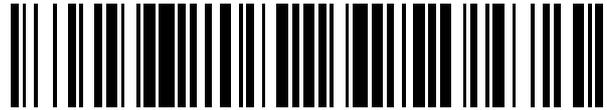


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 574**

51 Int. Cl.:

G01N 27/327 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2008 E 12183630 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2535704**

54 Título: **Procedimiento de ensayo multielectrodo**

30 Prioridad:

24.09.2007 US 974823 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.10.2015

73 Titular/es:

**BAYER HEALTHCARE LLC (100.0%)
100 Bayer Boulevard
Whippany, NJ 07981-0915, US**

72 Inventor/es:

**WU, HUAN-PING;
ZHONG, WEIPING;
PERRY, JOSEPH E.;
MAURER, ERIC y
JUNG, SUNG-KWON**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 547 574 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de ensayo multielectrodo

Antecedentes

5 Los biosensores proporcionan un análisis de un fluido biológico, tal como sangre completa, suero, plasma, orina, saliva, fluido intersticial, o fluido intracelular. Por lo general, los biosensores tienen un dispositivo de medición que analiza una muestra que reside en un sensor de ensayo. La muestra está por lo general en forma líquida y además de ser un fluido biológico, puede ser un derivado de un fluido biológico, tal como un extracto, una dilución, un filtrado, o un precipitado reconstituido. El análisis realizado por el biosensor determina la presencia y/o la concentración de uno o más analitos, tales como alcohol, glucosa, ácido úrico, lactato, colesterol, bilirrubina, ácidos grasos libres, triglicéridos, proteínas, cetonas, fenilalanina o enzimas, en el fluido biológico. El análisis puede ser útil en el diagnóstico y el tratamiento de anomalías fisiológicas. Por ejemplo, un individuo diabético puede usar un biosensor para determinar el nivel de glucosa en sangre completa para los ajustes de la dieta y/o la medicación.

15 Numerosos biosensores analizan un analito individual y usan diversas técnicas para mejorar la exactitud y/o la precisión del análisis. La exactitud se puede expresar en términos de la desviación de la lectura de analito del sistema del sensor en comparación con una lectura de analito de referencia, representando los mayores valores de desviación una menor exactitud, mientras que la precisión se puede expresar en términos de la dispersión o varianza entre múltiples mediciones. Se puede usar información de calibración para mejorar la exactitud y/o la precisión del análisis y se puede leer a partir de un sensor de ensayo en el dispositivo de medición antes del análisis. El dispositivo de medición usa la información de calibración para ajustar el análisis del fluido biológico en respuesta a uno o más parámetros, tales como el tipo de fluido biológico, el analito o analitos particulares, y las variaciones de fabricación del sensor de ensayo. Los biosensores se pueden implementar usando dispositivos de medición de sobremesa, portátiles, y similares. Los dispositivos de medición portátiles pueden ser de mano y permitir la identificación y/o la cuantificación de un analito en una muestra. Algunos ejemplos de sistemas de medición portátiles incluyen los medidores Ascensia Breeze® y Elite® de Bayer HealthCare en Tarrytown, Nueva York, mientras que algunos ejemplos de sistemas de medición de sobremesa incluyen la Estación de Trabajo Electroquímica (Electrochemical Workstation) disponible en CH Instruments en Austin, Texas.

30 La entrada de señal eléctrica en el sensor de ensayo del dispositivo de medición puede ser un potencial o una corriente y puede ser constante, variable, o una combinación de los mismos, tal como cuando se aplica una señal de CA con una compensación de señal de CC. La señal de entrada se puede aplicar en forma de un pulso individual o en pulsos, secuencias, o ciclos múltiples. El analito o la especie medible experimenta una reacción redox cuando la señal de entrada se aplica a la muestra. La reacción redox genera una señal de salida que se pueden medir de forma constante o periódica durante una salida transitoria y/o de estado estacionario. A diferencia de la señal de salida transitoria que es cambiante, la salida de estado estacionario se observa cuando el cambio de una señal con respecto a su variable de entrada independiente (tiempo, etc.) es básicamente constante, tal como dentro de ± 10 o ± 5 %.

40 Se pueden usar diversos procedimientos electroquímicos tales como colorimetría, amperimetría, voltimetría, o similares. A diferencia de la colorimetría, la amperimetría y la voltimetría miden generalmente la tasa a la que se oxida o reduce el analito para determinar la concentración de analito en la muestra. En la amperimetría, se aplica una señal eléctrica de potencial (tensión) constante a los conductores eléctricos del sensor de ensayo mientras que la señal de salida medida es una corriente. En la voltimetría, se aplica un potencial variable a una muestra de fluido biológico. También se pueden usar procedimientos de amperimetría con desconexión cíclica y voltimetría con desconexión cíclica que incluyen ciclos alternantes de excitación y relajación.

45 El "efecto de hematocrito" es un factor que puede reducir la exactitud y/o la precisión de un análisis realizado en una muestra de sangre completa. Además de agua, glucosa, proteínas, cetonas, y otras moléculas biológicas, las muestras de sangre completa contienen glóbulos rojos. El hematocrito es el volumen de muestra de sangre completa ocupado por glóbulos rojos con respecto al volumen total de la muestra de sangre completa y a menudo se expresa como un porcentaje. Cuanto mayor se desvía el porcentaje de hematocrito del % de hematocrito de la calibración del sistema para una muestra de sangre completa, mayor es la desviación (error) entre las lecturas de analito obtenidas a partir del biosensor. Por ejemplo, un sistema de biosensor convencional que tiene un conjunto de constantes de calibración (pendiente y ordenada en el origen para una muestra de sangre completa que contiene un hematocrito de un 40 %, por ejemplo) informará tres concentraciones de glucosa diferentes para muestras de sangre total que tienen concentraciones idénticas de glucosa, pero porcentajes de hematocrito de un 20 %, un 40 %, y un 60 %. De ese modo, incluso aunque las concentraciones de glucosa de la sangre completa sean las mismas, el sistema informará que la muestra de sangre completa con un hematocrito de un 20 % contiene más glucosa que la muestra de sangre completa con un hematocrito de un 40 %, y que la muestra de sangre completa con un hematocrito de un 60 % contiene menos glucosa que la muestra de sangre completa con un hematocrito de un 40 %. Dado que los biosensores convencionales se configuran generalmente para informar las concentraciones de glucosa suponiendo un contenido de hematocrito de un 40 % para la muestra de sangre completa, cualquier medición de glucosa realizada en una muestra de sangre que contiene un hematocrito menor o igual que un 40 % incluirá cierto error de desviación atribuible al efecto de hematocrito.

La desviación de hematocrito se puede expresar mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Desviación de \%Hct} = 100 \% \times (G_m - G_{ref})/G_{ref},$$

donde G_m y G_{ref} son las lecturas de glucosa medida y de glucosa de referencia, respectivamente, para cualquier nivel de hematocrito. Cuanto mayor es el valor absoluto de la desviación de %Hct, mayor es el efecto de hematocrito.

Además del efecto de hematocrito, también pueden producirse inexactitudes de medición cuando la concentración de la especie medible no correlaciona con la concentración de analito. Por ejemplo, cuando el biosensor determina la concentración de un mediador reducido generado en respuesta a la oxidación de un analito, cualquier mediador reducido no generado por oxidación del analito conducirá a una indicación de que está presente más analito en la muestra del que es correcto debido al fondo del mediador.

Conociendo la señal de salida atribuible a los factores que no responden a la concentración del analito, se puede restar la parte falsa de la señal de salida. Los sistemas convencionales han intentado aislar las partes no responsivas de la señal de salida colocando múltiples parejas de electrodos de trabajo y contraelectrodos en un depósito de muestra común. Al modificar los reactivos usados para formar los electrodos, estos sistemas intentan separar las partes responsivas y no responsivas del analito mediante la sustracción de las dos señales de salida.

Por ejemplo, los sistemas de sensor convencionales pueden tener múltiples áreas de detección en una cámara de muestra indivisa, donde cada electrodo de trabajo se confronta con un electrodo de referencia. En otro aspecto, estos sistemas pueden tener un electrodo de referencia individual. Los sistemas de estos tipos pueden proporcionar un sistema de calibración del sensor en el ensayo con dos patrones conocidos o pueden proporcionar sistemas de electrodos distintos para la determinación de analito, interferencia, y hematocrito, por ejemplo. Una desventaja común de estos sistemas es la cámara de muestra individual, donde los sistemas de electrodo/áreas de detección adyacentes se pueden contaminar químicamente entre sí debido a la difusión y/o movimiento del líquido. Esta desventaja puede ser especialmente problemática cuando un sistema de reactivo requiere un tiempo de ensayo más prolongado que otro y/o cuando el sensor de ensayo se altera mecánicamente después del llenado con muestra.

Se conoce un biosensor con múltiples parejas de electrodos, que proporciona una lectura de glucosa corregida con hematocrito del documento de Patente EP1742045.

Dado que es necesaria más y más información con respecto a los analitos presentes en las muestras biológicas para el diagnóstico, existe la necesidad creciente de monitorización de rutina para múltiples especies biológicas de importancia médica. Por lo tanto, existe una necesidad constante de biosensores mejorados, especialmente los que pueden proporcionar mediciones de concentración con un aumento de exactitud y/o precisión para múltiples analitos. Los sistemas, dispositivos, y procedimientos de la presente invención evitan o mejoran al menos una de las desventajas asociadas a los biosensores convencionales.

Sumario

Se desvela un procedimiento de medición de al menos un analito en una muestra que incluye oxidar o reducir química o bioquímicamente al menos un analito en una muestra; aplicar una primera señal de entrada a la muestra con un electrodo de trabajo y un primer contraelectrodo; aplicar una segunda señal de entrada con un potencial diferente que la primera señal de entrada a la muestra con el electrodo de trabajo y un segundo contraelectrodo; analizar las señales de salida de la primera y la segunda señales de entrada para determinar una concentración de una primera especie medible en la muestra con el potencial del primer contraelectrodo, y una concentración de una segunda especie medible en la muestra con el potencial del segundo contraelectrodo; y convertir al menos una de la primera y la segunda concentraciones de especie medible en la concentración de al menos un analito en la muestra. El procedimiento se define mediante las características de la reivindicación 1.

Otras características y ventajas de la invención serán, o se harán, evidentes para el experto en la materia después del examen de las siguientes figuras y descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

La invención se puede entender mejor por referencia a los siguientes dibujos y descripción. Los componentes en las figuras no son necesariamente a escala, prestándose atención en su lugar a la ilustración de los principios de la invención. Además, en las figuras, los numerales referenciados similares indican las partes correspondientes en todas las diferentes vistas.

La Figura 1A representa una disposición de sensor de ensayo no adecuada para el procedimiento de la presente invención, donde la muestra se introduce en la parte superior de un área primaria a través de un puerto de muestra y fluye de forma básicamente simétrica para llenar cuatro regiones de análisis secundarias.

La Figura 1B representa el sensor de ensayo de la Figura 1A con la adición de un electrodo de referencia.

La Figura 1C representa el sensor de ensayo de la Figura 1A con contraelectrodos separados, que se puede

usar para el procedimiento de la presente invención.

La Figura 1D representa el sensor de ensayo de la Figura 1C con la adición de un electrodo de referencia.

5 La Figura 2A representa una disposición de sensor de ensayo donde la introducción de la muestra se produce desde un puerto de muestra en un lado del sensor de ensayo al interior de un área primaria y a continuación fluye de forma asimétrica para llenar dos regiones de análisis secundarias.

La Figura 2B representa un sensor de ensayo que tiene la disposición de electrodo de la Figura 2A, pero con una disposición diferente de las regiones de análisis secundarias.

10 La Figura 3A representa un diseño de sensor de ensayo de canal recto donde la muestra fluye desde un área primaria a través de una primera ubicación de electrodo de potencial para alcanzar una segunda ubicación de electrodo de potencial.

Las Figuras 3B a 3G representan diseños alternativos para regiones de análisis secundarias donde la muestra no fluye a través de más de una ubicación de electrodo de potencial.

La Figura 4A muestra un voltamograma de un diseño de sensor de ensayo de canal recto, tal como se representa en la Figura 3A.

15 La Figura 4B muestra el voltamograma cíclico de un diseño de canal en Y, tal como se representa en la Figura 3E.

La Figura 5A muestra un gráfico de corriente de quimioamperimetría frente al tiempo que establece que para un sensor de ensayo de canal recto del tipo usado en la Figura 4A, se observó un pico de ferrocianuro en el electrodo de trabajo en aproximadamente 5 segundos de la introducción de la muestra.

20 La Figura 5B muestra un gráfico de corriente de quimioamperimetría frente al tiempo que establece que para un sensor de ensayo de canal en Y del tipo usado en la Figura 4B, básicamente ningún ferrocianuro alcanzó el electrodo de trabajo después de 30 segundos de la introducción de la muestra.

25 La Figura 5C es un gráfico de corriente de quimioamperimetría frente al tiempo que establece que el diseño de canal en Y proporciona un aislamiento químico superior entre las ubicaciones de electrodo de potencial que un diseño de canal en T.

La Figura 5D establece que tres diseños de canal en Y fueron resistentes a tal mezcla desde la perturbación mecánica.

30 La Figura 6A representa un sensor de ensayo no adecuado para el procedimiento de la presente invención, que tiene una disposición escalonada de las regiones de análisis secundarias donde la muestra entra por un puerto de muestra a un área primaria en la forma de un canal desde el que se ramifican dos regiones de análisis secundarias.

La Figura 6B representa una disposición de sensor de ensayo que se puede usar para el procedimiento de la presente invención, donde la muestra entra por el puerto de muestra a un área primaria en la forma de un canal desde el que se ramifican tres reacciones secundarias.

35 La Figura 7A y la Figura 7B representan sensores de ensayo de acuerdo con la presente invención, que tienen diseños escalonados de la región de análisis secundaria.

La Figura 8A representa una variación del sensor de ensayo de la Figura 7A que se puede usar para el procedimiento de la presente invención, donde están conectados eléctricamente múltiples electrodos de trabajo.

40 La Figura 8B representa una variación del sensor de ensayo de la Figura 7A no adecuada para el procedimiento de la presente invención, donde están conectados eléctricamente múltiples contraelectrodos.

La Figura 9A representa un mediador de transferencia de un electrón que transfiere un electrón.

La Figura 9B representa un mediador de transferencia de múltiples electrones que transfiere dos electrones.

45 La Figura 10A representa un sistema que tiene tres contraelectrodos direccionables independientemente, que operan cada uno con un potencial diferente, y tres electrodos de trabajo conectados eléctricamente, que tienen cada uno un sistema mediador que opera a un potencial diferente.

