactar fluido de amostra num elemento de perfuração de pele.

Um sistema de acordo com o conceito de transportador supracitado tem, conseqüentemente, um ou mais elementos de perfuração de pele, um actuador para levar um elemento de perfuração de pele a perfurar pele, um meio de transporte para transportar o elemento de perfuração de pele até ao contacto com um meio de recepção de fluido. O actuador para a perfuração e o meio de transporte, podem ser empregues na mesma unidade de acionamento. Além disso, o sistema pode compreender uma unidade de armazenamento para múltiplos meios de recepção de fluido. O sistema pode, ainda, compreender uma unidade de exposição para expor, sucessivamente, meios de recepção de fluido para receber fluido.

O meio de recepção de fluido é uma estrutura que pode recolher fluido de um percurso de fluido do elemento de perfuração de pele. Esta colheita de fluido, e. g., pode ser realizada por um potencial elétrico aplicado entre o fluido no percurso de fluido e o meio de recepção de fluido. De um modo preferido, porém, o meio de recepção de fluido tem uma capilaridade mais elevada do que o percurso de fluido do elemento de perfuração de pele, de modo que, durante o contacto, o fluido seja recolhido automaticamente. Neste contexto, o meio de recepção de fluido pode ser constituído por um velo ou material de tecido que tenha uma elevada capilaridade e seja hidrófilo (pelo menos, nas áreas para recolha de fluido). O meio de recepção de fluido pode ter uma região particular que

compreende este material de elevada capilaridade ou toda a área do meio de receção de fluido pode funcionar como meio de receção para fluido proveniente do canal de fluido. O meio de receção de fluido pode, por si só, ser uma zona de ensaio, a qual pode ser coberta com um material tecido ou entrelaçado ou o meio de receção de fluido pode ser mais complexo e permitir o pré-processamento de fluido de amostra e/ou o transporte do fluido para um sensor/zona de ensaio. O pré-processamento pode compreender a filtragem da amostra de fluido e/ou uma mistura com reagentes.

O meio de receção de fluido compreende uma zona de ensaio com, pelo menos, uma camada química que contém um reagente para detetar um analito.

O reagente sofre uma alteração detetável devido à reação com o analito a detetar. Os reagentes típicos para detetar glucose são baseados, por exemplo, na oxidase da glucose em combinação com um sistema de redox cromogéneo. Reagentes para avaliação ótica que formam uma cor com glucose proveniente do fluido corporal são bem conhecidos da técnica anterior. Além disso, reagentes que permitem uma deteção eletroquímica de analitos são igualmente conhecidos no campo das tiras de análise de açúcar no sangue. As misturas de reagentes que são utilizadas encontram-se, habitualmente, num estado sólido e, devido aos seus constituintes (e. g., óxido de alumínio, kieselguhr e semelhantes), têm uma capilaridade tão elevada que podem recolher fluido corporal a partir do canal capilar. Como estes sistemas de deteção são conhecidos da técnica anterior, não são aqui descritos com mais pormenor. Ver documentos US 5762770 e EP 1897493 para mais detalhes.



O sistema de recolha de fluido corporal de acordo com a presente invenção tem, além disso, uma unidade de acionamento, que, quando ativada, move o elemento de perfuração de pele de uma primeira para uma segunda posição, de modo a executar um movimento de lancetamento. Unidades de acionamento apropriadas são bem conhecidas no campo dos sistemas de amostragem de sangue. Podem, por exemplo, conter uma mola que é armada pelo utilizador e, quando libertada, aciona o elemento de perfuração de pele. Uma unidade de acionamento particularmente vantajosa é descrita no documento EP B 0565970.

Os sistemas/dispositivos para análise de fluidos corporais compreendem uma unidade de deteção. Se se utilizar um sensor/zona de ensaio contendo reagente que muda de cor ou forma uma cor quando um analito está presente, o sistema pode ter uma unidade de deteção ótica compreendendo uma fonte de luz e um detetor para detetar a luz transmitida ou refletida. Quando se emprega deteção eletroquímica, o sistema tem elétrodos que contactam a zona de ensaio ou o meio de receção de fluido. Para a avaliação de sinais não processados, o sistema pode ter dispositivos eletrónicos conhecidos da técnica anterior para determinar a concentração de analito, por exemplo, medindo a assim chamada corrente de Cottrell (ver, e. g., o documento US 36268).

Com o elemento de perfuração de pele de acordo com a presente invenção, o fluido corporal pode ser recolhido enquanto a parte saliente está introduzida na pele (*i. e.*, recolha da amostra diretamente do corpo e/ou do fluido corporal que emerge na superfície do corpo) ou a parte saliente pode ser retraída do corpo após a perfuração e recolher o fluido corporal que emerge

na superfície do corpo. Uma extração parcial na qual a parte saliente permanece no corpo mas o canal de lancetamento na pele está aberto para recolher o fluido corporal é especialmente apropriada para a recolha de amostras no braço. Isto é devido ao facto de as pequenas incisões no braço fecharem muito rapidamente, de modo que nenhum fluido, ou apenas muito pequenas quantidades de fluido emergem após a perfuração. Por outro lado, a sensibilidade à dor é muito menos pronunciada no braço quando comparada, por exemplo, com o dedo e, por isso, quando a parte saliente permanece no corpo, a sensação não é de dor. Como descrito acima, uma vantagem de uma estrutura capilar que está aberta para o exterior, é que o fluido pode ser recolhido através do canal de fluido aberto, enquanto que a área para recolha de líquidos por agulhas ocas está limitada à extremidade frontal da agulha. Esta última situação é particularmente desvantajosa quando a abertura da agulha fica vedada por tecido (devido a uma parte de tecido esmagada) durante o processo de perfuração, pelo que não se consegue recolher qualquer líquido, ou pode-se recolher apenas uma quantidade inadequada.

Além disso, pode realizar-se um processo de extração com o dispositivo de amostragem de acordo com a invenção, o qual é uma combinação dos processos previamente mencionados. Neste processo combinado, a perfuração é realizada em primeiro lugar, a parte saliente é feita recuar ao longo de uma parte do trajeto de perfuração e pode aí permanecer durante um período de recolha de alguns segundos. Uma vantagem deste processo é que a retração da parte saliente expõe uma parte do canal de lancetamento, de modo que o fluido corporal seja aí recolhido e, a partir daí, possa entrar no percurso de fluido do elemento de perfuração de pele. Além disso, tal processo de colheita tem a vantagem do sangue na superfície da pele poder ser recolhido pelo canal aberto.

Dependendo das circunstâncias, pode mesmo ser possível remover quase completamente o sangue residual, de modo que o utilizador não veja sangue.

Um outro fator decisivo que é importante para uma recolha eficaz de fluido corporal no percurso de fluido é a molhabilidade do canal capilar. Quando são utilizadas estruturas capilares feitas de silício, estas podem ser, habitualmente e adequadamente, molhadas devido a uma camada de óxido de silício sobre a superfície. Se se utilizarem metais para a estrutura capilar, estes são, frequentemente, relativamente difíceis de molhar. Isto pode ser neutralizado tomando várias medidas diferentes, tal como a aplicação de silício na superfície. A molhabilidade é habitualmente adequada quando o líquido nos capilares tem um menisco côncavo, o que é o caso quando o ângulo de molhagem é inferior a  $90^\circ$ .

A presente invenção será descrita de modo mais detalhado recorrendo às figuras, nas quais:

A Fig. 1 mostra, esquematicamente, uma primeira forma de realização da invenção com um percurso de fluido móvel numa vista em perspetiva;

A Fig. 2 mostra uma outra forma de realização com um meio de receção fluido móvel;

A Fig. 3 mostra uma outra forma de realização com cortes através de elementos de perfuração e zonas de ensaio;

A Fig. 4 ilustra o conceito de como ativar eletricamente um contacto de fluido de amostra;

A Fig. 5 representa uma concepção para proporcionar uma geometria em que o elemento de perfuração de pele e a zona de ensaio estão separados;

A Fig. 6 mostra, esquematicamente, uma forma melhorada do canal capilar;

A Fig. 7 mostra um elemento de perfuração de pele tendo regiões com uma secção diferente;

A Fig. 8 mostra, esquematicamente, uma secção de uma forma de realização para a ativação magnética do contacto com o fluido;

As figs. 9 e 10 mostram, esquematicamente, secções de uma forma de realização com elementos óticos correspondentes;

As figs. 11 a 14 mostram vistas superiores de concepções de canal para descarga adicional de fluido.

A figura 1 mostra um elemento (10) de perfuração de pele que tem um percurso (11) de fluido que se estende numa parte (12, 13) alongada do elemento de perfuração de pele. Esta parte está ligada a um suporte (14) na forma de uma estrutura. A parte alongada tem uma parte (12) saliente que se projeta a partir da parte (14) de suporte. Na extremidade frontal da parte saliente está localizada uma ponta (15) afiada. A ponta (15) afiada permite a penetração da superfície da pele durante uma picada com o elemento de perfuração de pele. O percurso (11) de fluido inicia-se na região de extremidade frontal da parte saliente e estende-se até ao interior de uma parte (13) móvel, a

qual está localizada na estrutura (14) de suporte. O percurso de fluido é um canal capilar aberto que permite que o fluido corporal que contacta o canal na região da parte saliente se mova para dentro da parte (13) móvel por meio de ação capilar. Como representado na figura 1A, a parte saliente, parte móvel e parte de estrutura do elemento de perfuração de pele são formadas solidariamente. O elemento (10) de perfuração de pele pode ser concebido por processos de gravação química. Como é bem conhecido em processos de fabrico de silício, uma bolacha de material de silício pode ser gravada quimicamente para proporcionar dispositivos compreendendo pontas e canais capilares. Para a produção em série é, porém, vantajoso, produzir os elementos de perfuração de pele por gravação química de placas de metal finas. É particularmente vantajoso que a ponta (15) afiada da parte (12) saliente possa, igualmente, ser formada durante o processo de gravação química para evitar passos de fresagem separados.

Como se pode ver a partir da figura 1A, não existe nenhum reagente ou sensor contactando o canal de fluido que receberia o fluido corporal imediatamente após o canal ter sido cheio com fluido de amostra. A presente invenção, pelo contrário, propõe posicionar uma zona ou sensor de análise separadamente num meio de receção de fluido.