La Figura 10B muestra voltamogramas cíclicos de hexaamina de rutenio (III), ferrocianuro, y una molécula orgánica electroactiva.

La Figura 10C es un gráfico que relaciona el potencial de operación de contraelectrodo y la proporción del par conjugado redox.

La Figura 10D representa los sistemas de transferencia de carga de múltiples contraelectrodos direccionables independientemente.

La Figura 10E muestra voltamogramas cíclicos que establecen los diferentes potenciales de operación que se pueden proporcionar a uno o más electrodos de trabajo mediante múltiples contraelectrodos direccionables independientemente.

La Figura 11A establece que los sistemas de transferencia de carga de la Figura 10E se pueden reemplazar con múltiples proporciones de par conjugado redox para proporcionar múltiples potenciales al sistema.

La Figura 11B representa los perfiles de corriente obtenidos cuando el potencial en un electrodo de trabajo básicamente aislado químicamente se controla repetidamente en una secuencia por tres contraelectrodos básicamente aislados químicamente y direccionables independientemente, que tienen cada uno un potencial diferente proporcionado por sistemas de transferencia de carga diferentes.

La Figura 12A representa una representación esquemática de un sistema biosensor que determina la concentración de un analito en una muestra de un fluido biológico.

Las Figuras 12B a 12F representan las múltiples variaciones potencioestáticas que se pueden usar con el generador de señal de la Figura 12A, donde solo las figuras 12B a 12D muestran variaciones que se pueden usar con la presente invención.

La Figura 13 representa un análisis electroquímico para determinar la presencia y/o la concentración de al menos un analito en una muestra, de acuerdo con la presente invención.

La Figura 14A representa la señal de entrada de una secuencia de pulso amperimétrico con desconexión cíclica secuencial usada en combinación con un sensor de ensayo que tiene contraelectrodos y electrodos de trabajo direccionables independientemente.

La Figura 14B representa la señal de entrada de una secuencia de pulso amperimétrico con desconexión cíclica simultánea usada en combinación con un sensor de ensayo que tiene contraelectrodos y electrodos de trabajo direccionables independientemente.

La Figura 15 muestra los resultados de promediar los resultados de hasta cuatro análisis distintos para el mismo analito para determinar la concentración del analito en la muestra.

La Figura 16 representa el decaimiento de corriente obtenido a partir de un experimento del promedio de señal.

Descripción detallada

Se desvela un sistema biosensor que incluye sensores de ensayo que tienen al menos tres regiones de análisis direccionables independientemente. Cada región de análisis incluye un electrodo y está básicamente aislada químicamente. De ese modo, los electrodos de trabajo y los contraelectrodos de una pareja de electrodos pueden residir en ambientes básicamente aislados químicamente. Un electrodo de trabajo se combina con dos o más contraelectrodos, donde cada contraelectrodo reside en un ambiente básicamente aislado químicamente. De ese modo, el sistema incluye al menos dos contraelectrodos que operan con diferentes potenciales. La direccionabilidad independiente de las regiones de análisis básicamente aisladas químicamente proporciona un análisis electroquímico con múltiples potenciales.

Mediante la operación con más de un potencial, se analizan muestras que incluyen múltiples analitos. Se realizan múltiples análisis independientes del mismo analito para aumentar la exactitud y/o la precisión del análisis. Además de múltiples analitos y múltiples análisis, la configurabilidad del sistema permite el aumento de la exactitud y/o la precisión ya que se puede determinar la parte de la señal de salida atribuible a interferentes de muestra, hematocrito, fondo de mediador, temperatura, variabilidad de fabricación, desactivación de reactivo, y similares. Los interferentes del analito son especies químicas, electroquímicas, fisiológicas, o biológicas que dan como resultado una desviación positiva o negativa en la concentración del analito determinada. Una vez conocidos, estos efectos se pueden usar para alterar o se pueden retirar de la concentración de analito determinada. También se puede proporcionar información de calibración mediante regiones de análisis que no responden a un analito.

La Figura 1A representa una disposición de sensor de ensayo **100** donde la muestra se introduce en la parte superior de un área primaria **110** a través de un puerto de muestra **115** y fluye de forma básicamente simétrica para llenar cuatro regiones de análisis secundarias **150**. Cada una de las regiones de análisis secundarias **150** incluye un respiradero **120** para permitir que la muestra haga salir el aire de las regiones de análisis secundarias **150** durante el llenado. El respiradero **120** puede tener cualquier forma que sea compatible con la forma de las regiones de análisis secundarias **150**, tal como circular o poligonal. El diámetro o anchura máxima del respiradero **120** puede ser cualquier tamaño que proporcione el flujo de muestra deseado en las regiones de análisis secundarias **150**, siendo preferentes valores de aproximadamente 0,02 mm a aproximadamente 1,5 mm.

Un contraelectrodo individual **130** ocupa el área primaria, mientras que un electrodo de trabajo **141-144** está

- presente en cada región de análisis secundaria **150**. Aunque se representa con el contraelectrodo **130** en el área primaria **110** y los electrodos de trabajo **141-144** en las regiones de análisis secundarias **150**, la ubicación de los electrodos de trabajo y los contraelectrodos se podría invertir de modo que múltiples contraelectrodos rodeen un electrodo de trabajo individual (no se muestra). En otro aspecto, los electrodos pueden no ocupar el mismo plano.
- 5 Por ejemplo, algunos electrodos se pueden disponer horizontalmente mientras otros se disponen verticalmente. En otro ejemplo, algunos electrodos se pueden colocar más altos que otros de modo que el fluido biológico alcance los electrodos inferiores en primer lugar. Se pueden usar otras configuraciones de electrodos. Por ejemplo, la Figura 1B representa el sensor de ensayo de la Figura 1A con la adición de un electrodo de referencia **170** para proporcionar un potencial no variable.
- 10 La Figura 1C representa el sensor de ensayo **100** donde en lugar de un contraelectrodo individual **130**, se proporcionan cuatro contraelectrodos independientes **131-134** en el área primaria central **110**. Aunque se representa con los contraelectrodos en el área primaria y los electrodos de trabajo en las regiones de análisis secundarias, la ubicación de cualquier electrodo de trabajo y cualquier contraelectrodo se puede invertir (no se muestra). Se pueden usar otras configuraciones de los electrodos.
- 15 La Figura 1D representa el sensor de ensayo de la Figura 1C con la adición de un electrodo de referencia **170** en cada región de análisis secundaria para proporcionar un potencial no variable. Uno o más de los electrodos de referencia **170** pueden operar con uno o más potenciales para proporcionar un potencial no variable en cada análisis. Dado que el potencial de operación de los contraelectrodos puede variar, se pueden usar uno o más electrodos de referencia para establecer una referencia con el potencial en los contraelectrodos además de
- 20 establecer una referencia con el potencial de los electrodos de trabajo como es habitual en los sistemas convencionales.

Aunque no se muestra en la figura, para los sensores de ensayo implementados en aplicaciones de monitorización continua, tales como para electrodos implantados en un organismo vivo o en contacto continuo de otro modo con un fluido biológico, el uso de múltiples electrodos de referencia puede proporcionar un aumento de la exactitud y/o la

25 precisión de las concentraciones de analito determinadas. El aumento puede producirse debido a una reducción en los problemas asociados con el potencial cambiante de los electrodos de trabajo implantados en un organismo vivo o en contacto continuo de otro modo con un fluido biológico.

En la Figura 1A y en la Figura 1B, los conductores **160** conducen desde cada electrodo hacia la parte posterior del sensor de ensayo **100** donde cada uno de los conductores **160** puede estar conectado a un dispositivo de medición, permitiendo que cada electrodo de trabajo **141-144** se dirija independientemente. De ese modo, cuando el conductor **160** está conectado a un electrodo individual, el electrodo está direccionado independientemente. Los conductores **160** puede permanecer direccionables independientemente o dos cualesquiera o más pueden estar conectados eléctricamente (no se muestra). De ese modo, cuando más de un electrodo está conectado eléctricamente al mismo conductor, los electrodos no están direccionados independientemente ya que están

35 direccionados eléctricamente en conjunto. Por ejemplo, al conectar eléctricamente dos de los electrodos de trabajo **141-144**, tales como **141** y **144**, el sensor de ensayo resultante **100** tendría tres electrodos de trabajo direccionables independientemente y un contraelectrodo **130**.

Cuando se configura con un contraelectrodo individual **130** y cuatro electrodos de trabajo direccionables independientemente **141-144**, el sensor de ensayo **100** de la Figura 1A y la Figura 1B puede realizar potencialmente un análisis diferente en cada uno de los electrodos de trabajo **141-144**. El contraelectrodo individual **130** puede proporcionar un potencial individual al sistema mediante el uso de un sistema de transferencia de carga que opera con un potencial individual. Dependiendo del dispositivo de medición, el contraelectrodo individual **130** puede proporcionar más de un potencial al sistema.

Si se invierten los tipos de electrodo para el sensor de ensayo **100** de la Figura 1A y la Figura 1B de modo que haya cuatro contraelectrodos direccionables independientemente y un electrodo de trabajo individual, la electroquímica en el electrodo de trabajo se podría medir potencialmente con cuatro potenciales diferentes. La direccionabilidad independiente de los contraelectrodos permite que cada contraelectrodo se forme con un sistema de transferencia de carga diferente, alterando de ese modo el potencial proporcionado al electrodo de trabajo durante el análisis. Si el electrodo de trabajo incluye reactivos que interactúan con uno o más analitos con cuatro potenciales diferentes, cada interacción con el analito se puede medir independientemente mediante el direccionamiento eléctrico al contraelectrodo apropiado. Preferentemente, cada contraelectrodo direccionable independientemente opera con un potencial o un intervalo de potencial individual.

En las Figuras 1C y 1D, los conductores **160** conducen desde cada electrodo hacia la parte posterior del sensor de ensayo **100** donde cada uno de los conductores **160** puede estar conectado a un dispositivo de medición. Esta disposición permite que cada electrodo de trabajo **141-144** y cada contraelectrodo **131-134** estén direccionados independientemente. Los conductores **160** pueden permanecer aislados eléctricamente o dos cualesquiera o más pueden estar conectados eléctricamente (no se muestra). Por ejemplo, al conectar eléctricamente dos de los contraelectrodos, tales como **132** y **133**, el sensor de ensayo resultante tendría cuatro electrodos de trabajo direccionables independientemente y tres contraelectrodos direccionables independientemente. Se puede conectar eléctricamente cualquier combinación de electrodos.

Los electrodos de trabajo direccionables independientemente permiten potencialmente que se pueda medir una reacción química diferente en cada electrodo de trabajo **141-144**. Tener contraelectrodos direccionables independientemente **131-134** de diferentes potenciales de operación permite que un electrodo de trabajo se pueda operar frente a más de un potencial de contraelectrodo. De ese modo, se pueden medir independientemente dos químicas de transferencia de carga presentes en el mismo electrodo de trabajo mediante dos contraelectrodos direccionables independientemente donde el primer contraelectrodo opera con el potencial de la primera química de transferencia de carga y el segundo contraelectrodo opera con el potencial de la segunda química de transferencia de carga.

El sensor de ensayo **100** de la Figura 1C proporciona direccionabilidad independiente para cuatro electrodos de trabajo **141-144** y cuatro contraelectrodos **131-134**. Debido a que cada uno de los contraelectrodos **131-134** puede proporcionar un potencial diferente, se pueden realizar potencialmente dieciséis análisis diferentes. De ese modo, la electroquímica de un electrodo de trabajo individual se puede medir con cuatro potenciales diferentes y se puede aplicar el potencial de un contraelectrodo individual frente a cuatro químicas de electrodo de trabajo diferentes. El sensor de ensayo de la Figura 1D, que tiene cuatro electrodos de referencia direccionables independientemente **170**, puede proporcionar hasta cuatro potenciales no variables diferentes al sistema. El dispositivo de medición puede usar uno o más de los potenciales no variables para controlar o determinar el potencial de operación en los electrodos de trabajo **141-144** y en los contraelectrodos **131-134**.

Para el sensor de ensayo **100** de la Figura 1A a la Figura 1D, las regiones de análisis secundarias **150** pueden tener áreas de aproximadamente $0,5 \text{ mm}^2$ y alturas de aproximadamente $0,125 \text{ mm}$ para proporcionar volúmenes interiores de aproximadamente 62 nl cada una. Las regiones de análisis secundarias preferentes tienen volúmenes interiores de 100 nl e inferiores, siendo más preferentes volúmenes interiores de 70 nl e inferiores. Se pueden usar regiones de análisis secundarias más grandes y más pequeñas.

La Figura 2A representa una disposición de sensor de ensayo **200** donde la introducción de la muestra se produce desde un puerto de muestra **215** en un borde frontal **214** del sensor de ensayo **200** en un área primaria **210** y a continuación fluye de forma asimétrica para llenar una primera región de análisis secundaria **251** y una segunda región de análisis secundaria **252**. El flujo de muestra es asimétrico debido a que la segunda región de análisis secundaria **252** es más larga que la primera región de análisis secundaria **251**. Las regiones de análisis secundarias **251**, **252** pueden incluir un respiradero **220** para permitir que la muestra haga salir el aire de la región durante el llenado.

En la entrada, la muestra atraviesa una primera pareja de electrodos definida por el electrodo de trabajo **241** y el contraelectrodo **231**. Mientras continúa atravesando la primera pareja de electrodos, la muestra fluye hacia la segunda y la tercera parejas de electrodos, definidas por el electrodo de trabajo **242** y el contraelectrodo **232** (segunda pareja) y por el electrodo de trabajo **243** y el contraelectrodo **233** (tercera pareja). La muestra que fluye a través de las parejas de electrodos primera y tercera continúa fluyendo a continuación hasta atravesar la cuarta pareja de electrodos, definida por el electrodo de trabajo **244** y el contraelectrodo **234**. De ese modo, la muestra atraviesa la cuarta pareja de electrodos después de las parejas de electrodos primera y tercera. Cuando los atraviesa la muestra, una composición de reactivo **280** proporciona conductividad eléctrica entre las parejas de electrodo de trabajo y contraelectrodo. La direccionabilidad independiente de las parejas de electrodos permite que se monitoree el llenado de las regiones de análisis secundarias **251**, **252**. Se pueden usar otras configuraciones de los electrodos, por ejemplo se puede invertir la ubicación de cualquier electrodo de trabajo y cualquier contraelectrodo (no se muestra).

Mediante la monitorización del llenado de las regiones de análisis secundarias **251**, **252**, el sensor de ensayo **200** proporciona un sistema de detección de bajo nivel de llenado para evitar o descartar los análisis asociados con tamaños de muestra que tienen un volumen insuficiente. Debido a que los valores de concentración obtenidos a partir del sensor de ensayo con bajo nivel de llenado pueden ser inexactos, la capacidad de evitar o descartar estos análisis inexactos puede aumentar la exactitud de los valores de concentración obtenidos. Los sistemas de detección de bajo nivel de llenado convencionales tienen uno o más indicadores, tal como un electrodo conductor, que detectan el llenado parcial y/o completo del depósito de muestra en el sensor de ensayo. Al tener la capacidad de monitorizar el llenado entre múltiples regiones de análisis secundarias, son posibles determinaciones más exactas del estado de llenado del sensor de ensayo **200**. La señal eléctrica se puede usar para indicar si la muestra está presente y si la muestra llena parcial o completamente una región de análisis específica.

La Figura 2B representa el sensor de ensayo **200** que tiene la disposición de electrodos de la Figura 2A, pero con una disposición diferente de las regiones de análisis secundarias. Se proporciona un área primaria **210** que incluye la primera pareja de electrodos con las tres regiones de análisis secundarias hienas simétricamente **253**, **254**, **255**. En la entrada, la muestra atraviesa la primera pareja de electrodos y a continuación se mueve para atravesar independientemente de las parejas de electrodos segunda, tercera, y cuarta. Globalmente, el flujo de fluido permanece asimétrico debido a la primera pareja de electrodos que ocupa el área primaria, llenándose de ese modo antes que las regiones de análisis secundarias. Cada una de las regiones de análisis secundarias **253**, **254**, **255** puede incluir un respiradero **220** para permitir que la muestra haga salir el aire durante el llenado del sensor de ensayo **200**.

Una composición de reactivo individual **280** se puede extender entre cada una de las cuatro parejas de electrodo de trabajo y contraelectrodo como se muestra. Un conductor **260** que conduce desde cada electrodo hacia la parte posterior del sensor de ensayo **200** donde se puede conectar a un dispositivo de medición, permite que cada electrodo esté direccionado independientemente. Mientras cada electrodo está direccionado independientemente, cada pareja de electrodos comparte el mismo entorno químico debido a que la misma capa de reactivo entra en contacto tanto con el electrodo de trabajo como con el contraelectrodo de cada pareja. Los electrodos pueden permanecer aislados eléctricamente o dos cualesquiera o más pueden estar conectados eléctricamente (no se muestra). Se pueden añadir uno o más electrodos de referencia para proporcionar un potencial no variable (no se muestra).

Aunque se representa con los contraelectrodos agrupados centralmente y los electrodos de trabajo alrededor del perímetro, se puede invertir la ubicación de cualquier electrodo de trabajo y contraelectrodo. Los cuatro electrodos de trabajo independientes proporcionan cuatro composiciones de reactivo diferentes para realizar potencialmente cuatro análisis diferentes. Aunque los cuatro contraelectrodos independientes se pueden operar cada uno con un potencial diferente para proporcionar 16 análisis posibles, la separación de 90° entre cada pareja de electrodos puede hacer esto impracticable.

La Figura 3A representa un diseño de sensor de ensayo de canal recto donde la muestra fluye desde el área primaria **310** a través de una primera ubicación de electrodo de potencial **320** para alcanzar una segunda ubicación de electrodo de potencial **330**. Las Figuras 3B a 3G representan diseños alternativos del sensor de ensayo para regiones de análisis secundarias donde la muestra no fluye a través de más de una ubicación de electrodo de potencial. La Figura 3B representa un diseño de canal en T usado en algunos sensores convencionales. La Figura 3C representa un diseño de múltiples canales en T donde están presentes las ubicaciones de electrodo de potencial adicionales **340** y **350**. Se pueden añadir partes en "T" adicionales si se desean ubicaciones de electrodos de potencial adicionales.

La Figura 3H representa un sensor de ensayo con múltiples canales en T **300** que tiene tanto un electrodo de trabajo direccionable independientemente **331** como un contraelectrodo direccionable independientemente **332** en cada una de las cuatro regiones de análisis secundarias **333**. De ese modo, cada pareja de electrodo de trabajo y contraelectrodo comparte el mismo entorno químico, pero cada pareja de electrodos está básicamente aislada químicamente de cualquier otra pareja. Un sistema de transferencia de carga de composición de reactivo combinado **336** se deposita en cada pareja de electrodos. Cada uno de los electrodos de trabajo **331** y cada uno de los contraelectrodos **332** está formado a partir de un conductor **334** que termina en un contacto **335**. El contacto **335a** y el contacto **335b** corresponden al electrodo de trabajo y el contraelectrodo, respectivamente, de la región de análisis secundaria **333a**. La anchura de cada una de las regiones de análisis secundarias **333** es 1,2 mm, mientras que la anchura del área primaria **310** es 1,5 mm. La distancia en línea recta entre las parejas de electrodos opuestas a las regiones de análisis secundarias es 3,46 mm. Se especifica que la anchura del electrodo de trabajo de cada pareja es 0,50 mm separado del contraelectrodo por aproximadamente 0,05 mm a aproximadamente 0,25 mm. Los círculos dibujados en cada uno de los electrodos de trabajo **331** son el área de cobertura proyectada de la composición de reactivo. Se pueden usar otras anchuras de región de análisis secundaria, anchuras y separaciones de electrodo, y áreas de cobertura de composición de reactivo.

La Figura 3I representa un sensor de ensayo de múltiples canales en T **300** que tiene un electrodo de trabajo direccionable independientemente **331** en cada una de cuatro regiones de análisis secundarias básicamente aisladas químicamente y un contraelectrodo direccionable independientemente **332** en cada una de cuatro regiones de análisis secundarias opuestas **333**. De ese modo, cada electrodo está básicamente aislado químicamente de cualquier otro electrodo. Cada electrodo se forma a partir de un conductor **334** que termina en un contacto **335**.

La Figura 3D representa una desviación de los diseños de canal en T debido a que las regiones de análisis secundarias están escalonadas de modo que no se puede trazar una línea recta **370** que pase a través de las regiones de análisis secundarias y un área primaria entre dos ubicaciones de electrodo de potencial cualesquiera. La ventaja potencial de tal diseño escalonado es la resistencia a la mezcla entre las regiones de análisis secundarias opuestas si el sensor de ensayo se perturba mecánicamente mientras se llena con la muestra. Perturbar mecánicamente significa aplicar una fuerza suficiente al sensor de ensayo para hacer que la muestra fluida se mueva.

Además de no superar el ensayo de la línea recta, los diseños de canal en Y de las Figuras 3E a 3G resisten la mezcla entre ubicaciones de electrodo de potencial que están más próximas entre sí que para los diseños de las Figuras 3B a 3C debido a que la separación de las regiones de análisis secundarias no solamente depende de la distancia entre las ubicaciones de los electrodos de potencial para el aislamiento básico químico. La separación química en un canal en Y también se puede beneficiar de que la mezcla posee un flujo alrededor de la parte en "v" de la "Y" para mezclarse. Dado que los electrodos se pueden espaciar más próximos entre sí, pero todavía resisten la mezcla de la muestra, el volumen total del depósito de muestra de un diseño de canal en Y puede ser menor con respecto a un diseño de canal en T que tiene una separación química similar.

Los diseños de depósito de muestra preferentes tienen regiones de análisis secundarias que se ramifican desde el área primaria **310** con un ángulo **390** de menos de 90°, como se representa en la Figura 3F. De esta manera, el

fluido puede entrar en el sensor de ensayo y alcanzar las ubicaciones de electrodo de potencial sin realizar un giro de 90°. Esto puede permitir que la muestra entre rápidamente en el sensor de ensayo mientras se reduce el potencial de mezcla de reactivo por convección de la muestra debido a la vibración. Los diseños más preferentes carecen de la línea recta **370** como se representa en la Figura 3B y la Figura 3C entre electrodos que pasa a través de las regiones de análisis secundarias y un área primaria y tienen regiones de análisis secundarias que se ramifican desde el área primaria con un ángulo de menos de 90°. También se pueden usar otros diseños, tales como los que tienen una o más curvas en el área primaria y/o las regiones de análisis secundarias y aquellos donde las regiones de análisis secundarias se ramifican desde el área primaria con un ángulo mayor de 90°; sin embargo, el aumento de los requisitos de tamaño de muestra y la disminución de las velocidades de llenado de muestra pueden ser factores limitantes.

La Figura 3J representa un sensor de ensayo del canal en Y **300** que tiene tanto un electrodo de trabajo direccionable independientemente **331** como un contraelectrodo direccionable independientemente **332** en cada una de dos regiones de análisis secundarias **333**. De ese modo, cada pareja de electrodo de trabajo y contraelectrodo comparte el mismo entorno químico, pero cada pareja está básicamente aislada químicamente de la pareja opuesta. Mientras el electrodo de trabajo **331** atraviesa la segunda región de análisis **333**, el contraelectrodo **332** está definido por el borde del perímetro de la región de análisis secundaria **333**, que a su vez se forma a partir del conductor **334**. Las regiones de análisis secundarias **333** se ramifican desde el área primaria **310** con un ángulo de aproximadamente 45°. Cada uno de los conductores **334** termina en un área de contacto **335**. Se podrían usar otros diseños de electrodos, tales como aquellos en los que se forma un electrodo individual en una o más regiones de análisis secundarias. También se pueden usar otros ángulos de ramificación para las regiones de análisis secundarias.

El sustrato del sensor de ensayo **300** tiene una anchura de 11,8 mm y una longitud de 30 mm. La anchura del área primaria **310** es 1,2 mm. La distancia entre los bordes externos proyectados de las dos deposiciones de composición de reactivo es 0,8 mm. Las áreas de contacto **335** tienen cada una una anchura de 2,9 mm y el diámetro de la deposición de composición de reactivo en cada una de las dos regiones de análisis secundarias **333** es 1,8 mm. Se pueden usar otras dimensiones de sustrato, anchuras de área primaria y área de contacto, y diámetros de deposición de composición de reactivo.

Además del número y tipo de electrodos y del grado de direccionabilidad eléctrica independiente de los electrodos, el grado de aislamiento químico proporcionado por las regiones de análisis secundarias del depósito de muestra afecta al número de análisis que se pueden realizar con un sensor de ensayo. Básicamente aislado químicamente significa que la mezcla por difusión o convección de los reactivos básicamente no se produce entre las regiones de análisis secundarias durante el tiempo de uno o más análisis.

Si una pareja de electrodo de trabajo y contraelectrodo está básicamente aislada químicamente de otras parejas de electrodo de trabajo y contraelectrodo, pero no entre sí, la pareja puede realizar análisis compatibles con la química presente en la pareja. Tal configuración puede permitir una mezcla por difusión rápida de los reactivos presentes en el electrodo de trabajo y el contraelectrodo de la pareja. Por el contrario, si el electrodo de trabajo y el contraelectrodo están básicamente aislados químicamente de otros electrodos de trabajo y contraelectrodos y entre sí, cada electrodo puede participar potencialmente en un análisis con cualquier otro electrodo, si fuera direccionable independientemente. De ese modo, si está básicamente aislado químicamente, se pueden usar composiciones de reactivo diferentes para proporcionar un electrodo con un entorno de análisis químico que es diferente al de los otros electrodos. En combinación, el aislamiento básico químico entre las regiones de análisis permite que se usen diferentes reactivos en cada electrodo de trabajo y/o contraelectrodo, mientras que la direccionabilidad eléctrica independiente permite que cada electrodo de trabajo se mida independientemente.

Las regiones de análisis secundarias pueden estar básicamente aisladas químicamente dependiendo del área de sección transversal de las entradas a las regiones secundarias, las distancias entre dos electrodos cualesquiera dentro de las regiones de análisis secundarias, la disposición física de las regiones de análisis secundarias entre sí, y con respecto al área primaria, y similares. Además de estas consideraciones, el aislamiento básico químico se puede perder inicialmente debido a la mezcla de reactivos ya que la muestra fluye a través del contraelectrodo o contraelectrodos (Figura 1A a Figura 1D) o las parejas de electrodos en la entrada y en los lados del sensor de ensayo (Figura 2A y Figura 2B). De esta manera, la muestra puede transportar la composición de reactivo a múltiples parejas de electrodos. Por el contrario, tal mezcla de flujo se puede eliminar básicamente cuando la muestra no fluye a través de más de un electrodo (Figura 3B-Figura 3J).

La Figura 4A muestra el gráfico de voltimetría cíclica de un diseño de canal recto como se representa en la Figura 3A. La primera pareja de electrodos más cercana al puerto de muestra usó una composición de reactivo que incluyó ferrocianuro potásico 0,5 M, mientras que la segunda pareja de electrodos más cercana al término del canal usó una composición de reactivo que incluyó la molécula orgánica electroactiva representada posteriormente mediante la Estructura I. En aproximadamente siete segundos o menos, se observaron dos picos, representando el pico de la izquierda la oxidación del estado reducido de la molécula de Estructura I y representando el pico de la derecha la oxidación del ferrocianuro, que se había dispuesto inicialmente en la primera pareja de electrodos. En aproximadamente 20 ciclos completos, el pico de la molécula de Estructura I desapareció, lo que sugiere que el ferrocianuro oxidó la molécula de Estructura I.

Durante el análisis, se cree que el ferrocianuro de la primera pareja de electrodos se oxidó en el segundo electrodo para formar ferricianuro en la segunda pareja de electrodos. A continuación, el ferricianuro formando oxidó químicamente la especie reducida de la molécula de Estructura I en la segunda pareja de electrodos. Estos resultados establecieron que la combinación química entre las parejas de electrodos se produjo rápidamente en un diseño de canal recto. El experimento demuestra que el agente oxidante más fuerte, tal como el ferricianuro en este caso, asumirá la mediación de otros mediadores, tales como la molécula de Estructura I, si los electrodos no están básicamente aislados químicamente. Se cree que esta contaminación es atribuible a una combinación de la muestra que atraviesa el contraelectrodo antes de alcanzar el electrodo de trabajo, difusión, y convección en el depósito de canal recto.