A figura 1B mostra o elemento (10) de perfuração de pele da figura 1A em conjunto com um meio de receção de fluido, incluindo uma zona de ensaio. O meio (40) de receção de fluido é mostrado esquematicamente. O meio (40) de receção de fluido está localizado no lado superior do elemento de perfuração de pele, em cujo lado o canal (11) de fluido está aberto ao ambiente. O meio (40) de receção de fluido está, porém, inicialmente

espaçado do percurso (11) de fluido, de modo que o fluido de amostra dentro do percurso de fluido não contacte o meio de receção de fluido. Consequentemente, não ocorre nenhuma transferência de fluido do percurso de fluido para o meio de receção de fluido com esta geometria do dispositivo de amostragem de fluido. Na forma de realização representada, o meio de receção de fluido consiste, essencialmente, numa estrutura (41) de retenção, que proporciona orientação e afastamento apropriados do meio de receção de fluido relativamente ao elemento de perfuração de pele e a uma zona (45) de ensaio. Na forma de realização representada, a zona de ensaio é um reagente químico que produz um sinal ótico com base na concentração de analito no fluido corporal. Devido à incorporação de materiais porosos como, e. g., kieselguhr ou dióxido de titânio o reagente químico já tem uma elevada capilaridade que aspira fluido do canal (11) capilar. O reagente químico é aplicado a uma superfície de suporte. Como mostrado na figura 1B, inicialmente, o percurso de fluido e a zona (45) de ensaio estão espaçados de modo que o fluido corporal situado no canal (11) capilar não seja transferido para a zona (45) de ensaio. Após o fluido ter sido recebido no percurso de fluido e enchido a secção (13) móvel, o dispositivo de amostragem de fluido corporal é preparado para medição. Por meio de um acionamento mecânico, a secção (13) móvel pode ser curvada na direção do sensor (45), de modo que o fluido corporal situado no percurso de fluido contacte a zona de ensaio e molhe o reagente químico. Este modo de contacto do sensor com fluido de amostra tem diversas vantagens relativamente aos dispositivos da técnica anterior.

Uma primeira vantagem relativamente à técnica anterior é que a medição pode ser iniciada num ponto específico no tempo.

Isto significa que o tempo entre a molhagem da zona de ensaio e a medição do sinal final pode ser escolhido à vontade. O período de tempo, porém, é mais curto do que o tempo de secagem do sangue no capilar. Conhecer ou controlar o tempo de reação melhora a precisão da medição. Além disso, um sinal pode ser medido começando diretamente após a molhagem, o que permite monitorizar a cinética de reação. A avaliação destes sinais precoces pode ser igualmente utilizada para melhorar a precisão do resultado da medição. Uma outra vantagem pode ser vista na figura 1B. Quando a secção (13) móvel é contactada pela zona (45) de ensaio, esta contacta uma secção intermédia do canal (11) de fluido, mas não a própria extremidade. Fluido contaminado pela superfície da pele ou contendo fluido intersticial (ISF) entra, primeiro, no capilar e, portanto, permanece após o enchimento da parte de extremidade do capilar. O fluido nesta parte de extremidade não é contactado pelo meio de receção de fluido, conseqüentemente, a parte de extremidade é chamada região de descarga. A parte intermédia do canal contém, conseqüentemente, fluido quase não contaminado e sem ISF. Como o fluido desta região é transferido para o meio de receção de fluido e, conseqüentemente, necessita de estar acessível, esta região é chamada região de acesso. Este conceito de transportar fluido do capilar para o meio de receção de fluido serve para excluir perturbações de medição por plasma ou substâncias provenientes da superfície da pele. É desnecessário dizer que a contaminação por substâncias da superfície da pele deve ser evitada, se possível, em particular, quando as quantidades de amostra para análise são diminuídas até pequenas quantidades (e. g., inferior a 1 microlitro). No caso de fluido intersticial, sabe-se que este fluido corporal, normalmente, não mostra a concentração atual de glucose, mas uma concentração desde 5 a 30 minutos antes. Isto deve-se ao tempo de atraso da

permuta entre o compartimento de sangue e o compartimento de fluido intersticial.

Deverá compreender-se que este conceito, o qual evita o contacto do meio de receção de fluido com o fluido (contaminado) inicialmente recebido no canal, pode ser aplicado a várias concepções de dispositivo e não está limitado a dispositivos de amostragem tendo um elemento de perfuração de pele. Isto invoca um método de amostragem de fluido compreendendo os seguintes passos de

- introduzir fluido numa região de introdução de uma estrutura de suporte que tem um canal no seu interior, enchendo o referido fluido uma região de acesso da estrutura de suporte que é acessível a partir da zona envolvente e tendo o canal uma região de descarga localizada a jusante da região de acesso.
- fazer contactar um meio de receção de fluido com fluido localizado na região de acesso para receber fluido, mas de modo a não contactar com fluido na região de descarga.

Regressando, agora, à forma de realização mostrada na figura 1, em que a estrutura de suporte é um elemento de perfuração de pele. O contacto entre a parte (13) móvel e o sensor (45) pode ser visto na figura 1C. Como esta figura mostra, a parte móvel, devido a sua forma de língua, pode ser dobrada para cima. Com base na estrutura muito fina do elemento de perfuração de pele, a secção móvel terá, automaticamente, flexibilidade suficiente se o elemento de perfuração de pele for fabricado num material dúctil. Materiais apropriados são, e. g.,



metais, silício e mesmo cerâmica, os quais não quebram ao dobrar.

Deverá considerar-se que, em vez de trazer o capilar à zona de ensaio, é igualmente possível trazer a zona de ensaio ao capilar, e. g., dobrando o suporte.

A figura 2 mostra uma segunda forma de realização, em que o contacto entre o canal de fluido e o meio de receção de fluido é realizado por um meio de receção de fluido móvel. Como na primeira forma de realização, o elemento de perfuração de pele tem uma parte (12) saliente com uma ponta (15) para perfurar a pele. Um canal (11) de fluido na forma de um canal capilar começa próximo da ponta (15) perfurante e estende-se até ao interior de uma secção intermédia da parte (14) de suporte. O meio de receção de fluido compreende um espaçador (42) e um suporte (43) móvel fixo ao espaçador. O suporte (43) móvel, no seu lado de baixo, possui uma zona (45) de ensaio na forma de uma matriz de reagente para deteção ótica. Quando o canal (11) capilar fica cheio de fluido de amostra, o suporte (43) móvel é pressionado e a zona (45) de ensaio contacta o canal cheio e recolhe fluido corporal. O suporte (43) transparente pode, agora, ser iluminado e a radiação refletida pelo verso da zona (45) de ensaio pode ser medida para obter um sinal.

A figura 2B mostra, com mais pormenor, a parte do canal (11) de fluido que contacta o sensor (45). Como pode ser visto, o canal tem paredes verticais que se projetam desde a superfície superior do elemento (14) de perfuração de pele. As paredes (11') verticais têm bordos aguçados. A função destes bordos pode ser vista melhor na figura 2C, que mostra a interação entre a zona de ensaio e o percurso (11) de fluido. O

desenho esquerdo da figura 2C mostra a zona (45) de ensaio aproximando-se do percurso de fluido. A zona (45) de ensaio está localizada no lado de baixo de um suporte (40). O fluido (25) corporal que permanece no percurso (11) de fluido tem um cone deprimido. Isto significa que um ligeiro contacto entre a zona de ensaio e as paredes do percurso de fluido pode não ser suficiente para colocar o fluido corporal em contacto com o material de análise. No desenho do lado direito pode ser vista a função dos bordos aguçados, que servem para comprimir o material do sensor ou mesmo para o cortar. Devido a isto, a zona de ensaio, por um lado, está a aproximar-se mais da superfície do fluido corporal e, por outro lado, é conseguido um contacto íntimo entre o material de análise e as paredes do canal. Ambos os aspetos melhoram a transferência de fluido corporal do percurso de fluido para a zona de ensaio.

A figura 3 representa quatro formas de realização mostrando cortes através de elementos de perfuração e zonas de ensaio. Isto ilustrará um problema técnico que tem que ser levado em conta. Na figura 3A, é mostrada uma forma de realização em que um revestimento (16) hidrofóbico foi aplicado sobre o elemento de perfuração de corpo junto ao canal de fluido. Como pode ser visto na figura 3A, o contacto da zona de ensaio com o elemento de perfuração de pele não apenas coloca em contacto a zona de ensaio e o fluido corporal, mas, durante o contacto, são gerados espaços capilares entre a zona de ensaio (ou o suporte) por um lado, e as partes junto do percurso de fluido, por outro lado. Isto, normalmente, cria uma elevada capilaridade, a qual transfere o fluido de amostra que permanece no canal não apenas para a zona de ensaio, mas, igualmente, para os pequenos espaços capilares que são gerados. O revestimento (16) hidrofóbico evita que o fluido de amostra escorra por entre a superfície superior

do elemento (14) de perfuração de pele e o suporte ou zona de ensaio. Deseja-se transferir a amostra para uma área dedicada do material de análise, de modo que as quantidades transferidas de fluido de amostra sejam suficientes para molhar a zona de ensaio de modo a poder obter uma medição exata. Perder fluido de amostra para outras regiões da zona de ensaio ou para o suporte poderia significar que o material de análise não é suficientemente molhado na região dedicada e a medição não pode ser efetuada corretamente.

A figura 3B mostra uma outra forma de realização que evita um escorrimento involuntário de fluido de amostra. De modo semelhante à figura 2, esta forma de realização tem paredes de canal verticais que contactam a zona de ensaio ou suporte. Devido a isto, o fluido que escorre para dentro de espaços para nas paredes exteriores do canal e uma perda de fluido de amostra é grandemente reduzida. As paredes do canal, porém, não precisam de ter uma forma quadrangular, como representado na figura 3B, mas podem, igualmente, ser aguçadas, como mostrado na figura 3C ou 3D.

A figura 4 mostra o conceito de ativação elétrica de um contacto de fluido de amostra com a zona de ensaio. Este conceito geral, porém, é mostrado na figura 4, relativamente a um elemento de perfuração de pele como forma de realização especial de uma estrutura de suporte tendo um canal. Para pôr o fluido em marcha, é aplicado um potencial elevado entre o fluido (25) de amostra e o suporte (40). Isto pode fazer com que haja um movimento de fluido de amostra do canal para a zona de ensaio ou pode fazer com que haja um movimento do suporte na direção do canal. A molhagem da zona de ensaio pelo fluido de amostra pode, nos dois casos, ser desencadeada num intervalo de tempo muito

curto através da ativação do potencial elétrico. Como pode ser visto pelo desenho transparente do suporte, o canal por baixo da zona de ensaio conduz a uma zona (26) de recolha para proporcionar uma quantidade maior de fluido para molhar a zona de ensaio do que a que seria proporcionada pelo canal capilar fino.

A figura 4B representa formas de realização preferidas de zonas de recolha com mais pormenor. Como pode ser visto, a zona (26) de recolha tem, de um modo preferido, elementos (26') verticais que facilitam o movimento do fluido para a zona de ensaio. Estes elementos verticais, por um lado, geram cargas elétricas elevadas na sua extremidade para transportar o fluido e, por outro lado, melhoram a capilaridade da zona (26) de recolha, o que melhora o enchimento com fluido.