Por el contrario, la Figura 4B muestra los voltamogramas cíclicos de un diseño de canal en Y como se representa en la Figura 3E. Se colocó un electrodo cerca del término de cada región de análisis secundaria. Se observa solo la oxidación de la molécula de Estructura I después de 20 ciclos completos (más de 20 minutos), lo que establece que se consiguió el aislamiento básico químico durante al menos 10 minutos con el diseño de región de análisis secundaria de canal en Y. Estos experimentos se realizaron usando una Estación de Trabajo Electroquímica de CH Instruments, modelo CHI 660A que trabajaba con una versión del software 2.05, a aproximadamente 22 °C y una humedad relativa de aproximadamente un 45 %. La muestra era tampón fosfato a pH 7,0 que contenía fosfato sódico 0,1 M y aproximadamente un 16 % (p/p) de polímero PVP que tenía un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 2000.

Se observó un efecto similar para el ensayo de quimioamperimetría, donde se mide la corriente en función del tiempo. En la Figura 5A un gráfico de corriente frente al tiempo estableció que para un sensor de canal recto del tipo usado en la Figura 4A, se observó un segundo pico con un potencial de operación de 400 mV en el electrodo de trabajo en aproximadamente 5 segundos de la introducción de la muestra. La introducción de la muestra generó el primer pico en el gráfico. El segundo pico correlaciona con la segunda onda voltimétrica de ferrocianuro en la Figura 4A. En la Figura 5B, se muestra que básicamente ninguna cantidad de ferrocianuro alcanzó el electrodo de trabajo después de 30 segundos, lo que establece que se consiguió el aislamiento básico químico con el sensor de ensayo de región de análisis secundaria de canal en Y. En estos experimentos, el pico pronunciado principal representó la primera muestra estableciendo comunicación eléctrica entre los electrodos. El ensayo de amperimetría se realizó usando la Estación de Trabajo Electroquímica de CH Instruments a aproximadamente 22 °C y una humedad relativa de aproximadamente un 45 %. La muestra era tampón fosfato a pH 7,0 que contenía fosfato sódico 0,1 M y aproximadamente un 16 % (p/p) de polímero PVP que tenía un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 2000.

La Figura 5C es un gráfico de corriente amperimétrica que establece que el diseño de canal en Y proporciona un aislamiento químico superior entre las ubicaciones de electrodo de potencial que un diseño de canal en T. Como se muestra mediante la línea de canal en Y **501**, se observó aislamiento básico químico en 1000 segundos entre las ubicaciones de electrodo de potencial, como se representa mediante las posiciones **320** y **330** de la Figura 3E. Por el contrario, como se muestra mediante los picos del canal en T **502**, **503** se observó un fallo de aislamiento químico y oxidación de la molécula de Estructura I después de aproximadamente 84 o después de aproximadamente 650 segundos para los dos sensores de ensayo de canal en T, tal como se representa en la Figura 3B. La gran variabilidad entre las variables de tiempo de 84 y 650 segundos se puede atribuir a la susceptibilidad del diseño de canal en T a la mezcla por convección debido a perturbación mecánica durante el análisis. La Figura 5D establece que los tres diseños de canal en Y fueron resistentes a tal mezcla debida a perturbación mecánica. El bajo aumento de corriente observado después de aproximadamente 800 segundos puede indicar una baja mezcla por difusión.

La Figura 6A representa un sensor de ensayo **600** que tiene una disposición escalonada de las regiones de análisis secundarias **651**, **652** donde la muestra entra por un puerto de muestra **615** en un área primaria **610** en forma de un canal desde el que se ramifican dos regiones de análisis secundarias **650**. Un conductor **690** se puede extender en el área primaria **610** para proporcionar capacidad de detección de bajo nivel de llenado en el sensor de ensayo **600**. De forma similar, la Figura 6B representa una disposición de sensor de ensayo donde la muestra entra por el puerto de muestra **615** en un área primaria **610** en forma de un canal desde el que se ramifican tres regiones secundarias **651-653**. Cada una de las regiones secundarias **651-653** incluye un electrodo o conductor direccionable independientemente.

En la Figura 6A, la muestra llena la primera región secundaria **651** de la derecha, y a continuación la segunda región secundaria **652** de la izquierda. En la Figura 6B, la muestra llena la tercera región secundaria **653** de la izquierda, a continuación la primera región secundaria **651** de la derecha, y a continuación la segunda región secundaria **652** de la izquierda.

El volumen de muestra total mantenido por el sensor de ensayo **600** que tiene al menos dos o tres regiones de análisis secundarias puede ser 210 nl o inferior. Cada una de las regiones de análisis secundarias y el final del área primaria **610** opuesto al puerto de muestra **615** pueden incluir un respiradero **620** que permita que la muestra haga salir el aire durante llenado. Mediante la división del depósito de muestra definido por el área primaria **610** y las regiones de análisis secundarias **651-653** en una o más áreas primarias que llenan múltiples regiones secundarias, el sensor de ensayo **600** se puede llenar más rápido que un depósito de muestra básicamente indiviso, tal como el diseño de canal recto representado en la Figura 3A, de un volumen igual o similar debido al efecto de acción capilar

impulsado por la tensión superficial. De ese modo, al subdividir el depósito de muestra en regiones de análisis secundarias más pequeñas, donde cada una puede contener un electrodo, una pareja de electrodos, uno o más conductores, o una combinación de los mismos, se puede aumentar la velocidad de llenado del sensor de ensayo **600**. Se puede proporcionar aislamiento básico químico entre las regiones secundarias durante el llenado y durante el análisis para llenar las regiones secundarias desde el área primaria de esta manera.

A medida que la muestra fluye principalmente al respiradero más cercano **620**, las regiones secundarias **651-653** se llenan de una forma básicamente secuencial desde el área primaria **610**. Debido al llenado secuencial de las regiones secundarias **651-653**, el dispositivo de medición puede monitorizar la velocidad y el flujo de la muestra a medida que se llenan las regiones de análisis secundarias **651-653**. El flujo de la muestra también se puede monitorizar equipando el sensor de ensayo **600** con un electrodo o conductor cerca del puerto de muestra **615** y/o cerca del respiradero **620** del área primaria **610**. De ese modo, el dispositivo de medición puede monitorizar uno o más conductores y/o electrodos para determinar las condiciones de llenado del sensor de ensayo **600**. También se puede monitorizar de esta manera el llenado de los diseños de llenado no secuenciales; sin embargo, el sistema puede ser o no ser capaz de monitorizar independientemente el llenado de cada región de análisis secundaria.

Aunque no se muestra en la figura, el área principal **610** se puede proporcionar con múltiples puertos **615** para permitir la muestra se introduzca desde más de una ubicación, tal como en un perímetro y una ubicación superior. De forma similar, el sensor de ensayo **600** se puede proporcionar con dos o más depósitos de muestra separados, que tienen cada uno un área primaria y dos o más regiones secundarias, para permitir que se analicen múltiples muestras. Al alterar la estructura del respiradero del depósito, se pueden introducir diferentes muestras a través de múltiples puertos de muestra en el mismo depósito, pero permanecen básicamente aisladas químicamente durante el análisis. Se pueden usar otras relaciones entre el área o áreas primarias y las regiones secundarias.

El área primaria **610** y/o una o más regiones secundarias **651-653** pueden incluir materiales que alteran el flujo que modifican el flujo de la muestra a medida que se distribuye a través del depósito de muestra. Por ejemplo, se pueden usar tratamientos, revestimientos, o materiales hidrofílicos y/o hidrofóbicos para dirigir preferentemente la ruta de flujo y/o la velocidad de llenado de muestras acuosas. En otro aspecto, el área primaria **610** y/o las regiones secundarias **651-653** pueden incluir características estructurales, tales como paredes, ranuras, o canales, que dirigen preferentemente la ruta de flujo y/o la velocidad de llenado de la muestra. En otro aspecto, se pueden colocar materiales que alteran químicamente o físicamente la composición de la muestra en el área primaria **610** y/o las regiones secundarias **651-653**. Por ejemplo, se puede colocar un material que filtra los glóbulos rojos de la muestra en una parte del área primaria para retirar las células antes de que la muestra alcance una región secundaria.

La Figura 7A y la Figura 7B representan sensores de ensayo **700** que tienen diseños escalonados de región de análisis secundaria como se ha discutido previamente. El diseño de la Figura 7A incluye ocho regiones de análisis secundarias con ángulos de aproximadamente 90° con el área primaria **710**, mientras que en la Figura 7B es un diseño de canal en Y similar. El sensor de ensayo **700** incluye un total de nueve regiones de análisis secundarias, incluyendo la región en el final del área primaria **710**, cada una ocupada por un electrodo o conductor. La figura representa cuatro contraelectrodos direccionables independientemente **731-734** y cuatro electrodos de trabajo **741-744**, cada uno presente en una de las ocho regiones secundarias. Aunque los contraelectrodos **731-734** residen en un lado del área primaria **710** y los electrodos de trabajo **741-744** residen en el otro lado, la disposición puede ser mixta. Por ejemplo, las dos primeras regiones de análisis secundarias llenadas con la muestra pueden ser electrodos de trabajo mientras que las dos segundas regiones de análisis secundarias llenadas con la muestra pueden ser contraelectrodos.

Un electrodo opcional, tal como un electrodo de referencia **770**, está presente en el final del área primaria **710** opuesto al puerto de muestra **715**. El electrodo de referencia **770** también se podría colocar en la región secundaria más posterior con respecto a donde se introduce la muestra o cerca del puerto de muestra **715**, por ejemplo. De ese modo, se pueden ubicar uno o más electrodos de referencia en el área primaria **710** y/o las regiones secundarias para proporcionar un potencial no variable al sistema. Al residir en un ambiente básicamente aislado químicamente de las regiones secundarias, los electrodos opcionales pueden proporcionar información de llenado o información acerca de la muestra.

Un conductor **790** conectado eléctricamente al contraelectrodo **731** se extiende al área primaria **710** cerca del puerto de muestra **715**. Aunque no direccionable independientemente, el conductor **790** puede proporcionar información de llenado al dispositivo de medición. Son posibles otras configuraciones de los electrodos y/o conductores. Cada región secundaria y el final de área primaria **710** pueden incluir un respiradero (no se muestra).

Los ocho electrodos **731-734** y **741-744** se pueden direccionar independientemente mediante el dispositivo de medición. Dado que las regiones secundarias están básicamente aisladas químicamente, cada una puede incluir una composición de reactivo que proporciona una química diferente para interactuar con los constituyentes de la muestra. Debido a que la composición de reactivo puede ser diferente para cada uno de los electrodos de trabajo **741-744**, el sistema de transferencia de carga puede ser diferente para cada uno de los contraelectrodos **731-734**, y cada electrodo se puede direccionar independientemente, pueden ser posibles cuatro análisis diferentes cuando está presente una composición de reactivo individual en cada uno de los electrodos de trabajo **741-744**. De esta manera, cada composición de reactivo de electrodo de trabajo se puede usar con un contraelectrodo dedicado. De

forma similar, si cada uno de los electrodos de trabajo **741-744** se proporciona con dos composiciones de reactivo que tienen diferentes potenciales redox, puede ser posible un total de ocho análisis diferentes. Finalmente, proporcionar cada electrodo de trabajo con cuatro composiciones de reactivo que tienen diferentes potenciales redox puede proporcionar hasta dieciséis análisis diferentes, ya que cada electrodo de trabajo se puede direccionar independientemente con cada uno de los cuatro contraelectrodos. Las consideraciones prácticas, tales como la interacción indeseada entre más de una composición de reactivo en un electrodo de trabajo, puede limitar el número real de análisis que se pueden realizar con el sistema. Se pueden usar otras construcciones de depósito de muestra y configuraciones de los electrodos.

La Figura 8A representa una variación del sensor de ensayo de la Figura 7A donde están conectados eléctricamente múltiples electrodos de trabajo **841-844**. Los contraelectrodos permanecen direccionables independientemente. De esta manera, cada contraelectrodo puede proporcionar un potencial diferente a los electrodos de trabajo conectados eléctricamente. Mediante la conexión eléctrica de uno o más de los electrodos de trabajo, se puede operar el electrodo de trabajo que tiene un potencial redox más cercano al del potencial del contraelectrodo seleccionado. En este modo de operación, cada electrodo de trabajo puede tener un sistema mediador diferente, teniendo cada sistema mediador un potencial redox diferente. Mediante la operación paso a paso del potencial de operación del sistema desde bajo a alto usando los diferentes potenciales de los contraelectrodos, se pueden direccionar progresivamente los diferentes sistemas mediadores de los electrodos de trabajo. Se pueden usar otras construcciones de depósito de muestra y configuraciones de los electrodos.

La Figura 8B representa una variación de la Figura 7A donde están conectados eléctricamente múltiples contraelectrodos **831-834**. Los electrodos de trabajo permanecen direccionables independientemente. Mediante la conexión eléctrica de uno o más de los contraelectrodos, el contraelectrodo que tiene un sistema de transferencia de carga con el potencial más elevado puede proporcionar el potencial al sistema. De esta manera, se puede medir la electroquímica que responde al analito en cada electrodo de trabajo. Se pueden usar otras construcciones de depósito de muestra y configuraciones de los electrodos.

Con respecto a los sensores de ensayo descritos previamente, los electrodos de trabajo y los contraelectrodos presentes en las regiones de análisis secundarias se pueden separar en 1000 micrómetros o más. También se pueden usar distancias de separación de electrodos menores de 1000 micrómetros. El patrón de los electrodos no se limita a los mostrados en las figuras, siendo compatible en su lugar cualquier patrón con el área primaria y las regiones de análisis secundarias del sensor de ensayo. Preferentemente, los electrodos se forman mediante una deposición rectangular de la composición de reactivo y/o un sistema de transferencia de carga. La deposición se puede realizar mediante impresión serigráfica, inyección de tinta, micropipeteo, deposición con aguja, u otros procedimientos.

Las capas de reactivo se forman cuando la composición de reactivo se aplica al conductor. Por ejemplo, la capa de reactivo que forma un electrodo de trabajo puede incluir una enzima, un mediador, y un aglutinante, mientras que la capa de reactivo que forma el contraelectrodo puede incluir un mediador y un aglutinante. Los análisis experimentan la reacción electroquímica en el electrodo de trabajo mientras que en el contraelectrodo se produce la reacción electroquímica opuesta para permitir el flujo de corriente entre los electrodos. Por ejemplo, si un analito experimenta una oxidación en el electrodo de trabajo, se produce la reducción en el contraelectrodo.

Además de los electrodos de trabajo y los contraelectrodos, los sensores de ensayo pueden incluir electrodos de referencia que proporcionan un potencial de referencia no variable al sistema. Aunque se conocen múltiples materiales de electrodo de referencia, es habitual una mezcla de plata (Ag) y cloruro de plata (AgCl) debido a la insolubilidad del metal y sus sales correspondientes en el entorno acuoso de la muestra. Dado que la proporción de Ag metálica con respecto al Cl⁻ no cambia significativamente en la muestra, el potencial del electrodo no cambia significativamente. Si se aumenta el tamaño y/o se modifica con un metal conductor, un electrodo de referencia también se puede usar como contraelectrodo debido a que pasará corriente. Sin embargo, un contraelectrodo no puede servir como electrodo de referencia debido a que carece de la capacidad de aislar la semicelda que proporciona el potencial de referencia de la solución de muestra.

Los conductores que forman los electrodos pueden residir en uno o más sustratos, dependiendo de la disposición de los electrodos. El sustrato se puede preparar a partir de cualquier material que sea compatible con la formación y la operación del biosensor. Los materiales preferentes para el sustrato incluyen tereftalato de polietileno (PET), policarbonato (PC), poliimida (PI), polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), cloruro de polivinilo (PVC), polioximetileno (POM), monómero fundido de nailon (MC), tereftalato de polibutileno (PBT), una resina polimetacrílica (PMMA), una resina ABS (ABS), y vidrio. Los materiales más preferentes a partir de los que se forman uno o más sustratos incluyen tereftalato de polietileno (PET), policarbonato (PC), y poliimida (PI), siendo preferente el tereftalato de polietileno (PET) en el presente. Para formar un sensor de ensayo, se pueden combinar dos sustratos en forma de una base y una tapa para formar un depósito de muestra que tiene al menos un puerto de muestra y al menos un respiradero. Entre los sustratos pueden residir conductores, espaciadores, y otros componentes.

El material o materiales usados para formar los conductores en uno o más sustratos pueden incluir cualquier conductor eléctrico. Los conductores eléctricos preferentes son no ionizantes, de modo que el material no

experimente una oxidación neta o una reducción neta durante el análisis de la muestra. Los conductores se pueden preparar a partir de materiales tales como metales sólidos, pastas de metal, carbono conductor, pastas de carbono conductoras, polímeros conductores, y similares. Los conductores incluyen preferentemente una capa delgada de una pasta de metal o metal, tal como oro, plata, platino, paladio, cobre, o tungsteno. Se puede depositar un conductor superficial en la totalidad o en una parte del conductor. El material conductor superficial incluye preferentemente carbono, oro, platino, paladio, o las combinaciones de los mismos. Si no está presente un conductor superficial en un conductor, el conductor se prepara preferentemente a partir de un material no ionizante.

El conductor y el material conductor superficial opcional se pueden depositar en el sustrato mediante cualquier medio compatible con la operación del sensor de ensayo, incluyendo deposición de lámina, deposición de vapor químico, deposición de suspensión, metalización, y similares. En otro aspecto, los conductores se pueden formar mediante el procesamiento de una capa conductora en un patrón usando técnicas de láser y/o máscara.

La composición o composiciones de reactivo usadas para formar los electrodos se pueden depositar en forma sólida, semisólida, líquida, de gel, gelular, coloidal, u otra forma, y pueden incluir reactivos y opcionalmente un aglutinante. Las composiciones de reactivo pueden tener viscosidades que varían de aproximadamente 1 cp a aproximadamente 100 cp. Las composiciones de reactivo más preferentes tienen viscosidades que varían de aproximadamente 1 cp a aproximadamente 20 cp o de aproximadamente 4 cp a aproximadamente 10 cp. Se pueden usar composiciones de reactivo con otras viscosidades. Las viscosidades se determinaron con un viscosímetro Brookfield Modelo DV3 equipado con un montaje ULA para la medición de las composiciones de reactivo que tienen viscosidades inferiores a 300 cp. Las mediciones de viscosidad se realizaron a temperatura ambiente con la temperatura del instrumento ajustada a 25 °C. Las mediciones se realizaron con tasas de cizalladura de 50, 100, 200 y 300 cps (ciclos por segundo) para proporcionar una indicación de si la composición se considera poco espesa o espesa. Se usó una solución tampón fosfato 100 mM como control, que por lo general proporciona lecturas de viscosidad en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 1,3 cp con diferentes tasas de cizalladura.

El aglutinante es preferentemente un material polimérico que es al menos parcialmente soluble en agua. El aglutinante puede formar un gel o un material de tipo gel cuando se hidrata. Algunos materiales poliméricos parcialmente solubles en agua adecuados para su uso como aglutinante pueden incluir óxido de polietileno (PEO), carboximetil celulosa (CMC), alcohol polivinílico (PVA), hidroxietilén celulosa (HEC), hidroxipropil celulosa (HPC), metil celulosa, etil celulosa, etil hidroxietil celulosa, carboximetil etil celulosa, polivinilpirrolidona (PVP), poliaminoácidos, tales como polilisina, sulfonato de poliestireno, gelatina y derivados de la misma, ácido poliacrílico y derivados y sales del mismo, ácido polimetacrílico y derivados y sales del mismo, almidón y derivados del mismo, anhídrido maleico y sales del mismo, geles basados en agarosa y derivados de los mismos. El aglutinante puede incluir uno o más de estos materiales en combinación. Entre los materiales aglutinantes anteriores, son preferentes PEO, PVA, CMC, y HEC, siendo CMC más preferente en el presente para biosensores. Se pueden usar otros aglutinantes.

Son preferentes los aglutinantes que tienen pesos moleculares de 10.000 a 900.000, y preferentemente de 30.000 a 300.000 (promedio en peso). Se pueden usar aglutinantes que tengan otros pesos moleculares. Los pesos moleculares se pueden determinar mediante cromatografía por exclusión de tamaño (SEC), y se expresan generalmente como promedios en peso o promedios en número.

La composición de reactivo usada para formar el electrodo de trabajo incluye preferentemente una biomolécula que responde al analito de interés. Las biomoléculas pueden incluir sistemas enzimáticos activos, tales como oxidorreductasas. Las biomoléculas también pueden incluir biopolímeros, tales como ácidos nucleicos, proteínas, y péptidos. Se pueden usar otras biomoléculas.

Las oxidorreductasas catalizan la transferencia de electrones y facilitan la oxidación o la reducción del analito e incluyen "oxidasas", que facilitan las reacciones de oxidación donde el oxígeno molecular es el aceptor de electrones; "reductasas", que facilitan las reacciones de reducción donde el analito se reduce y el oxígeno molecular no es el analito; y "deshidrogenasas", que facilitan las reacciones de oxidación en las que el oxígeno molecular no es el aceptor de electrones. Véase, por ejemplo, Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, edición revisada, A.D. Smith, Ed., Nueva York: Oxford University Press (1997) Pág. 161, 476, 477, y 560. Por ejemplo, la siguiente Tabla I, proporciona oxidorreductasas útiles en el análisis de los analitos enumerados.

Tabla I

| Oxidorreductasa | Analito |
|---|---------------|
| Glucosa deshidrogenasa | β-glucosa |
| Glucosa oxidasa | β-glucosa |
| Colesterol esterasa; colesterol oxidasa | Colesterol |
| Lipoproteína lipasa; glicerol quinasa; glicerol-3-fosfato oxidasa | Triglicéridos |
| Lactato oxidasa; lactato deshidrogenasa; | Lactato |

(continuación)

| Oxidorreductasa | Analito |
|-------------------------------------|---------------------|
| diaforasa | |
| Piruvato oxidasa | Piruvato |
| Alcohol oxidasa | Alcohol |
| Bilirrubina oxidasa | Bilirrubina |
| Uricasa | Ácido úrico |
| Glutatión reductasa | NAD(P)H |
| Monóxido de carbono oxidorreductasa | Monóxido de carbono |

Las biomoléculas pueden incluir grupos funcionales amina capaces de interacciones por enlace de hidrógeno. Las biomoléculas que tienen pesos moleculares promedio en peso de 10.000 a 500.000 y preferentemente de 100.000 a 400.000 que mantienen actividad biológica después de deposición son preferentes. En el caso de las oxidorreductasas, se pueden usar de 0,01 a 100 Unidades (U), preferentemente de 0,05 a 10 U, y más preferentemente de 0,1 a 5 U por sensor de ensayo o análisis. En otro aspecto, se usan al menos 1,3 U de la oxidorreductasa.

La capa de reactivo formada a partir de la deposición de la composición de reactivo en el conductor puede incluir un sistema enzimático específico para el analito que puede facilitar la reacción del analito mientras se mejora la especificidad del sistema sensor con respecto al analito, especialmente en muestras biológicas complejas. El sistema enzimático puede incluir una o más enzimas, cofactores, y/o otros restos que participen en la reacción redox con el analito. Por ejemplo, se puede usar una alcohol oxidasa para proporcionar un biosensor que sea sensible a la presencia de alcohol en una muestra. Tal sistema podría ser útil en la medición de concentraciones de alcohol en sangre. En otro ejemplo, se puede usar glucosa deshidrogenasa o glucosa oxidasa para proporcionar un biosensor que sea sensible a la presencia de glucosa en una muestra. Este sistema podría ser útil en la medición de concentraciones de glucosa en sangre, por ejemplo en pacientes que se conoce o se sospecha que tienen diabetes.

Los sistemas enzimáticos preferentes son independientes de oxígeno, y de ese modo no se oxidan básicamente por el oxígeno. Una de tales familias de enzimas independientes de oxígeno es glucosa deshidrogenasa (GDH). Mediante el uso de diferentes coenzimas o cofactores, GDH puede estar mediada de diferente manera mediante diferentes mediadores. Dependiendo de su asociación con GDH, un cofactor, tal como flavina adenina dinucleótido (FAD), se puede soportar firmemente por la enzima hospedadora, tal como en el caso de FAD-GDH; o un cofactor, tal como pirroloquinolinaquinona (PQQ), se puede unir covalentemente a la enzima hospedadora, tal como con PQQ-GDH. El cofactor de cada uno de estos sistemas enzimáticos se puede soportar permanentemente por la enzima hospedadora o la coenzima y la apoenzima se pueden reconstituir antes de que el sistema enzimático se añada a la composición de reactivo. La coenzima también se puede añadir independientemente al resto de enzima hospedadora en la composición de reactivo para ayudar a la función catalítica de la enzima hospedadora, tal como en los casos de nicotinamida adenina dinucleótido NAD/NADH⁺ o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato NADP/NADPH⁺. Otros sistemas de enzima deshidrogenasa útiles incluyen alcohol deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, β-hidroxi butirato deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa, formaldehído deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, y 3-hidroxiesteroide deshidrogenasa.

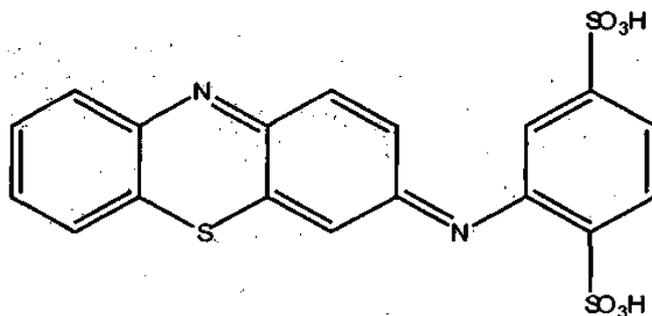
La capa de reactivo también puede incluir un mediador para comunicar los resultados de la reacción del analito al conductor. Los mediadores se pueden oxidar o reducir y pueden transferir uno o más electrones. Un mediador es un reactivo en un análisis electroquímico y no es el analito de interés, pero proporciona la medida indirecta del analito. En un sistema sencillo, el mediador experimenta una reacción redox en respuesta a la oxidación o la reducción del analito. El mediador oxidado o reducido experimenta a continuación la reacción opuesta en el electrodo de trabajo del sensor de ensayo y se puede regenerar a su número de oxidación original. De ese modo, el mediador puede facilitar la transferencia de electrones desde el analito al electrodo de trabajo.

Los mediadores se pueden separar en dos grupos basados en su actividad electroquímica. Los mediadores de transferencia de un electrón son restos químicos capaces de aceptar un electrón adicional durante las condiciones de la reacción electroquímica. Los mediadores de transferencia de múltiples electrones son restos químicos capaces de aceptar más de un electrón durante las condiciones de la reacción. Como se representa en la Figura 9A, los mediadores de transferencia de un electrón puede transferir un electrón desde la enzima al electrodo de trabajo, mientras que como se representa en la Figura 9B, un mediador de transferencia de múltiples electrones puede transferir dos electrones.

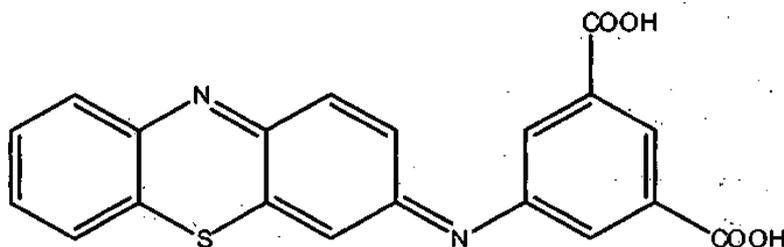
Algunos ejemplos de mediadores de transferencia de un electrón incluyen compuestos tales como 1,1'-dimetil ferroceno, ferrocianuro y ferricianuro, y hexaamina de rutenio (III) y rutenio (II). Los mediadores de dos electrones incluyen en las quinonas e hidroquinonas orgánicas, tales como fenantrolina quinona; derivados de fenotiazina y

fenoxazina; 3-(fenilamino)-3H-fenoxazinas; fenotiazinas; y 7-hidroxi-9,9-dimetil-9H-acridin-2-ona y sus derivados. Algunos ejemplos de mediadores de dos electrones adicionales incluyen las moléculas orgánicas electroactivas que se describen en los documentos de Patente de Estados Unidos con números 5.393.615; 5.498.542; y 5.520.786, por ejemplo.