As figuras 5A, B e C representam conceções do dispositivo de amostragem para proporcionar uma geometria de separação entre o elemento de perfuração de pele e a zona de ensaio que permite o contacto, por acionamento, da zona de ensaio com fluido de amostra no canal. A forma de realização da figura 5A é semelhante à da Figura 1. O elemento de perfuração de pele compreende uma estrutura que está ligada a uma parte (13') interior na qual se estende o canal (11) capilar. A parte interior e a estrutura são ligadas por partes (51) dobráveis. Após o enchimento do canal capilar, a parte interior é dobrada contra a estrutura de modo que uma parte do capilar contacte a zona de ensaio por baixo do suporte (43). Ao ser dobrada em torno das partes dobráveis, a parte interior contacta obliquamente com a zona de ensaio. Isto tem demonstrado ser particularmente vantajoso visto que proporciona uma molhagem uniforme da zona de ensaio sem inclusão de bolhas de ar.

A figura 5B mostra uma forma de realização em que o suporte (43) e o seu apoio estão ligados através de partes (51') dobráveis a uma parte (14') principal que compreende o capilar. De novo, o contacto entre o capilar e a zona de ensaio é realizado de modo inclinado.

A figura 5C mostra uma forma de realização tendo uma parte (13") interior que está ligada, em duas extremidades, à parte (14") da estrutura. Quando uma pressão é aplicada a partir do lado de baixo à parte central da parte (13") interior, esta dobra-se contra a zona de ensaio por baixo do suporte (43). Ao curvar, de novo, esta parte interior, obtém-se um contacto angular.

A figura 6 representa, esquematicamente, uma forma melhorada do canal capilar. Verificou-se que o nível de enchimento de fluido no canal, geralmente, aumenta com a diminuição da largura do capilar. O capilar da figura 6 tem uma primeira região (a) que conduz à parte de ponta do elemento de perfuração de pele. Uma segunda região (b) de diâmetro aumentado é para proporcionar um volume de amostra aumentado. Particularmente útil é a terceira região (c) de largura diminuída. Devido à largura reduzida, o nível de enchimento é aumentado e, conseqüentemente, a transferência de fluido do canal para a zona de ensaio tem uma elevada taxa de êxito. Conseqüentemente, é preferido contactar a zona de ensaio com o capilar de um modo inclinado, de modo que este contacte, em primeiro lugar, com a região (c) e, em seguida, a região (b). Isto garante que a transferência de fluido é iniciada, com segurança, pela região (c) e que uma amostra suficiente para ensaiar é proporcionada pela região (b). A região (d), a jusante

da região (c), pode ser empregue para descarregar fluido de amostra contaminado ou ISF.

A figura 7 mostra um elemento de perfuração de pele tendo uma primeira região (a) conduzindo à região de ponta e uma segunda região (b) de diâmetro aumentado. A figura A mostra um estado após a pele ter sido perfurada e o sangue ter sido recolhido para dentro da região (a) do canal capilar. Devido à baixa capilaridade diminuída da região (b), o líquido de amostra enche a região (a) mas não a região (b). Quando o elemento de perfuração de pele é contactado por um suporte (43), a estrutura (a, b, d) de canal aberto, em algumas partes, é fechada na sua parte superior e a capilaridade, conseqüentemente, é aumentada nesta parte, pelo que a região (b) de recolha é cheia e uma zona de ensaio no lado de baixo do suporte (43) entra em contacto com fluido de amostra. É vantajoso ter uma área de deteção circular com vista para a geometria de elementos óticos.

Um elemento de perfuração de pele de acordo com a figura 7 pode ser utilizado no seguinte método:

- perfurar a pele.
- recolher fluido corporal numa parte do canal capilar (região (a)).
- Fazer contactar o canal capilar numa região (b) de recolha com uma zona de ensaio e/ou um suporte, de modo que a região (b) se encha com o fluido corporal.
- detetar alterações da zona de ensaio devido à reação com

analito do fluido corporal.

A figura 8 mostra um conceito em que o contacto entre o sensor 45 e o percurso de fluido ou o canal 11 pode ser estabelecido empregando forças 70 magnéticas. Um material 72 paramagnético ou ferromagnético é incorporado, depositado ou fixado ao sensor, ou à parte 13 de canal. Em alternativa, um fio condutor de corrente com uma geometria apropriada é incorporado ou fixo ao sensor ou à parte de canal.

Um campo 72 magnético proporcionado por um eletroímã 74 (ou ímã permanente, solenoide ou outro meio apropriado) exerce uma força 70 de acionamento sobre o sensor (ou parte de canal ou ambos), colocando estes em contacto de fluido. A intensidade da força e, deste modo, a ativação dependente do tempo do contacto de fluido é controlada pelo controlo da intensidade de campo magnético, *i. e.*, ligando o eletroímã 74 ou aproximando um ímã permanente.

Além disso, pode ser induzido um momento de dipolo magnético num anel não magnético (ou com uma geometria semelhante) depositado sobre o sensor ou parte de canal por campos magnéticos variáveis no tempo no local onde se encontra o anel. Isto representa um modo alternativo de produzir uma força de acionamento para ativar o contacto de fluido.

Como mostrado nas Figuras 9 e 10, um elemento 80 de harmonização de índice ótico é empregue para acoplar a zona de ensaio (sensor 45) do meio 82 de receção de fluido a uma unidade de deteção ótica (não mostrada) e, ao mesmo tempo, para exercer uma força mecânica para colocar o percurso 11 de fluido e o sensor 45 do meio 82 de receção de fluido num estado de

contacto.

Como descrito acima, em linhas gerais, a concentração de glucose é determinada por uma medição cinética da mudança de cor no sensor 45 após molhagem com uma quantidade de sangue suficientemente grande contida no percurso ou canal 11. Uma medição refletométrica é realizada iluminando o sensor 45 com uma luz 84 incidente com comprimentos de onda apropriados e detetando a radiação 86 refletida.

A área limitada de deteção no sensor 45 impõe limitações severas sobre as tolerâncias de posicionamento mecânico da zona de ensaio molhada relativamente ao sistema de deteção ótico. Além disso, se apenas estiver disponível uma pequena área de deteção, heterogeneidades na química enzimática do sensor influenciam mais severamente o coeficiente de variação no caso de medições repetidas de glucose. A deteção ótica simultânea do acionamento ativada entre o sangue e o sensor 45 necessita que não exista nenhuma interferência entre o mecanismo de acionamento de ativação e o sistema de deteção ótico.

Um sistema ótico consistindo num emissor e recetor de luz apropriados e uma unidade ótica, tais como lentes e/ou fibras óticas, é empregue para a medição refletométrica. A quantidade de luz de um determinado comprimento de onda refletida pelo sensor 45 dá uma medida da concentração de glucose.

O sensor 45 consiste, tipicamente, numa química de enzima misturada com pequenas partículas proporcionando uma reflexão difusa da luz de entrada, depositada sobre uma tira ou folha 82 de policarbonato com propriedades de transmissão ótica bem definidas. A luz 84 radiante é dispersa de forma difusa pelas



partículas na tira e absorvida por corantes ativados por reações enzimáticas com a glucose no sangue. Assim, a quantidade de luz refletida é reduzida pelo aumento da absorção com a crescente concentração de glucose.

O elemento 80 ótico elastomérico tem um índice de refração correspondendo de forma próxima ao do sensor 45. O elemento 80 é empregue como uma camada intermédia ou uma chapa entre o sensor 45 e a unidade ótica da unidade de deteção. O elemento 80 pode ter um meio 88 que lhe permite ser utilizado como um braço de alavanca para a transdução do deslocamento mecânico para o acionamento provocado do sensor 45 (ver figura 9). O sensor 45 fica encostado, num dos seus lados, ao elemento 80, ao passo que o lado oposto do sensor fica separado, por meio de espaçadores 90, do canal 11, mantendo livre uma abertura 92 de ar. Após o acionamento, o meio 82 de receção de fluido é curvado para baixo e o sangue no microcanal 11, por baixo do sensor 42, é transferido para o sensor, e ocorre a reação cinética da mudança de cor.

Os componentes acima referidos, portanto:

- proporcionam um meio para conduzir o elemento na direção do canal 11, para um contacto ativado entre o sensor e o sangue;
- permitem a iluminação simultânea do sensor 45 e a recolha da intensidade de luz refletida;
- permitem a deteção ótica de áreas de um pequeno sensor;
- reduzem a interferência de reflexões Fresnel na

superfície do sensor.

Em alternativa, como mostrado na figura 10, um conjunto 94 guia ótico de ondas/fibra ótica em conjunto com o elemento 80 de índice correspondente intermédio é utilizado para iluminar o sensor 45 e recolher luz refletida, enquanto a guia de ondas/fibra 94 serve, simultaneamente, para deslocar o elemento 80 e, conseqüentemente, o sensor 45 contra o percurso de fluido ou canal 11. O guia ótico de ondas/fibra ótica 90 pode, igualmente, acionar diretamente o sensor 45, se o elemento de índice correspondente estiver dotado com um revestimento especial.

O conjunto 94 guia de ondas ótico /fibra ótica é acionado mecanicamente por um mecanismo de acionamento (um motor ou outra unidade de acionamento, ou um mecanismo traduzindo o movimento do microdispositivo de amostragem num deslocamento do guia de ondas ótico/fibra ótica). O material 80 elastomérico intermédio traduz o deslocamento mecânico da fibra ótica ou de outro mecanismo mecânico de acionamento diretamente para o sensor 45, servindo, desse modo, como um mediador para o acionamento/contacto ativado entre o sensor 45 e a parte adjacente do microcanal 11 de fluido cheio com sangue.

O conjunto 94 de fibras 96 de pequeno diâmetro é, além disso, utilizado para aceder a pequenas regiões no sensor 45, visto que o cone de aceitação de luz para cada fibra 96 única no conjunto é limitado pela sua abertura numérica. Um conjunto densamente apertado de fibras serve, assim, para amostragem de pequenas regiões diferenciadas no sensor. Algumas das fibras podem, realmente, fazer a amostragem de partes da área molhada de deteção no sensor, enquanto outras fibras fazem a amostragem

das partes não molhadas. O conjunto de fibras pode ser acoplado a um agrupamento de detetores ou CCD para leitura individual das fibras, gerando, assim, uma imagem da área de deteção. A amostragem individual das fibras permite a deteção numa pequena área do sensor, ao mesmo tempo que as tolerâncias de posicionamento mecânico são amplamente afrouxadas.

Pode aceder-se a cada fibra única para iluminação do sensor ou para recolha da luz refletida difusa, ou para iluminação e recolha simultâneas se for utilizado um divisor de feixe apropriado. Uma distribuição aleatória das fibras no conjunto é desejável para proporcionar uma iluminação homogénea do sensor e uma cobertura de deteção completa da superfície do sensor.

A Fig. 11 mostra um exemplo de um dispositivo de amostragem de fluido corporal, em que o canal 11 capilar aberto lateralmente tem uma secção 100 de amostragem e uma secção 102 de descarga que se bifurca a montante da secção de amostragem para recolher uma fração de fluido corporal que entra, primeiro, no capilar, na região 104 de ponta. Isto, mais uma vez, permite a descarga de fluido de amostra contaminado ou ISF, como explicado acima em ligação com a Fig. 6. Para receber a primeira parte do fluido, é necessário que a capilaridade da secção 102 de descarga seja mais elevada do que a capilaridade da secção 106 de entrada na região da ramificação 108. Para aumentar a capilaridade, a secção 102 de descarga pode ser fechada por uma tampa 110. Neste caso, é importante deixar aberto um respiradouro 112 na extremidade da secção da descarga.

A Fig. 12 representa uma forma de realização em que a secção de descarga é estendida para compreender uma região 114 para resíduos e uma região 116 de reservatório a montante da

região para resíduos. A secção 100 de amostragem ou alvo não é cheia durante uma fase de colheita devido à abertura larga. Apenas na fase de contacto, quando o sensor 118 é posto em contacto com a secção 100 de amostragem e fecha esta região como uma tampa, é que a capilaridade é aumentada e o sangue é aspirado da região 116 de reservatório para a secção 100 de amostragem. Deste modo, é necessário que o volume da secção de descarga seja suficientemente grande para encher a secção 100 de amostragem e, além disso, recolher o fluido residual.

Como mostrado na Fig. 13, para acelerar o enchimento da secção de amostragem, podem ser empregues múltiplas secções 102 de descarga. Podem ser utilizadas diferentes configurações 120 de intersecção para orientar o fluido sob ação capilar (Fig. 14).

São proporcionados os seguintes aspetos exemplificativos para fins ilustrativos:

Um dispositivo para amostragem de fluido corporal compreendendo:

- um percurso (11) de fluido para receber fluido corporal, em que, pelo menos, uma parte do referido percurso (11) de fluido está aberta para o ambiente, e
- um meio (40) de receção de fluido afastado do referido percurso (11) de fluido, de modo que o fluido no referido percurso (11) não esteja em contacto de fluido com o meio (40) de receção de fluido num primeiro estado,

O dispositivo pode, ainda, compreender um elemento (10) de perfuração de pele tendo o referido percurso (11) de fluido.

Num outro aspeto, o meio (40) de receção de fluido compreende uma zona (45) de ensaio.

Ainda noutro aspeto, o meio (40) de receção de fluido está separado do percurso (11) de fluido por uma abertura (92) de ar, mantida, de um modo preferido, por espaçadores (90).

Num outro aspeto, o referido dispositivo está adaptado para sofrer uma alteração física após acionamento, de modo a assumir um estado de contacto no qual um fluido no referido percurso (11) de fluido contactar com o referido meio (40) de receção de fluido.

Ainda noutro aspeto, o referido dispositivo tem uma parte (13) móvel que pode ser movimentada e, pelo menos, uma parte do referido percurso (1) de fluido ou meio (40) de recepção de fluido está posicionada na referida parte (13) móvel para assumir o estado de contacto.

De acordo com outro aspeto, o referido elemento (10) de perfuração de pele tem uma região de transferência de fluido e, pelo menos, uma parte do referido percurso (11) de fluido na referida região de transferência de fluido tem paredes (11') aguçadas.

De acordo com outro aspeto, o referido meio (40) de receção de fluido compreende uma estrutura de camada que pode ser pressionada ou cortada pelas referidas paredes (11') aguçadas.

De acordo com um outro aspeto, o fluido corporal recebido no referido percurso (11) de fluido é movido, por acionamento elétrico, para o meio (40) de receção de fluido.

Também é preferido que o elemento (10) de perfuração de pele tenha uma zona (26) de recolha, na qual estão localizados elementos (26') verticais.

De acordo com outro aspeto, o percurso (11) de fluido ou o meio (40) de receção de fluido têm meios de confinamento para confinar a área de transferência de fluido do percurso (11) de fluido para o meio (40) de receção de fluido.

De acordo com outro aspeto, o referido percurso (11) de fluido tem partes de parede salientes e uma superfície adjacente ao percurso (11) de fluido é reentrante relativamente às partes de parede salientes.

De acordo com outro aspeto, uma superfície adjacente ao percurso (11) de fluido é hidrófoba.

De acordo com outro aspeto, o referido meio (40) de receção de fluido compreende uma zona (45) de ensaio e, pelo menos uma de entre uma zona de reação, uma zona de filtragem e uma zona de mistura.

De acordo com outro aspeto, o referido elemento de perfuração de pele tem dois ou mais percursos (11) de fluido.

De um modo preferido, o referido percurso (11) de fluido, numa primeira região (a), tem uma primeira largura e, numa outra região (c), tem uma segunda largura que é menor do que a

primeira largura.

De acordo com outro aspeto, o referido percurso (11) de fluido compreende, ainda, uma zona (b) de recolha.

De acordo com outro aspeto, a referida zona (45) de ensaio está localizada em ou em contacto com uma parte intermédia do percurso (11) de fluido, de modo que a parte de fluido que entra, em primeiro lugar, no percurso não seja contactada pela zona (45) de ensaio.

De acordo com outro aspeto, o percurso (11) de fluido tem uma secção (100) de amostragem e, pelo menos, uma secção (102) de descarga localizada a jusante da secção (100) de amostragem e/ou ramificando-se a montante da secção (100) de amostragem para receber uma fração do fluido corporal que entra, em primeiro lugar, no percurso (11), e em que a secção (100) de amostragem é uma zona (45) de ensaio ou pode ser contactada com uma zona (45) de ensaio para análise de fluido corporal ali contido.

Um outro aspeto compreende um dispositivo para a amostragem de fluido corporal compreendendo um elemento (10) de perfuração de pele com um canal capilar sob, de um modo preferido, a forma de um percurso (11) de fluido aberto lateralmente para receber fluido corporal, em que o canal tem uma secção (100) de amostragem e, pelo menos, uma secção (102) de descarga localizada a jusante da secção (100) de amostragem e/ou ramificando-se a montante da secção (100) de amostragem para receber uma fração do fluido corporal que entra, em primeiro lugar, no percurso (11), e em que a secção (100) de amostragem é uma zona (45) de ensaio ou pode ser contactada por uma zona (45)

de ensaio para análise de fluido corporal ali contido.

De acordo com outro aspeto, a secção (100) de amostragem é cheia através de uma secção (106) de entrada do canal (11) capilar, sendo a capilaridade da secção (106) de entrada menor do que a capilaridade da, pelo menos uma, secção (102) de descarga que se ramifica desde a secção de entrada.

De acordo com outro aspeto, a capilaridade da secção (102) de descarga é aumentada por meio de uma tampa (110) que fecha uma parte lateral aberta da secção (102) de descarga.

De acordo com outro aspeto, a secção (102) de descarga tem uma região (114) para resíduos e uma região (116) de reservatório a montante da região (114) para resíduos, e em que o fluido corporal da região (116) de reservatório é introduzido na secção (100) de amostragem após uma fase de recolha.

De acordo com outro aspeto, a capilaridade da secção (100) de amostragem é aumentada através do contacto de um meio (40) de receção de fluido após o enchimento da secção (102) de descarga.

De acordo com outro aspeto, o volume da secção (102) de descarga é maior do que o volume da secção (100) de amostragem.

Um outro aspeto compreendendo um dispositivo para análise de fluido corporal compreendendo

um elemento (10) de perfuração de pele com um percurso (11) de fluido para receber fluido corporal, em que, pelo menos, uma parte do referido percurso (11) de fluido está aberta para o ambiente, e



um meio (40) de receção de fluido afastado do referido percurso (11) de fluido, de modo que o fluido no referido percurso (11) não esteja em contacto de fluido com o meio (40) de receção de fluido, compreendendo o referido meio (40) de receção de fluido uma zona (45) de ensaio.

De um modo preferido, o referido dispositivo compreende um dispositivo de medição com uma unidade de deteção para receber sinais da referida zona (45) de ensaio para determinar a presença e/ou concentração de um analito.

De acordo com outro aspeto, o referido dispositivo de medição inclui um suporte no qual o referido meio (40) de receção de fluido é recebido e é permitida a transmissão de sinal da zona (45) de ensaio para o detetor.

De um modo preferido, o referido dispositivo compreende um meio de contacto que contacta uma parte do percurso (11) de fluido com o meio (40) de receção de fluido para dotar a zona (45) de ensaio com fluido de amostra.

De acordo com outro aspeto, o referido dispositivo de medição tem uma unidade de processamento que recebe um sinal indicando que o meio de contacto contactou o percurso (11) de fluido com o meio (40) de receção de fluido ou que fluido de amostra alcançou a zona (45) de ensaio.

De acordo com outro aspeto, o referido meio de contacto compreende meios de aplicação de tensão para aplicar um potencial elétrico entre o referido percurso (11) de fluido e o referido meio (40) de receção de fluido, de modo que o fluido do

percurso (11) de fluido contacte com o meio (40) de recepção de fluido.

De acordo com outro aspeto, o referido meio de contacto aplica uma força a uma parte (13) móvel do percurso (11) de fluido ou do meio (40) de recepção de fluido para colocar o percurso (11) de fluido e o meio (40) de recepção de fluido em contacto mútuo.

De um modo preferido, o referido dispositivo compreende meios (74, 76) de contacto magnético para aplicar um campo (72) magnético de modo a colocar o percurso (11) de fluido e o meio (40) de recepção de fluido em contacto de transferência de fluido.

De acordo com outro aspeto, os meios (74, 76) de contacto magnético incluem um íman permanente, um eletroímã (76), um solenoide ou um fio de transporte de corrente.

De acordo com outro aspeto, pelo menos um, de entre um material (74) paramagnético ou ferromagnético ou um elemento de transporte de corrente ou um elemento, de um modo preferido, em forma de anel, para produzir um momento de dipolo magnético sob a influência de campos magnéticos variáveis no tempo, é incorporado ou fixado a uma parte do percurso (11) de fluido e/ou do meio (40) de recepção de fluido.

De acordo com outro aspeto, o meio de contacto tem um elemento (80) de correspondência ótica para acoplar a zona (45) de ensaio a uma unidade de deteção ótica, estando o elemento (80) de correspondência ótica, adaptado para exercer uma força mecânica para colocar o percurso (11) de fluido e o

meio (40) de recepção de fluido num estado de contacto.

De acordo com outro aspeto, a unidade de deteção ótica inclui um refletómetro ligado ao elemento (80) de correspondência ótica através de uma unidade ótica compreendendo lentes, guias de onda óticas e/ou fibras (94) óticas.

De acordo com outro aspeto, o elemento (80) de correspondência ótica é proporcionado por um revestimento da unidade ótica voltada para a zona (45) de ensaio.

De acordo com outro aspeto, o elemento (80) de correspondência ótica tem um índice de refração correspondente ao índice de refração da zona (45) de ensaio.