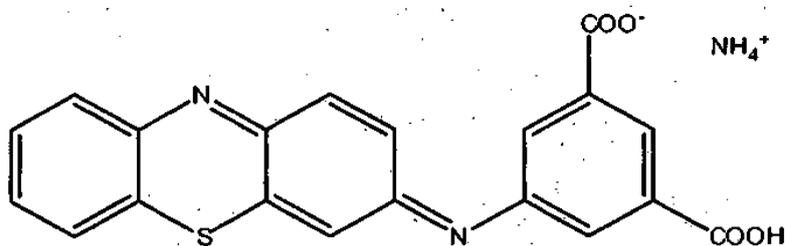
- 5 Los mediadores de transferencia de dos electrones preferentes incluyen 3-fenilimino-3H-fenotiazinas (PIPT) y 3-fenilimino-3H-fenoxazinas (PIPO). Los mediadores de dos electrones más preferentes incluyen el ácido carboxílico o una sal, tal como sales de amonio, de derivados de fenotiazina. En el presente, los mediadores de dos electrones especialmente preferentes incluyen ácido (E)-2-(3H-fenotiazina-3-ilidenamino)benzeno-1,4-disulfónico (Estructura I), ácido (E)-5-(3H-fenotiazina-3-ilidenamino)isoftálico (Estructura II), (E)-3-(3H-fenotiazina-3-ilidenamino)-5-carboxibenzoato de amonio (Estructura III), y las combinaciones de los mismos. Las fórmulas estructurales de estos mediadores se presentan a continuación. Aunque solo se muestra la forma de diácido de la Estructura I, se incluyen las sales de mono y dimetal alcalino del ácido. En el presente, la sal de sodio del ácido es preferente para el mediador de Estructura I. También se pueden usar las sales de metales alcalinos de la Estructura II.



Estructura I



Estructura II



Estructura III

- 15 En otro respecto, los mediadores de dos electrones preferentes tienen un potencial redox que es al menos 100 mV inferior, más preferentemente al menos 150 mV inferior, que el ferricianuro.

El sistema de transferencia de carga es uno cualquiera o una combinación de especies electroquímicamente activas que pueden transferir uno o más electrones desde o a un contraelectrodo. Por ejemplo, si el electrodo de trabajo de un sistema transfiere electrones a un contraelectrodo a través del dispositivo de medición, el sistema de

transferencia de carga del contraelectrodo acepta electrones del contraelectrodo para permitir la medición del flujo de corriente a través del sistema. Al aceptar electrones con un potencial o intervalo de potencial específico, el sistema de transferencia de carga influye en el potencial con el que el electrodo de trabajo puede transferir electrones para la medición. El sistema de transferencia de carga puede incluir o no incluir el mediador presente en el electrodo de trabajo; pero si lo hace, al menos una parte del mediador en el contraelectrodo tiene preferentemente un estado de oxidación diferente que el mediador en el electrodo de trabajo.

Debido a que se producirá en primer lugar la reacción electroquímica con el menor potencial, al proporcionar los electrodos de trabajo con una o más biomoléculas que responden a un analito, tal como una oxidorreductasa, y/o mediadores que transportan carga en potenciales crecientes, se puede analizar secuencialmente la electroquímica de múltiples electrodos de trabajo desde el potencial de operación más bajo al más alto. Si los electrodos de trabajo y los contraelectrodos se pueden direccionar independientemente, un electrodo de trabajo que tiene un potencial redox específico para un analito se puede emparejar selectivamente con un contraelectrodo que tiene el potencial deseado. Si los potenciales redox del analito, la biomolécula que responde al analito, y/o el mediador de los electrodos de trabajo direccionables independientemente son diferentes, se pueden medir señales de salida distintas para análisis individuales cuando se usan contraelectrodos conectados eléctricamente. Por el contrario, si los potenciales redox de las especies de transferencia de carga de los contraelectrodos direccionables independientemente son diferentes, se pueden medir señales de salida distintas para análisis individuales cuando se usan electrodos de trabajo conectados eléctricamente. Cuando múltiples contraelectrodos tienen diferentes especies de transferencia de carga pero están conectados eléctricamente, el contraelectrodo que tiene el potencial más alto proporcionará el potencial de operación al electrodo de trabajo hasta que el potencial del sistema caiga al del

La Figura 10A representa un sistema que tiene tres contraelectrodos direccionables independientemente (CE_1 - CE_3), que operan cada uno con un potencial diferente, y tres electrodos de trabajo conectados eléctricamente, que tienen cada uno un sistema mediador que opera con un potencial diferente. A medida que el potencial de operación del sistema aumenta en los contraelectrodos CE_1 a CE_3 , las características redox de los mediadores (Med_1 - Med_3) en los electrodos de trabajo conectados eléctricamente se pueden medir independientemente. Por ejemplo, cuando CE_1 se acopla con el electrodo de trabajo, Med_1 reacciona en el electrodo. Cuando CE_2 se acopla con el electrodo de trabajo, Med_1 y Med_2 reaccionan en el electrodo. Finalmente, cuando CE_3 se acopla con el electrodo de trabajo, los tres sistemas mediadores pueden reaccionar en el electrodo de trabajo.

Se pueden proporcionar múltiples potenciales de operación al sistema alterando el sistema de transferencia de carga depositado en los diferentes conductores que forman los contraelectrodos. El potencial proporcionado por un contraelectrodo específico se puede alterar con sistemas de transferencia de carga que incluyen diferentes especies redox (restos que se pueden oxidar y/o reducir) y/o diferentes proporciones de pares conjugados redox (restos reducidos y oxidados de la misma especie redox) de una especie redox, tal como ferrocianuro/ferricianuro. Algunos ejemplos de especies redox diferentes para su uso en sistemas de transferencia de carga que incluyen especies redox solubles o insolubles, donde las especies redox solubles son solubles en agua (pH 7, 25 °C) a un nivel de al menos 1,0 gramos por litro y excluyen metales elementales o iones metálicos solos que son insolubles o moderadamente solubles en agua. Las especies redox útiles incluyen moléculas orgánicas electroactivas, complejos metálicos de organotransición, y complejos de coordinación de metales de transición. A diferencia de los complejos metálicos de organotransición y los complejos de coordinación, las moléculas orgánicas electroactivas carecen de un metal capaz de experimentar oxidación o reducción. Las especies redox preferentes para su uso en sistemas de transferencia de carga incluyen hexaamina de rutenio (III), ferricianuro, y moléculas orgánicas electroactivas, tales como PIPT y PIPO. La Figura 10B muestra voltamogramas cíclicos de hexaamina de rutenio (III), ferricianuro, y las moléculas orgánicas electroactivas representadas anteriormente en la Estructura I/II/III. Como se observa en el gráfico, las posiciones de potencial relativo de cada especie redox están separadas por aproximadamente 200 mV.

Algunos ejemplos de diferentes proporciones de pares conjugados redox son la proporción de ferrocianuro con respecto a ferricianuro en el sistema de transferencia de carga. Por ejemplo, se puede usar una proporción de 9,5:0,5 para el contraelectrodo de potencial más bajo, mientras que se pueden usar proporciones de 8:2, 5:5, 2:8, y 0,5:9,5 para proporcionar contraelectrodos que tienen potenciales de operación progresivamente crecientes. Se puede usar ferricianuro puro para proporcionar un contraelectrodo que tiene el potencial de operación más alto para los seis contraelectrodos. De esta manera, se pueden formar seis contraelectrodos direccionables independientemente usando diferentes proporciones de pares conjugados redox, proporcionando cada uno un potencial diferente al sistema. De ese modo, se pueden obtener diferencias de potencial menores que las obtenibles con especies redox diferentes, tales como al menos 50 mV, o al menos 100 mV, usando diferentes proporciones de los pares conjugados de una especie redox.

La relación del potencial de operación del contraelectrodo frente a la proporción del par conjugado redox está caracterizada por la ecuación de Nernst y se muestra en la Figura 10C. Dependiendo de si se produce oxidación o reducción en el contraelectrodo durante el análisis, se puede proporcionar el potencial deseado al contraelectrodo seleccionando la proporción del par conjugado redox apropiada para el sistema de transferencia de carga depositado. Mediante la selección de diferentes proporciones de los pares conjugados redox para los sistemas de transferencia de carga, el potencial del sistema de transferencia de carga puede variar en aproximadamente 6150 mV para diferentes proporciones de ferrocianuro/ferricianuro. De ese modo, además del uso de diferentes especies redox para proporcionar diferentes potenciales de operación a múltiples contraelectrodos, se pueden usar

diferentes proporciones de los conjugados de las especies redox. El aislamiento básico químico, que se puede proporcionar mediante la separación física entre las regiones secundarias, permite que los diferentes sistemas de transferencia de carga de cada contraelectrodo proporcionen diferentes potenciales de operación al sistema durante el análisis.

5 La Figura 10D representa la circunstancia en la que los sistemas de transferencia de carga de múltiples contraelectrodos direccionables independientemente (CE_1 - CE_3) proporcionan diferentes potenciales de operación absolutos, tales como -200 mV, 0 mV, y +200 mV, mientras se mantiene básicamente el mismo potencial de operación relativo de 0,4 V entre los contraelectrodos y los electrodos de trabajo. La pareja redox central se puede asignar arbitrariamente a un potencial fijo de cero frente a un Electrodo de Hidrógeno Convencional, un Electrodo de Calomelanos Saturado, o similares. De ese modo, la hexaamina de rutenio tiene un potencial redox que es aproximadamente 200 mV menor y el ferricianuro tiene un potencial redox que es aproximadamente 200 mV mayor que el de la molécula de Estructura I/II/III. Mediante la operación de los contraelectrodos con diferentes potenciales de operación absolutos con respecto a un potencial conocido, el sistema puede analizar independientemente los diferentes sistemas mediadores (Med_1 - Med_3) en los electrodos de trabajo conectados eléctricamente WE_1 a WE_3 .

15 La Figura 10E muestra voltamogramas cíclicos que establecen los diferentes potenciales de operación que se pueden proporcionar a uno o más electrodos de trabajo por parte de múltiples contraelectrodos direccionables independientemente. Se fabricó un sensor de ensayo que tiene un diseño múltiple en T con ocho regiones de análisis secundarias, tal como se ha representado previamente en la Figura 3I. Se proporcionaron cuatro de las regiones de análisis secundarias con electrodos de trabajo direccionables independientemente y se proporcionaron cuatro de las regiones de análisis secundarias con contraelectrodos direccionables independientemente. Cada electrodo de trabajo se formó con una composición de reactivo que incluía un 0,5 % peso/peso (p/p) de aglutinante HEC, la molécula de Estructura I 50 mM, y 2 U/ml del sistema enzimático PQQ-GDH en un tampón fosfato a pH 7. El primer contraelectrodo se formó con un sistema de transferencia de carga que incluía un 0,5 % (p/p) de aglutinante HEC y hexaamina de rutenio 100 mM en tampón fosfato a pH 7. El segundo contraelectrodo se formó con un sistema de transferencia de carga que incluía un 0,5 % (p/p) de aglutinante HEC y la molécula de Estructura I 100 mM en tampón fosfato a pH 7. El tercer y el cuarto contraelectrodos se formaron con un sistema de transferencia de carga que incluía un 0,5 % (p/p) de aglutinante HEC y ferricianuro 100 mM en tampón fosfato a pH 7.

Después de la introducción de una muestra que incluía 300 mg/dl de glucosa, el Instrumento CH realizó un barrido con una velocidad de 25 mV/s para uno de los electrodos de trabajo y cada uno del primero, el segundo, y el tercero contraelectrodos. Como se muestra en la Figura 10B, el potencial del contraelectrodo de hexaamina de rutenio, línea **1010**, presenta un pico a un potencial aproximadamente 400 mV mayor que el ferricianuro, línea **1030**, presentando un pico la molécula de Estructural I aproximadamente en el punto medio, línea **1020**. De esta manera, los resultados observados para los voltamogramas cíclicos de la Figura 10 B se reprodujeron en un diseño de sensor de ensayo múltiple en T que tiene múltiples regiones de análisis secundarias. De ese modo, se demostró la capacidad del sensor de ensayo para operar con múltiples potenciales usando múltiples contraelectrodos con diferentes sistemas de transferencia de carga.

La Figura 11A establece que los sistemas de transferencia de carga de la Figura 10E se pueden reemplazar con múltiples proporciones del par conjugado redox para proporcionar múltiples potenciales al sistema. Se preparó un sensor de ensayo como en la Figura 10E, pero el primer contraelectrodo se formó con un sistema de transferencia de carga que incluía un 0,5 % (p/p) de aglutinante HEC y una proporción 1:9 de ferricianuro: ferrocianuro 200 mM en tampón fosfato a pH 7, el segundo contraelectrodo se formó con un sistema de transferencia de carga que incluía un 0,5 % (p/p) de aglutinante HEC y una proporción 1:1 de ferricianuro:ferrocianuro 200 mM en tampón fosfato a pH 7, el tercer contraelectrodo se formó con un sistema de transferencia de carga que incluía un 0,5 % (p/p) de aglutinante HEC y una proporción 9:1 de ferricianuro:ferrocianuro 200 mM en tampón fosfato a pH 7, y el cuarto contraelectrodo se formó con un sistema de transferencia de carga que incluía un 0,5 % (p/p) de aglutinante HEC y ferricianuro básicamente puro 200 mM en tampón fosfato a pH 7.

Después de la introducción de una muestra que incluía 300 mg/dl de glucosa, el instrumento realizó un barrido con la velocidad de 25 mV/s para uno de los electrodos de trabajo y cada uno del primero, el segundo, el tercero, y el cuarto contraelectrodos. La Figura 11A mostró que el primer contraelectrodo tenía un potencial de pico de aproximadamente 0,149 V ($W1-C1$), el segundo contraelectrodo tenía un potencial de pico de aproximadamente 0,060 V ($W2-C2$), el tercer contraelectrodo tenía un potencial de pico de aproximadamente -0,007 V ($W3-C3$), y el cuarto contraelectrodo tenía un potencial de pico de aproximadamente -0,047 V ($W4-C4$). De ese modo, se demostró la capacidad del sensor de ensayo para operar con múltiples potenciales que usan múltiples contraelectrodos con sistemas de transferencia de carga que dependen de diferentes proporciones de un par conjugado redox.

La Figura 11B representa los perfiles de corriente obtenidos cuando el potencial en un electrodo de trabajo básicamente aislado químicamente se controla repetidamente en secuencia mediante tres contraelectrodos básicamente aislados químicamente y direccionables independientemente, que tienen cada uno un potencial diferente proporcionado por sistemas de transferencia de carga diferentes. Se preparó un sensor de ensayo como en la Figura 10E, pero los electrodos de trabajo múltiples se reemplazaron con un electrodo de trabajo individual. Se obtuvo un primer pico **1110** en cada una de las seis series de tres picos a partir del primer contraelectrodo, se obtuvo un segundo pico **1120** en cada una de las seis series de tres picos a partir del segundo contraelectrodo, y se obtuvo

un tercer pico **1130** en cada una de las seis series de tres picos a partir del tercer contraelectrodo. Los primeros picos **1110** demostraron el nivel de corriente obtenido mediante el uso de hexaamina de rutenio como sistema de transferencia de carga en el primer contraelectrodo. Los segundos picos **1120** demostraron el nivel de corriente obtenido mediante el uso de la molécula de Estructura I como sistema de transferencia de carga en el segundo contraelectrodo. Los terceros picos **1130** demostraron en nivel de corriente obtenido mediante el uso de ferricianuro como sistema de transferencia de carga en el tercer contraelectrodo. De esta manera, para el mismo potencial, diferentes potenciales de contraelectrodo direccionarán diferentes puntos de oxidación de la misma onda de oxidación. De ese modo, además de demostrar la capacidad de que múltiples contraelectrodos controlan el potencial de operación en el electrodo de trabajo, se estableció la capacidad del sistema para realizar tres análisis distintos en el electrodo de trabajo con una señal de entrada con desconexión cíclica.