De acordo com outro aspeto, o elemento (80) de correspondência ótica consiste num material elastomérico.

De acordo com outro aspeto, o elemento (80) de correspondência ótica está disposto num lado da zona (45) de ensaio oposto ao percurso (11) de fluido e é concebido, de um modo preferido, como um braço de alavanca ou atuador para a transdução de deslocamento mecânico, para assumir um estado de contacto entre o percurso (11) de fluido e a zona (45) de ensaio.

De um modo preferido, o referido dispositivo compreende um meio de acionamento para fazer com que o elemento (10) de perfuração de pele penetre na pele, para perfurar a pele de modo a obter uma amostragem de fluido corporal.

Um outro aspeto refere-se a um método para determinar uma

concentração de analito no fluido corporal compreendendo os seguintes passos:

- receber fluido corporal num percurso (11) de fluido (11), de um modo preferido, de um elemento (10) de perfuração de pele, estando o percurso (11) de fluido espacialmente separado de um meio (40) de receção de fluido (40) durante o enchimento,
- contactar o percurso (11) de fluido com o meio (40) de receção de fluido, de modo que o fluido corporal do percurso (11) de fluido contacte o meio (40) de receção de fluido e atinja uma zona (45) de ensaio,
- receber sinais da referida zona (45) de ensaio, que são característicos de uma concentração de analito,
- processar os referidos sinais para determinar a concentração de analito.

De um modo preferido, um período de tempo que inicie com o passo b) é monitorizado e a determinação de concentração de analito é iniciada com base no tempo decorrido.

É, ainda, preferido que o passo b) inicie uma monitorização de sinais e que a alteração de sinal ao longo do tempo seja utilizada para determinar um ponto no tempo para a determinação da concentração.

É também vantajoso picar a pele com o referido elemento (10) de perfuração de pele.

Um outro aspeto refere-se a um dispositivo analítico compreendendo

- uma estrutura de suporte tendo um canal (11) no seu interior, a qual é acessível a partir da zona envolvente em, pelo menos, uma região de acesso, tendo o referido canal uma região (a) de introdução de fluido, bem como uma região (d) de descarga localizada a jusante da região de acesso,
- um meio (40) de receção de fluido,
- estando o meio (40) de receção de fluido espaçado do canal, num primeiro estado, e estando o meio (40) de receção de fluido em contacto com fluido localizado na região de acesso, num segundo estado, para receber fluido, de modo que o meio (40) de receção de fluido não entre em contacto com um fluido da região de descarga.

Um outro aspeto refere-se a um método de amostragem de fluidos compreendendo os seguintes passos

- introduzir fluido numa região de introdução de uma estrutura de suporte que tem um canal no seu interior, enchendo o referido fluido uma região de acesso da estrutura de suporte, a qual é acessível a partir da zona envolvente e tendo uma região (114) para resíduos situado a jusante da região de acesso,
- fazer contactar de um meio (40) de receção de fluido com fluido localizado na região de acesso para receber

fluido, mas não com uma parte de fluido na região de descarga.

Um outro aspeto refere-se a um dispositivo analítico compreendendo

- uma estrutura de suporte tendo um canal para receber fluido no seu interior, que é acessível a partir da zona envolvente em, pelo menos, uma região de acesso,
- um meio (40) de receção de fluido espaçado do canal,
- uma fonte de potencial eléctrico, que, quando ligada, aplica um potencial eléctrico entre o fluido na referida região de acesso e o referido meio (40) de receção de fluido, de modo que o fluido proveniente da referida região de acesso seja transportado para o referido meio (40) de receção de fluido.

De um modo preferido, o meio (40) de receção de fluido compreende uma zona (45) de ensaio.

É, ainda, preferido que a região de acesso seja uma parte ampliada do canal que forma uma câmara aberta e que na câmara estejam localizados elementos verticais.

Um outro aspeto refere-se a um método para o transporte de fluido desde uma estrutura de suporte para um meio (40) de receção de fluido, compreendendo os seguintes passos

- suportar uma estrutura de suporte tendo um canal para receber fluido no seu interior, a qual é acessível a

partir da zona envolvente em, pelo menos, uma região de acesso numa relação espaçada relativamente a um meio (40) de receção de fluido,

- aplicar um potencial elétrico entre o fluido na referida região de acesso e o referido meio (40) de receção de fluido, de modo que o fluido proveniente da referida região de acesso seja transportado para o referido meio (40) de receção de fluido.

Um outro aspeto refere-se a um sistema para análise de fluido corporal compreendendo

- um elemento de perfuração de pele com um percurso (11) de fluido para receber fluido corporal, em que, pelo menos, uma parte do referido percurso (11) de fluido é aberta para o ambiente e
- um meio (40) de receção de fluido espaçado do referido percurso (11) de fluido, de modo que o fluido no referido percurso não entre em contacto com o meio (40) de receção de fluido, compreendendo o referido meio (40) de receção de fluido uma zona (45) de ensaio,
- um meio de transporte para transportar o elemento (10) de perfuração de pele de modo a colocá-lo em contacto com o meio (40) de receção de fluido.

De um modo vantajoso, o sistema compreende, ainda, um compartimento armazenando múltiplos meios (40) de receção de fluido.

De um modo vantajoso, o sistema compreende, ainda, uma unidade de exposição para expor, sucessivamente, meios (40) de receção de fluido a partir do referido compartimento para receber fluido.

Lisboa, 29 de maio de 2015



## REIVINDICAÇÕES

1. Método para determinar uma concentração de analito no fluido corporal compreendendo os seguintes passos:
  - a) receber fluido corporal num percurso (11) de fluido de um elemento (10) de perfuração de pele, estando o percurso (11) de fluido separado espacialmente de e sem contacto de fluido relativamente a um meio (40) de receção de fluido, durante o enchimento,
  - b) fazer contactar o percurso (11) de fluido com o meio (40) de receção de fluido, de modo que o fluido corporal proveniente do percurso (11) de fluido contacte com o meio (40) de receção de fluido e chegue a uma zona (45) de ensaio,
  - c) receber os sinais da referida zona (45) de ensaio, os quais são característicos de uma concentração de analito,
  - d) processar os referidos sinais para determinar a concentração do analito.
  
2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que um período de tempo que inicie com o passo b) é monitorizado e a determinação da concentração de analito é iniciada com base no tempo decorrido.
  
3. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o passo b) inicia a monitorização de sinais e a alteração de sinal ao longo do tempo é utilizada para determinar um ponto no tempo para a determinação da concentração.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, compreendendo picar a pele com o referido elemento (10) de perfuração de pele.
5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, compreendendo aplicar uma força a uma parte (13) móvel do percurso (11) de fluido ou do meio (40) de receção de fluido para fazer contactar o percurso (11) de fluido e o meio (40) de receção de fluido, num contacto mútuo.
6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que o passo b) compreende a dobragem de uma parte (51) dobrável do elemento (10) de perfuração de pele.
7. Sistema para análise de fluido corporal compreendendo
  - um elemento de perfuração de pele com um percurso (11) de fluido para receber fluido corporal, em que, pelo menos, uma parte do referido percurso (11) de fluido é aberta para o ambiente, caracterizado por:
    - um meio (40) de receção de fluido estar espaçado do referido percurso (11) de fluido, de modo que o fluido no referido percurso não entre em contacto com o meio (40) de receção de fluido durante o enchimento, o referido meio (40) de receção de fluido compreendendo uma zona (45) de ensaio ,
    - um meio de transporte para transportar o elemento (10) de perfuração da pele de modo a colocá-lo em contacto com o meio (40) de receção de fluido.

8. Sistema de acordo com a reivindicação 7, compreendendo, ainda, um compartimento armazenando múltiplos meios (40) de receção de fluido.
9. Sistema de acordo com a reivindicação 8, compreendendo, ainda, uma unidade de exposição para expor, sucessivamente, meios (40) de receção de fluido a partir do referido compartimento para receber fluido.
10. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 9, compreendendo, ainda, um dispositivo de medição com uma unidade de deteção para receber sinais da referida zona (45) de ensaio para determinar a presença e/ou concentração de um analito.
11. Sistema de acordo com a reivindicação 10, em que a unidade de deteção compreende um agrupamento de detetores para a geração de uma imagem de uma área de deteção.
12. Sistema de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 11, em que o percurso (11) de fluido, formado, de um modo preferido, como um capilar tem uma molhabilidade para a absorção de fluido corporal de tal modo que o ângulo de molhagem é inferior a 90°.

Lisboa, 29 de Maio de 2015

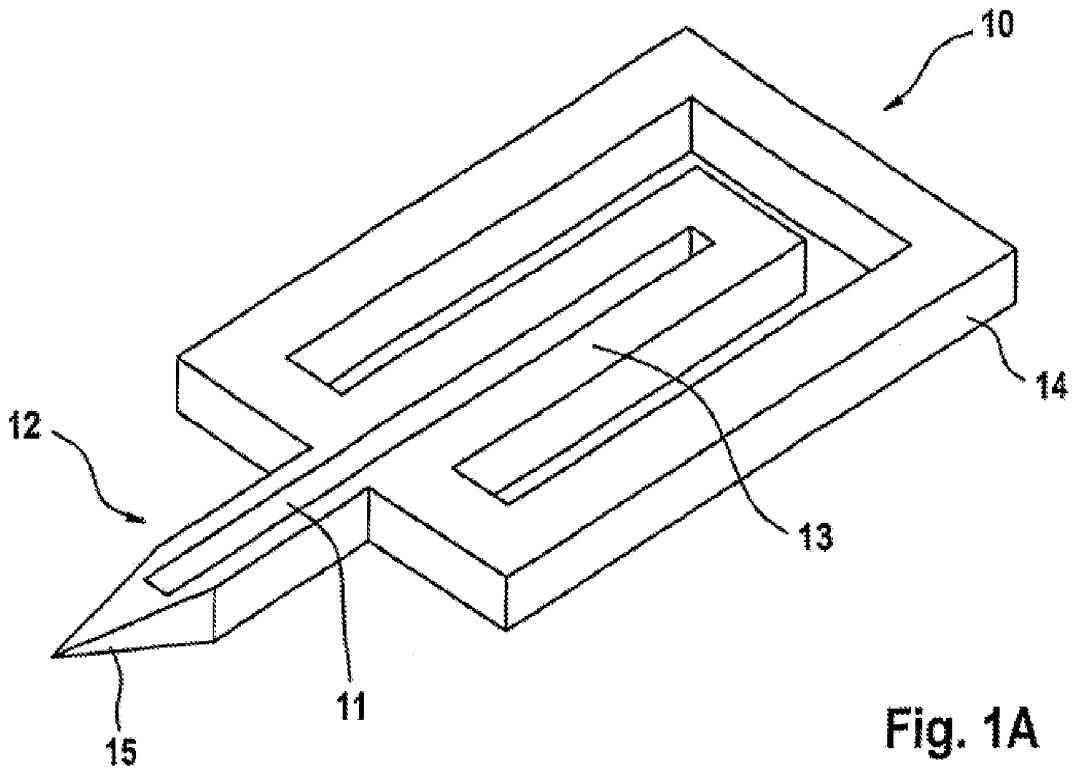


Fig. 1A

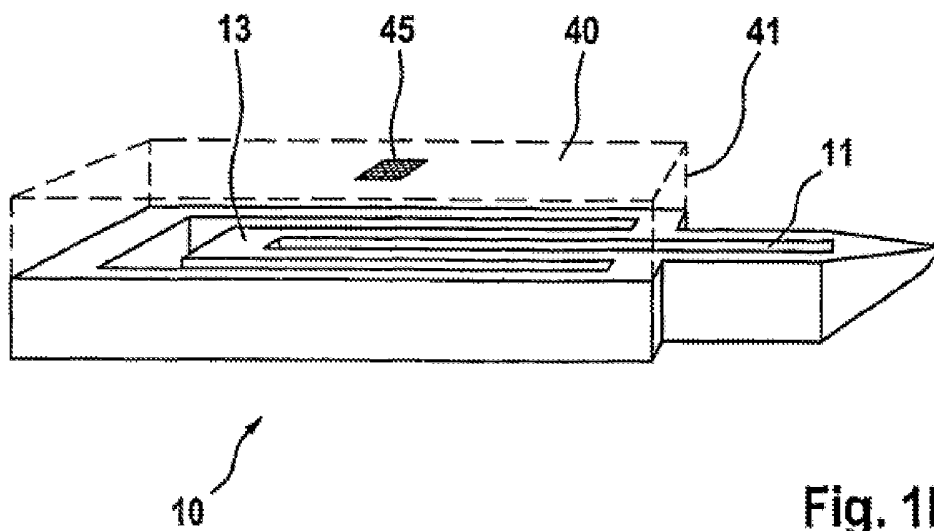


Fig. 1B

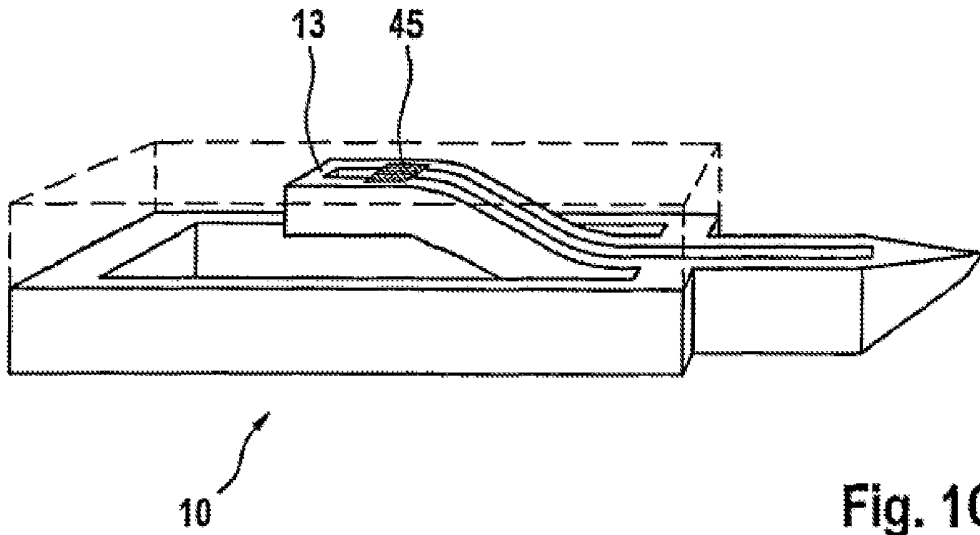


Fig. 1C

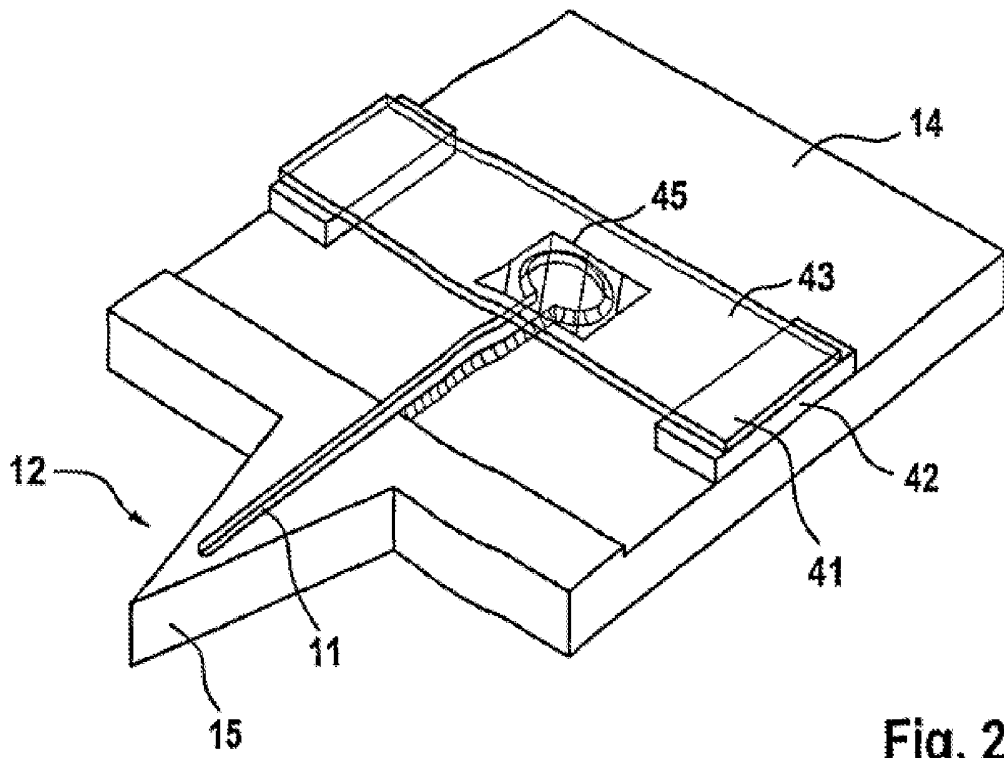


Fig. 2A

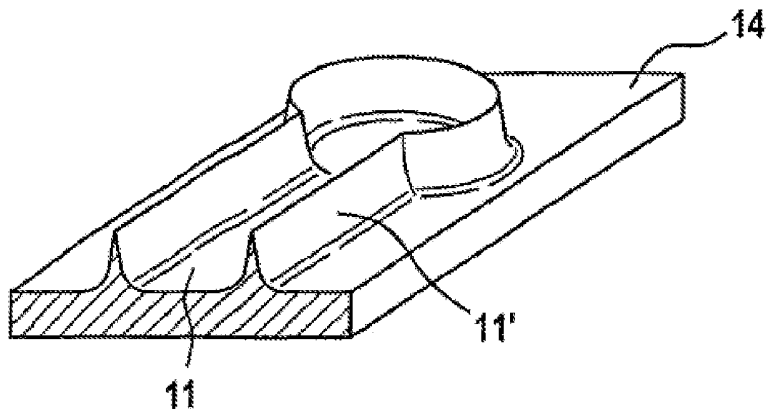


Fig. 2B

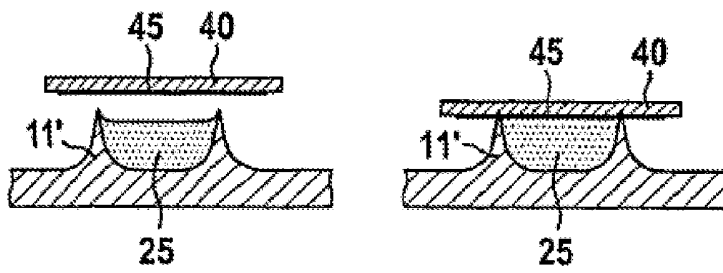


Fig. 2C

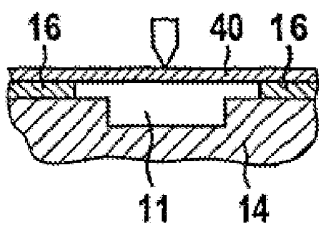


Fig. 3A

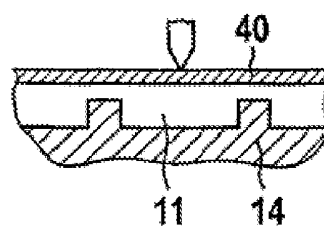


Fig. 3B

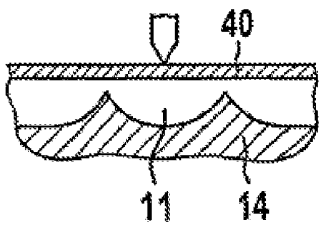