La Figura 12A representa una representación esquemática de un sistema biosensor **1200** que determina una concentración de analito en una muestra de un fluido biológico usando una señal de entrada. El sistema biosensor **1200** incluye un dispositivo de medición **1202** y un sensor de ensayo **1204**, que se puede implementar en un instrumento analítico, incluyendo un dispositivo de sobremesa, un dispositivo portátil o de mano, o similar. El sistema biosensor **1200** se puede utilizar para determinar concentraciones de analito, incluyendo las de glucosa, ácido úrico, lactato, colesterol, bilirrubina, y similares.

Aunque se muestra una configuración particular, el sistema biosensor **1200** puede tener otras configuraciones, incluyendo las que tienen componentes adicionales. Por ejemplo, el sensor de ensayo **1204** se puede adaptar para uso externo, interno, o parcialmente interno con respecto a un organismo vivo. Cuando se usa de forma externa a un organismo vivo, se introduce una muestra del fluido biológico en un depósito de muestra en el sensor de ensayo **1204**. El sensor de ensayo **1204** se puede colocar en el dispositivo de medición antes, después, o durante la introducción de la muestra para el análisis. Cuando se usa de forma interna o parcialmente interna en un organismo vivo, el sensor de ensayo se puede sumergir continuamente en la muestra o la muestra se puede introducir intermitentemente en el sensor.

El sensor de ensayo **1204** tiene una base **1206** que forma un depósito **1208** con una abertura **1212**. El depósito **1208** puede estar formado por una tapa con un respiradero. El depósito **1208** define un volumen parcialmente encerrado, pero se puede abrir a la muestra (no se muestra). De ese modo, la muestra puede fluir de forma continua a través del sensor de ensayo o se puede interrumpir para el análisis.

El depósito **1208** puede contener una composición que ayude en la retención de una muestra líquida tal como polímeros hinchables en agua o matrices poliméricas porosas. Los reactivos se pueden depositar en el depósito **1208**. Los reactivos pueden incluir una o más enzimas, sistemas enzimáticos, mediadores, aglutinantes, y especies similares. El aglutinante puede incluir diversos tipos de pesos moleculares de polímeros, tales como HEC (hidroxietil celulosa), CMC (carboximetil celulosa), y/o PEO (óxido de polietileno). Además de aglutinar los reactivos entre sí, el aglutinante puede ayudar en la filtración de glóbulos rojos, evitando que revistan las superficies del electrodo **1211**. El sensor de ensayo **1204** también puede tener una interfase de muestra **1214** dispuesta adyacente al depósito **1208**. La interfase de muestra **1214** puede rodear parcial o completamente el depósito **1208**. El sensor de ensayo **1204** puede tener otras configuraciones. Por ejemplo, el sensor de ensayo **1204** se puede adaptar para uso transdérmico formando el depósito **1208** con un material poroso o detrás de un material poroso en el que se mantiene la muestra.

La interfase de muestra **1214** tiene conductores **1290** conectados al menos a un electrodo de trabajo y al menos a dos contraelectrodos. Los electrodos pueden estar básicamente en el mismo plano o en más de un plano, tal como cuando están enfrentados. Los electrodos se pueden disponer en una superficie de la base **1206** que forma el depósito **1208**. Los electrodos se pueden extender o proyectar en el depósito **1208**. También se pueden extender uno o más conductores **1290** en el depósito **1208** para proporcionar una funcionalidad no proporcionada por los electrodos. Una capa dieléctrica puede cubrir parcialmente los conductores y/o los electrodos. Los contraelectrodos se pueden usar para equilibrar el potencial en uno o más electrodos de trabajo durante el análisis. El potencial equilibrado se puede proporcionar mediante la formación del contraelectrodo a partir de un material inerte, tal como carbono, incluyendo una especie redox soluble, tal como ferricianuro, en el depósito **1208**. Alternativamente, el potencial de equilibrado puede ser un potencial de referencia conseguido mediante la formación del contraelectrodo a partir de un par redox de referencia, tal como Ag/AgCl, para proporcionar un contraelectrodo-electrodo de referencia combinado. La interfase de muestra **1214** puede tener otros electrodos y conductores.

El dispositivo de medición **1202** incluye circuitería eléctrica **1216** conectada a una interfase del sensor **1218** y un dispositivo de visualización **1220**. La circuitería eléctrica **1216** incluye un procesador **1222** conectado a un generador de señal **1224**, un sensor de temperatura opcional **1226**, y un medio de almacenamiento **1228**.

El generador de señal **1224** proporciona una señal de entrada eléctrica a la interfase del sensor **1218** en respuesta al procesador **1222**. La señal de entrada eléctrica se puede transmitir mediante la interfase del sensor **1218** a la interfase de muestra **1214** para aplicar la señal de entrada eléctrica a la muestra del fluido biológico. La señal de entrada eléctrica se puede transmitir a través de todos o de una parte de los conductores **1290** en la interfase de muestra **1214**. La señal de entrada eléctrica puede ser un potencial o una corriente y puede ser constante, variable, o una combinación de los mismos, tal como cuando se aplica una señal de CA con una compensación de señal de

CC. La señal de entrada eléctrica se puede aplicar en forma de un pulso individual o en múltiples pulsos, secuencias, o ciclos. El generador de señal **1224** también puede registrar una señal de salida desde la interfase del sensor en forma de un generador-registrador.

5 El generador de señal **1224** puede incluir el potencióstato de la Figura 12B, que puede conmutar entre múltiples contraelectrodos y electrodos de trabajo direccionables independientemente, o puede incluir el sistema de potencióstato múltiple de la Figura 12C. La Figura 12D representa un potencióstato que se puede implementar en el generador de señal para conmutar entre cuatro contraelectrodos y un electrodo de trabajo conectado eléctricamente. La Figura 12E representa un potencióstato implementado para conmutar entre cuatro electrodos de trabajo y un contraelectrodo conectado eléctricamente. La Figura 12F representa un potencióstato implementado para conmutar
10 entre cuatro electrodos de referencia y un electrodo de trabajo conectado eléctricamente. Los uno o más potencióstatos pueden proporcionar diferentes potenciales de operación a la interfase de muestra **1214**. El generador de señal **1224** se pueden configurar donde un generador de función desencadena entradas de onda con desconexión cíclica al potencióstato. El generador de señal **1224** puede tener otras configuraciones.

15 El sensor de temperatura opcional **1226** determina la temperatura de la muestra en el depósito del sensor de ensayo **1204**. La temperatura de la muestra se puede medir, calcular a partir de la señal de salida, o suponer que es igual o similar a una medición de la temperatura ambiente o la temperatura de un dispositivo que implementa el sistema biosensor. La temperatura se puede medir usando un termistor, termómetro, u otro dispositivo de medición de temperatura. Se pueden usar otras técnicas para determinar la temperatura de la muestra.

20 El medio de almacenamiento **1228** puede ser una memoria magnética, óptica, o semiconductora, otro dispositivo de almacenamiento, o similar. El medio de almacenamiento **1228** puede ser un dispositivo de memoria fijo, un dispositivo de memoria extraíble, tal como una tarjeta de memoria, de acceso remoto, o similar.

25 El procesador **1222** implementa el análisis del analito y el tratamiento de datos usando un código de software legible por ordenador y los datos almacenados en el medio de almacenamiento **1228**. El procesador **1222** puede iniciar el análisis del analito en respuesta a la presencia del sensor de ensayo **1204** en la interfase del sensor **1218**, la aplicación de una muestra al sensor de ensayo **1204**, en respuesta a una entrada del usuario, o similar. El procesador **1222** controla el generador de señal **1224** para proporcionar la señal de entrada eléctrica a la interfase del sensor **1218**. El procesador **1222** puede recibir la temperatura de la muestra desde el sensor de temperatura opcional **1226**.

30 El procesador **1222** recibe la señal de salida desde la interfase del sensor **1218**. La señal de salida se genera en respuesta a la reacción redox de la especie medible en la muestra. La señal de salida eléctrica del sensor de ensayo puede ser una corriente (que se genera mediante amperimetría o voltimetría), un potencial (que se genera mediante potenciometría/galvanometría), o una carga acumulada (que se genera mediante colorimetría). La señal de salida se correlaciona con la concentración de uno o más analitos en la muestra usando una o más ecuaciones de correlación en el procesador **1222**. Los resultados del análisis del analito se pueden enviar al dispositivo de visualización **1220** y se pueden almacenar en el medio de almacenamiento **1228**.
35

40 Las ecuaciones de correlación entre las concentraciones del analito y las señales de salida se pueden representar gráficamente, matemáticamente, una combinación de los mismos, o similares. Las ecuaciones de correlación se pueden representar mediante una tabla de números de programa (PNA), otra tabla de consulta, o similar que se almacena en el medio de almacenamiento **1228**. Se pueden proporcionar instrucciones con respecto a la implementación del análisis del analito mediante el código de software legible por ordenador almacenado en el medio de almacenamiento **1228**. El código puede ser código objeto o cualquier otro código que describa o controle la funcionalidad que se describe en el presente documento. Los datos del análisis del analito se pueden someter a uno o más tratamientos de datos, incluyendo la determinación de las tasas de decaimiento, constantes K, proporciones, y similares en el procesador **1222**.

45 La interfase del sensor **1218** tiene contactos **1295** que conectan o comunican eléctricamente con los conductores **1290** en la interfase de muestra **1214** del sensor de ensayo **1204**. La interfase del sensor **1218** transmite la señal de entrada eléctrica desde el generador de señal **1224** a través de un conector en la interfase del sensor **1218** a los contactos **1295** en la interfase de muestra **1214**. La interfase del sensor **1218** también transmite la señal de salida desde la muestra a través de los contactos **1295** al procesador **1222** y/o el generador de señal **1224**.

50 El dispositivo de visualización **1220** puede ser analógico o digital. El dispositivo de visualización también puede ser un dispositivo de visualización LCD adaptado para presentar una lectura numérica.

55 En uso, se transfiere una muestra líquida para análisis al depósito **1208** mediante la introducción del líquido en el puerto de muestra **1212**. La muestra líquida fluye a través del puerto de muestra **1212**, llenando el depósito **1208** mientras se expulsa el aire contenido previamente. La muestra líquida reacciona químicamente con los reactivos depositados en las regiones de análisis secundarias del depósito **1208**.

El sensor de ensayo **1202** se dispone adyacente al dispositivo de medición **1202**. Adyacente incluye posiciones en las que la interfase de muestra **1214** está en comunicación eléctrica con la interfase del sensor **1208**. Comunicación eléctrica incluye la transferencia de señales de entrada y/o salida entre los contactos en la interfase del sensor **1218**

y los conductores **1290** en la interfase de muestra **1214**.

La Figura 13 representa un análisis electroquímico **1300** para determinar la presencia y/o la concentración de al menos un analito en una muestra. En la introducción de la muestra **1310**, la muestra se introduce en el sensor de ensayo. En la reacción redox **1320**, una parte del analito de la muestra experimenta una reacción redox. En la transferencia de electrones **1330**, los electrones se transfieren opcionalmente desde el analito a un mediador. En la primera aplicación de señal de entrada **1340**, se aplica una señal de entrada entre un electrodo de trabajo y un primer contraelectrodo. En la segunda aplicación de señal de entrada **1350**, se aplica una señal de entrada de un potencial diferente entre un electrodo de trabajo y un segundo contraelectrodo. En la determinación de muestra **1350**, se determina la presencia y/o la concentración de una o más especies medibles en la muestra a partir de una o más señales de salida, y en la transmisión de la concentración de muestra **1360**, la concentración de la especie medible determinada se puede presentar, almacenar, procesar posteriormente, y similar.

En la introducción de la muestra **1310**, la muestra se introduce en la parte del sensor del sistema, tal como un sensor de ensayo. El sensor de ensayo incluye al menos un electrodo de trabajo y al menos dos contraelectrodos. Los electrodos pueden incluir una o más capas de composición de reactivo. El electrodo de trabajo puede incluir una capa de barrera de difusión que está integrada en una capa de composición de reactivo o que es distinta de la capa de composición de reactivo. La capa de barrera de difusión proporciona un espacio poroso que tiene un volumen interno donde puede residir la especie medible. Los poros de la capa de barrera de difusión se pueden seleccionar de modo que las especies medibles se puedan difundir en la capa de barrera de difusión, mientras que los constituyentes de la muestra físicamente más grandes, tales como los glóbulos rojos, se excluyen básicamente. Cuando el electrodo de trabajo incluye una capa de barrera de difusión distinta, la capa de reactivo puede estar o no estar dispuesta sobre la capa de barrera de difusión. Dependiendo de la naturaleza del análisis **1300**, los conductores pueden servir como electrodos. A este respecto, los reactivos pueden estar presentes en la muestra, tal como si se depositan adyacentes a los electrodos.

En la reacción redox **1320** de la Figura 13, una parte del analito presente en la muestra se oxida o se reduce química o bioquímicamente, tal como mediante una oxidorreductasa o especie similar. Esta reacción redox se produce a medida que la muestra hidrata los reactivos. Después de la oxidación o la reducción, se pueden transferir opcionalmente los electrones entre el analito y un mediador en la transferencia de electrones **1330**. De ese modo, se forma una especie medible ionizada, tal como a partir del analito o un mediador, que tiene una concentración de muestra que responde al analito. Puede ser beneficioso proporcionar un retraso temporal inicial, o "período de incubación", para que los reactivos reaccionen con el analito.

En la primera aplicación de señal de entrada **1340** de la Figura 13, el sistema aplica una señal de entrada a la muestra usando un primer contraelectrodo. Las señales de entrada son señales eléctricas, tales como corriente o potencial, y pueden ser una secuencia de pulsos de excitación separados por relajaciones. El sistema puede aplicar una o más señales de entrada a la muestra, incluyendo las que se usan para determinar la presencia y/o la concentración del analito y las que se usan para determinar otros factores, tales como el contenido de hematocrito de la muestra y el estado de llenado del sensor de ensayo.