Fig. 3C

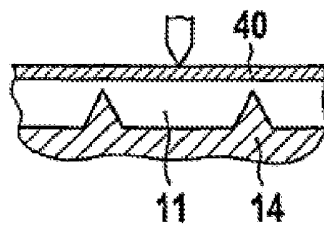


Fig. 3D

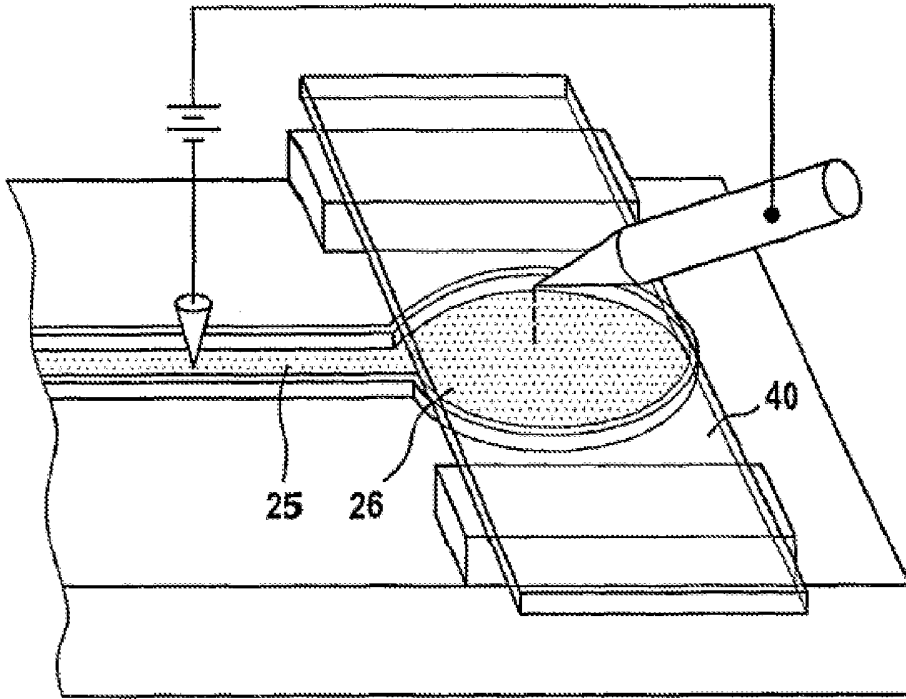


Fig. 4A

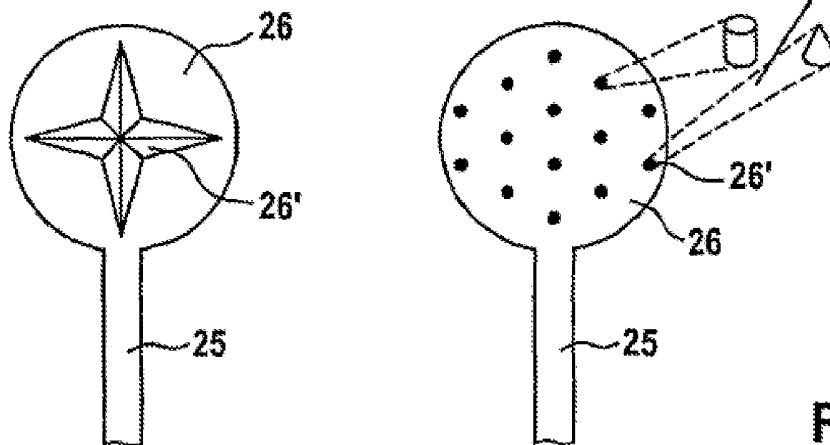


Fig. 4B

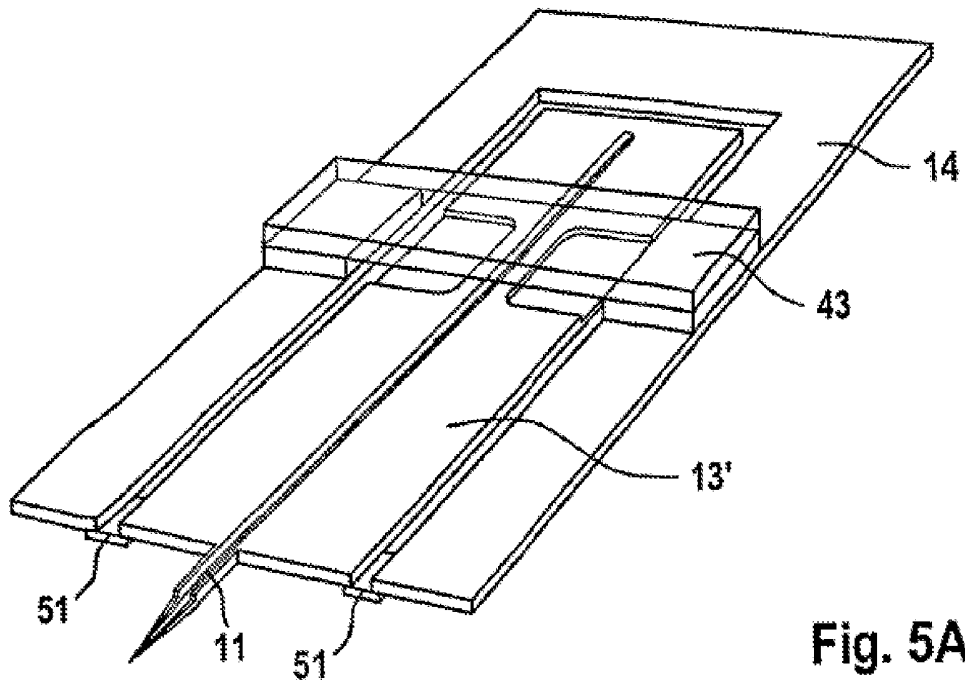


Fig. 5A

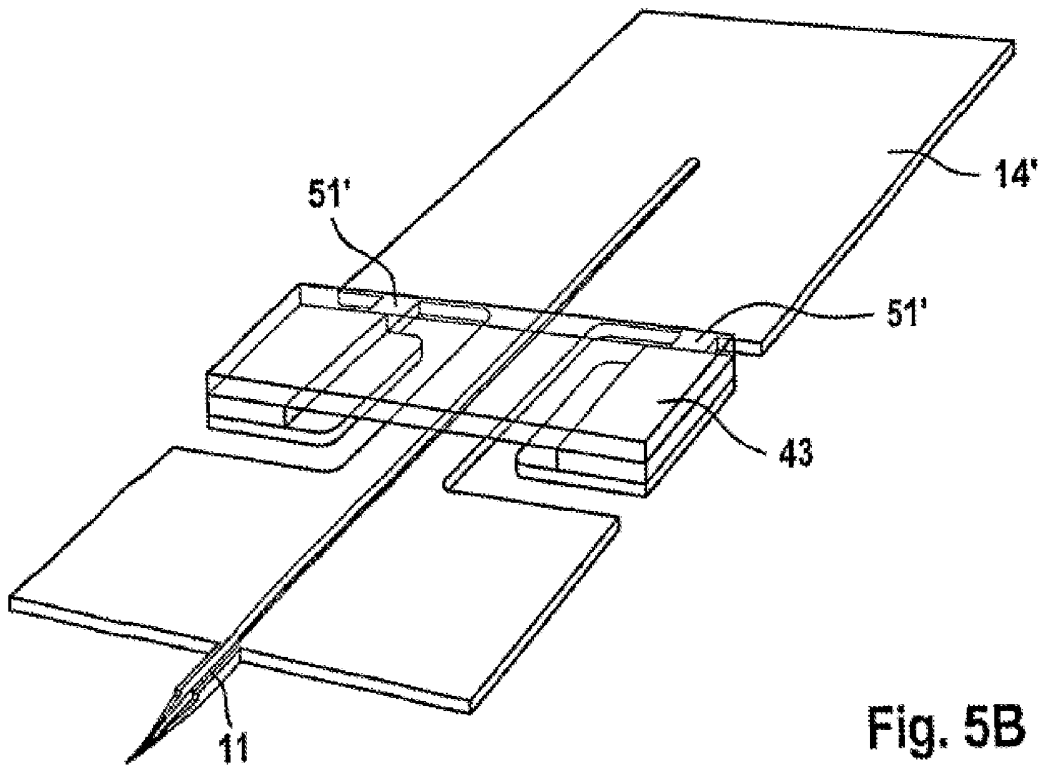


Fig. 5B



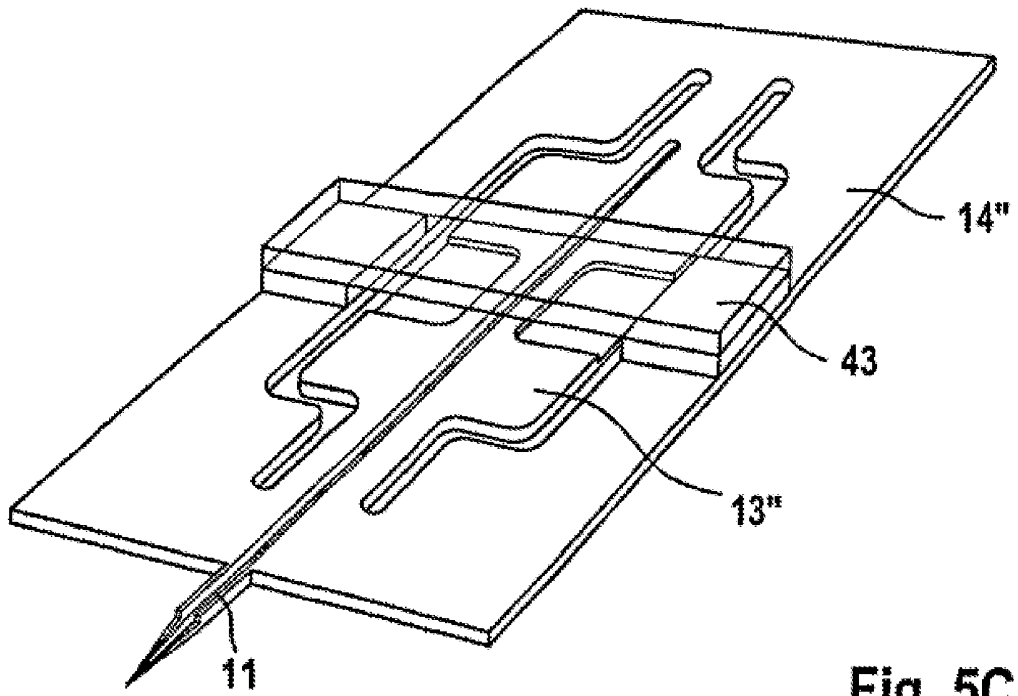


Fig. 5C

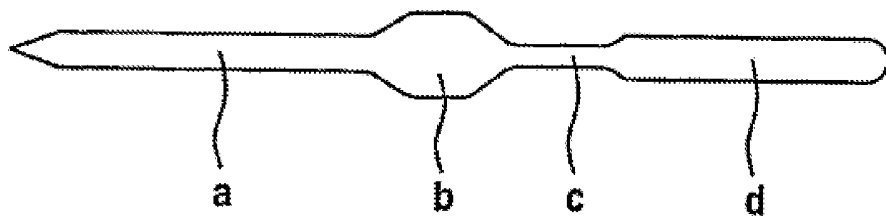
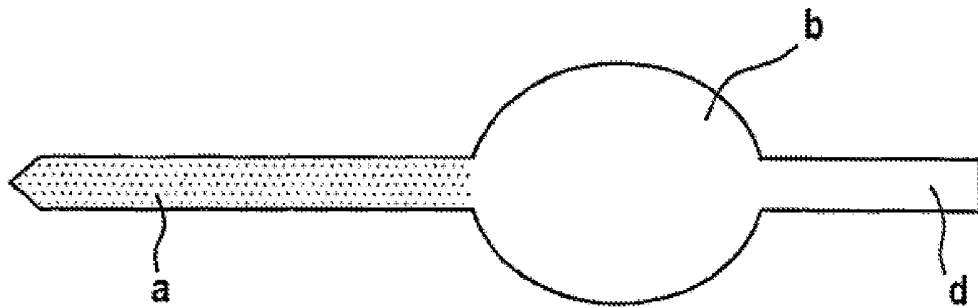
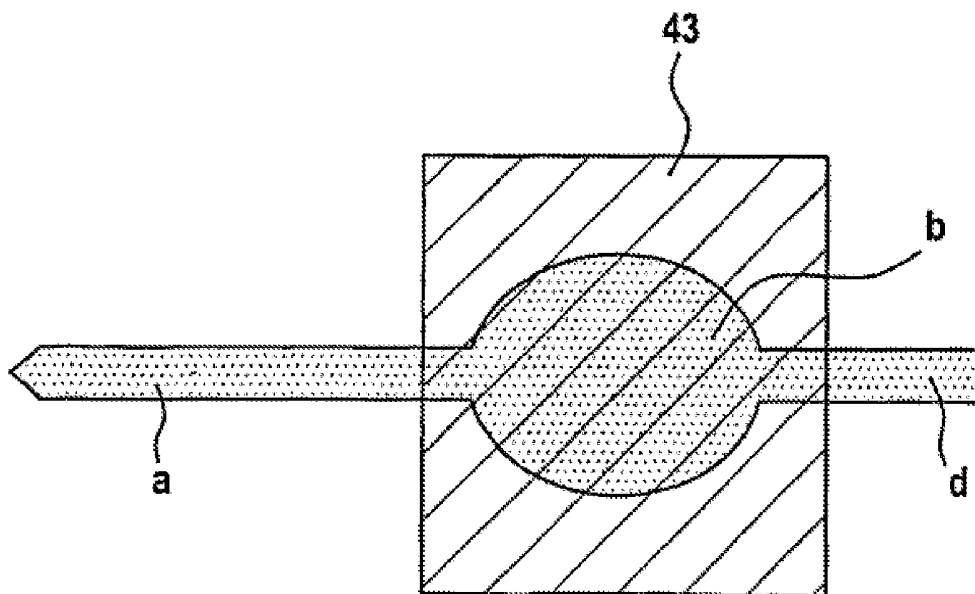


Fig. 6



**Fig. 7A**



**Fig. 7B**

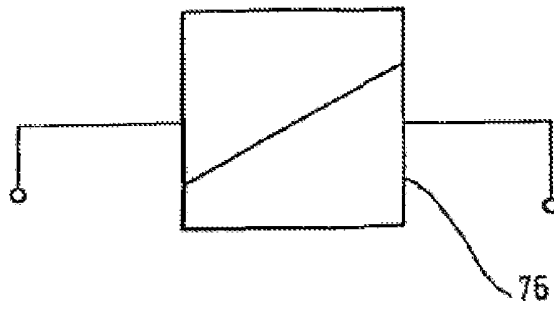
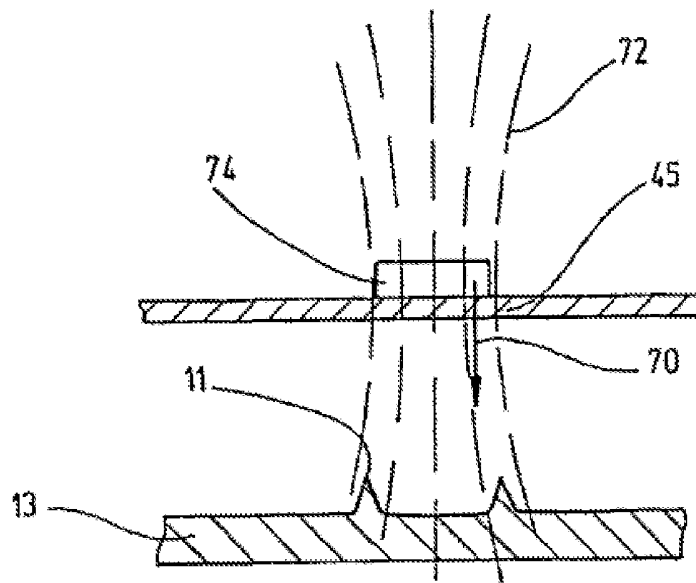


Fig.8

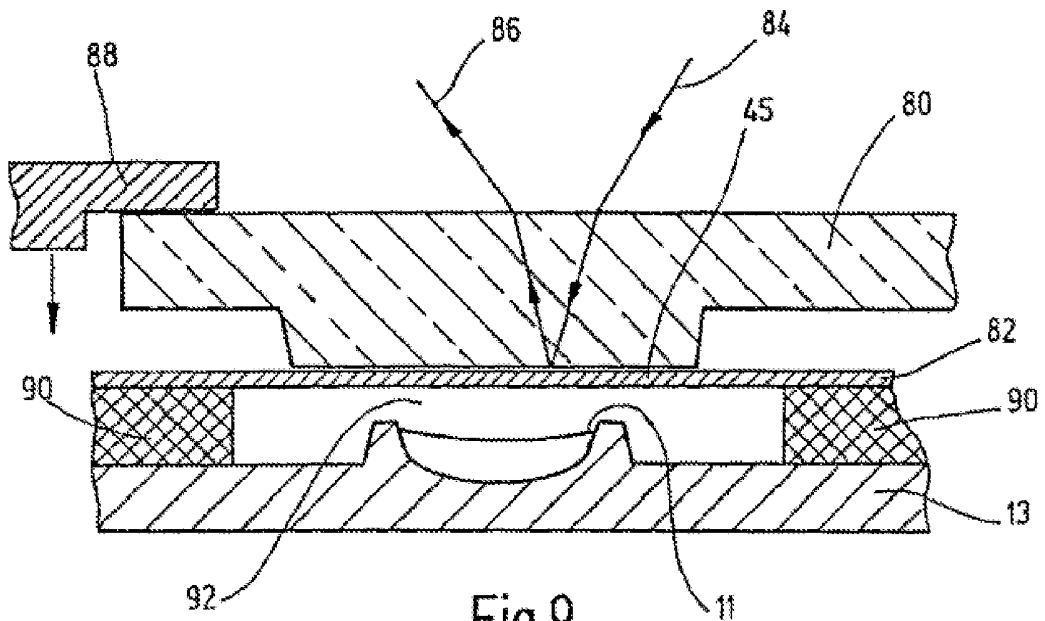


Fig.9

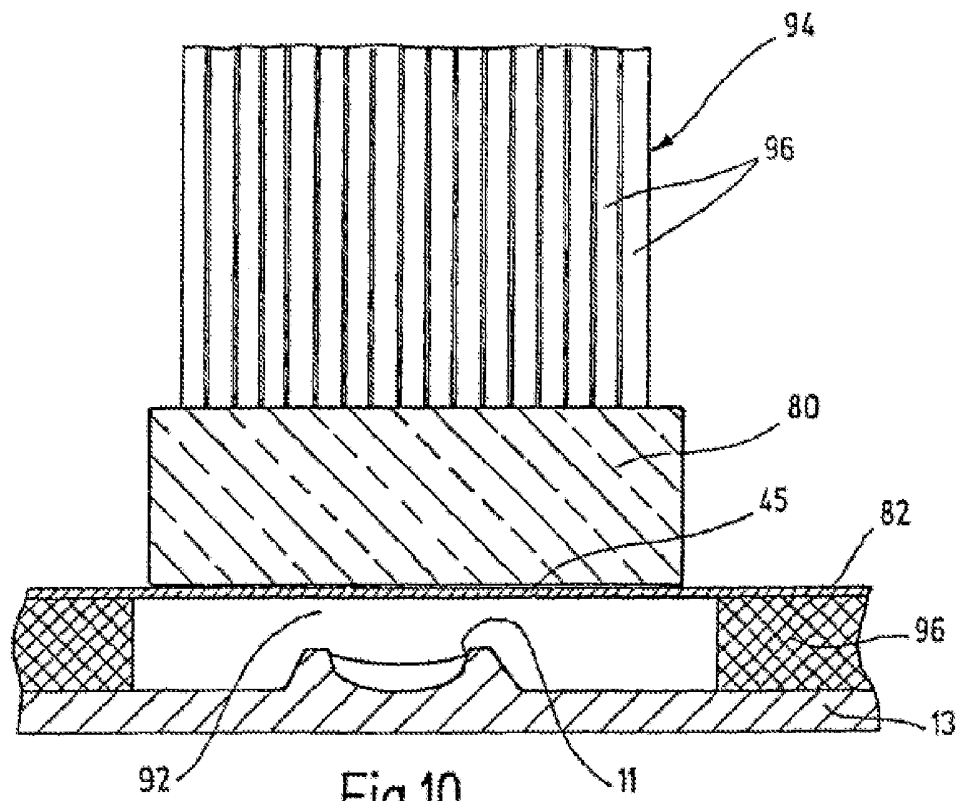


Fig.10

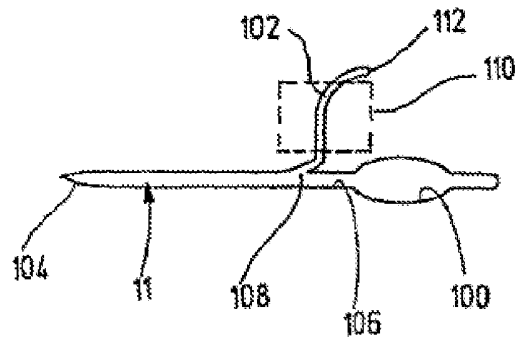


Fig.11

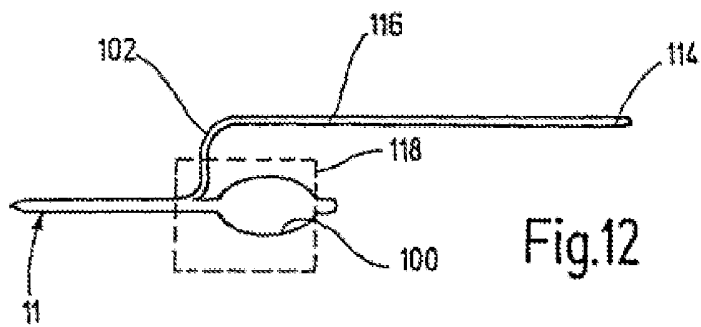


Fig.12

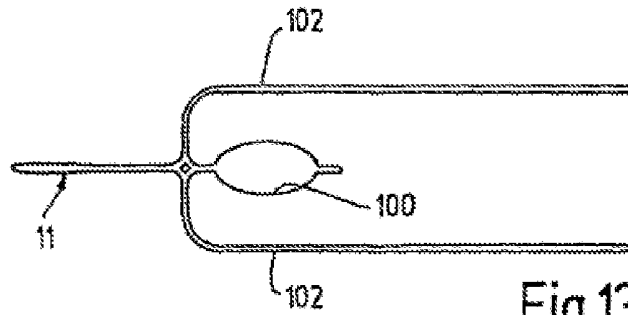


Fig.13

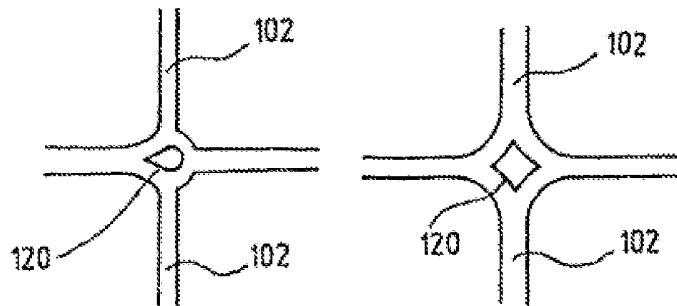


Fig.14