Además de la primera aplicación de señal de entrada **1340**, se puede introducir un potencial de sondeo inicial antes de la primera aplicación de señal de entrada **1340** para determinar la presencia de la muestra. También se puede aplicar un potencial entre cualquier pareja de electrodos y/o conductores para retirar material del electrodo y/o la superficie del conductor, para alterar la química de un electrodo, o para oxidar o reducir una parte del sistema de transferencia de carga. Tal potencia se puede aplicar antes del análisis.

En la segunda aplicación de señal de entrada **1350** de la Figura 13, el sistema aplica una segunda señal de entrada con un potencial diferente a la muestra usando un segundo contraelectrodo. La capacidad para seleccionar el potencial de trabajo de los múltiples electrodos de trabajo y/o la capacidad para seleccionar el potencial de operación de los múltiples contraelectrodos proporcionan un sistema biosensor con la capacidad de realizar múltiples tipos de análisis. Durante un análisis, se puede medir el potencial entre cualquier pareja de los múltiples electrodos de trabajo, contraelectrodos, y/o electrodos de referencia para proporcionar información útil. Al proporcionar el depósito de muestra con múltiples regiones de análisis secundarias llenadas secuencialmente, se puede monitorizar el progreso del llenado del depósito por la muestra usando las dos o más aplicaciones de señal de entrada **1340**, **1350**.

En la determinación de muestra **1360**, el dispositivo de medición analiza las señales de salida que responden a las dos señales de entrada para determinar la presencia y/o la concentración de al menos una especie medible en la muestra para cada potencial. Si la oxidorreductasa o la especie similar usada en la reacción redox **1320** reacciona con un analito individual, se puede proporcionar específicamente a una parte de la señal eléctrica generada. Dado que se puede ionizar más de una especie medible mediante diferentes partes de la señal de entrada, se puede determinar la presencia, y/o la concentración de múltiples analitos, mediadores, interferentes, y similares. También se pueden analizar además corriente, tiempo, y/o otros valores. Por ejemplo, las corrientes determinadas para un analito, mediador, o interferente se pueden modificar con las corrientes determinadas para otro analito, mediador, o interferente con el fin de aumentar el rendimiento de medición del sistema.

Las señales de entrada con desconexión cíclica, tales como amperimétrica con desconexión cíclica, voltimétrica con desconexión cíclica, y/o las combinaciones de las mismas, se pueden usar para direccionar el potencial de un mediador específico y resolver el conjunto de ecuaciones lineales. Cuando se usa un sensor de ensayo que tiene contraelectrodos eléctricamente independientes y electrodos de trabajo conectados eléctricamente, por ejemplo, se

$$i_{baja} = A_1 \cdot S_1 + Int_1, \quad (1)$$

$$i_{media} = i_{baja} + i_2 = k_1 \cdot (A_1 \cdot S_1 + Int_1) + k_2 \cdot (A_2 \cdot S_2 + Int_2), \quad (2)$$

$$i_{alta} = i_{media} + i_3 = k_1 \cdot (A_1 \cdot S_1 + Int_1) + k_2 \cdot (A_2 \cdot S_2 + Int_2) + k_3 \cdot (A_3 \cdot S_3 + Int_3), \quad (3)$$

donde i_{baja} , i_{media} e i_{alta} son corrientes del acoplamiento con contraelectrodos de potenciales bajo, medio y alto; A_1 , A_2 y A_3 son las concentraciones de las tres especies medibles diferentes; k_1 , k_2 y k_3 son constantes de proporcionalidad que expresan la diferencia de corriente entre dos de los potenciales de operación; y S e Int son la pendiente y la ordenada en el origen para cada sistema de calibración de analito, respectivamente.

La Figura 14A representa la señal de entrada de una secuencia de pulso amperimétrica con desconexión cíclica secuencial en combinación con un sensor de ensayo que tiene contraelectrodos y electrodos de trabajo direccionables independientemente (WE_1 - WE_4). En este caso, un electrodo de trabajo opera cada vez, y la señal de entrada se introduce secuencialmente para cada pareja de electrodos. De esta manera, no se requiere un potencióstato de múltiples potenciales para determinar la señal de salida de las múltiples parejas de electrodos. La Figura 14B representa la señal de entrada de una secuencia de pulso amperimétrica con desconexión cíclica simultánea usada en combinación con un sensor de ensayo que tiene contraelectrodos y electrodos de trabajo direccionables independientemente (WE_1 - WE_4). En este caso las cuatro parejas de electrodos se operan simultáneamente con el mismo potencial para tal excitación. Aunque no se muestra en la figura, la señal de entrada se podría aplicar simultáneamente a dos o más de los electrodos mientras se aplica secuencialmente a los demás electrodos.

Mediante la conexión de múltiples contraelectrodos direccionables independientemente a un convertidor de corriente/tensión, las corrientes de salida resultantes de los análisis se pueden medir por separado. Esta operación se puede combinar con una señal de entrada con desconexión cíclica donde un contraelectrodo está desconectado, mientras que un segundo contraelectrodo está conectado. La cascada resultante de corrientes de medición de los contraelectrodos independientes proporciona una forma de analizar múltiples analitos y otros componentes de la muestra. Se pueden resolver las combinaciones lineales de ecuaciones para determinar la concentración y/o otros parámetros de analitos individuales.

Las señales de entrada aplicadas tienen unas tensiones de 0,05 a 1,0 V, preferentemente de 0,1 a 0,8 V, y más preferentemente de 0,2 a 0,5 V. Las señales de entrada se pueden proporcionar con una duración de 0,01 segundos a 3 minutos, dependiendo del analito o analitos de interés. Por ejemplo, se puede completar un análisis de glucosa en menos de 5 segundos mientras que otros analitos se pueden beneficiar de señales de entrada de mayor duración. Si la señal de entrada incluye múltiples excitaciones y relajaciones, la duración de cada excitación puede ser de 0,01 a 7 segundos, preferentemente de 0,5 a 3 segundos, y más preferentemente de 0,1 a 2 segundos para la glucosa, por ejemplo. Se pueden usar otras duraciones de señal de entrada y excitación.

En la transmisión de la concentración de la muestra **1370** de la Figura 13, el dispositivo de medición convierte al menos una concentración de especie medible en una concentración de analito de muestra y puede presentar, almacenar para futura referencia, procesar adicionalmente, y/o usar una o más de las concentraciones de especie medible determinadas para cálculos adicionales. Por ejemplo, el valor determinado para un analito, mediador, o interferente se puede modificar con el valor determinado para otro analito, mediador, o interferente con el fin de aumentar el rendimiento de medición del sistema.

También se puede usar un contraelectrodo que tiene una especie oxidable presente en el sistema de transferencia de carga como electrodo de trabajo que carece de oxidorreductasa, proporcionando de ese modo la capacidad de analizar el hematocrito y determinar el componente de fondo de la señal de salida. La concentración de analito se puede modificar con esta y otra información para aumentar la exactitud y/o la precisión. Se puede usar un contraelectrodo como electrodo de trabajo durante un circuito abierto para medir uno o más parámetros de hematocrito. En otro aspecto, se pueden correlacionar una o más señales de salida con una curva de calibración o una tabla de consulta para determinar la desviación de hematocrito o la desviación atribuible a un interferente.

Dependiendo de la naturaleza del analito, se puede usar la concentración de un analito para alterar la lectura de otro analito. Por ejemplo, cuando la concentración de un primer analito interfiere positivamente con la concentración de un segundo analito, la concentración del primer analito se puede restar de la concentración del segundo analito para aumentar la exactitud y/o la precisión del valor de concentración determinado para el segundo analito.

La Figura 15 muestra los resultados de promediar los resultados de hasta cuatro análisis separados para el mismo analito con el fin de determinar la concentración del analito en la muestra. Como se muestra en el gráfico, al aumentar el número de análisis realizados distintos de uno a tres, el 98 % de los valores de concentración obtenidos

5 entran dentro de $\pm 15\%$ del límite de desviación cuando se compara con un instrumento YSI de referencia. Aunque los datos subyacentes al gráfico se obtuvieron a partir de sensores de ensayo distintos, los sensores de ensayo que tienen dos o más regiones de análisis secundarias se pueden configurar para realizar el mismo análisis en más de una región secundaria además de analizar diferentes analitos. De ese modo, las múltiples regiones de análisis secundarias básicamente aisladas químicamente pueden proporcionar los beneficios del promediado de señal con un sensor de ensayo individual.

10 La capacidad de realizar el mismo análisis múltiples veces en un sensor de ensayo individual puede aumentar significativamente la exactitud y/o la precisión de la concentración de analito determinada. De ese modo, el promediado de señal hecho posible al realizar el mismo análisis múltiples veces en el mismo sensor de ensayo puede proporcionar una mejora de la relación señal-ruido para el sensor de ensayo al reducir el ruido aleatorio (que se caracteriza por el valor sd de desviación estándar) en una tasa de $1/\sqrt{n}$ con respecto a los sistemas sensores convencionales.

15 La Figura 16 representa los decaimientos de corriente obtenidos cuando una señal de entrada amperimétrica con desconexión cíclica se aplica a ocho electrodos direccionables individualmente y básicamente aislados químicamente. Los electrodos se configuraron en un diseño múltiple en T con cuatro electrodos de trabajo que se oponen a cuatro contraelectrodos a través del canal primario, tal como se ha representado previamente en la Figura 31. Cada electrodo de trabajo se formó con una composición de reactivo que incluía un 0,5 % (p/p) de aglutinante HEC, 50 ml de la molécula de Estructura I, y 2 U/ml de sistema enzimático PQQ-GDH en tampón fosfato a pH 7. Cada contraelectrodo se formó con un sistema de transferencia de carga que incluía un 0,5 % (p/p) de aglutinante HEC y ferricianuro básicamente puro 100 mM en tampón fosfato a pH 7.

20 Para realizar el experimento, se introdujo una muestra que incluía 100 mg/dl de glucosa en tampón fosfato a pH 7 en el sensor de ensayo y se aplicó una señal de entrada amperimétrica con desconexión cíclica que incluía dos excitaciones iniciales que tenían anchuras de pulso variables seguidas de siete excitaciones que tenían una anchura de pulso de 0,375 segundos. Las últimas siete excitaciones se separaron por períodos de relajación de un segundo. Hacia el final de la excitación aplicada en el punto temporal de dos segundos, por ejemplo, se promedian los cuatro valores de corriente correspondientes a cada pareja de electrodos (W1-C1, W2-C2, W3-C3, y W4-C4). A partir de este promedio de cuatro valores de corriente, se puede determinar una concentración de analito de la muestra usando una o más ecuaciones de correlación o un procedimiento similar. De esta manera, se pueden obtener los beneficios en la exactitud y/o la precisión discutidos previamente obtenidos de promediar múltiples análisis a partir de un sensor de ensayo individual.

Aunque se han descrito diversas realizaciones de la invención, será evidente para los expertos habituales en la materia que son posibles otras realizaciones o implementaciones dentro del alcance de la invención. Por lo tanto, la invención solo está restringida por las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento (1300) de medición de al menos un analito en una muestra, que comprende:
 - oxidar o reducir química o bioquímicamente al menos un analito en una muestra;
 - aplicar una primera señal de entrada a la muestra con un electrodo de trabajo y un primer contraelectrodo,
 - 5 **caracterizado por** aplicar una segunda señal de entrada con un potencial diferente que la primera señal de entrada a la muestra con el electrodo de trabajo y un segundo contraelectrodo, donde el electrodo de trabajo, el primer contraelectrodo y el segundo contraelectrodo son direccionables individualmente y residen en un entorno diferente sustancialmente aislados químicamente, de modo que no se produce sustancialmente una mezcla difusiva o convectiva de los reactivos entre los entornos sustancialmente aislados químicamente durante el tiempo del análisis;
 - 10 analizar las señales de salida de la primera y la segunda señales de entrada para determinar una concentración de una primera especie medible en la muestra con el potencial del primer contraelectrodo, una concentración de una segunda especie medible en la muestra con el potencial del segundo contraelectrodo; y
 - 15 convertir al menos una de las concentraciones de la primera y la segunda especies medibles en la concentración del al menos un analito en la muestra.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, además **caracterizado por**:
 - aplicar una tercera señal de entrada con un potencial diferente que la primera y la segunda señales de entrada a la muestra con el electrodo de trabajo y un tercer contraelectrodo, donde el electrodo de trabajo y el tercer
 - 20 contraelectrodo están en entornos sustancialmente aislados químicamente, donde el primer contraelectrodo, el segundo contraelectrodo, y el tercer contraelectrodo están en entornos sustancialmente aislados químicamente;
 - analizar la señal de salida de la tercera señal de entrada para determinar una concentración de una tercera especie medible en la muestra; y convertir al menos una de las concentraciones de la primera, la segunda, y la tercera especies medibles en la concentración del al menos un analito en la muestra.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, además **caracterizado por**:
 - 25 convertir la concentración de la primera especie medible en la concentración de al menos un analito en la muestra;
 - alterar, con la concentración de la segunda especie medible, el valor de concentración del al menos un analito en la muestra o
 - 30 una ecuación de correlación a partir de la que se determina el valor de concentración del al menos un analito en la muestra.
4. El procedimiento de la reivindicación 2, además **caracterizado por**:
 - alterar, con la concentración de la segunda especie medible, el valor de concentración de al menos un analito en la muestra o
 - 35 una ecuación de correlación a partir de la que se determina el valor de concentración del al menos un analito en la muestra.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los potenciales diferentes de las señales de entrada están separados por al menos 50 mV o al menos 100 mV.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, además **caracterizado por** proporcionar una configuración de potencial diferente con especies redox diferentes.
- 40 7. El procedimiento de la reivindicación 6, donde al menos dos contraelectrodos tienen especies redox diferentes, seleccionada la diferencia entre el grupo que consiste en un metal frente a una molécula orgánica electroactiva y la identidad elemental de un metal.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, además **caracterizado por** proporcionar una configuración de potencial diferente con especies redox que tienen diferentes proporciones de los conjugados de un par redox.
- 45 9. El procedimiento de la reivindicación 8, además **caracterizado por** al menos un par conjugado redox de ferrocianuro y ferricianuro.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, además **caracterizado por** variar el potencial del sistema de transferencia de carga en aproximadamente 150 mV.
- 50 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde al menos un par conjugado redox es ferricianuro puro.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, donde la proporción del conjugado de un par redox es 9,5:0,5, 8:2, 5:5, 2:8, o 0,5:9,5, o

donde la proporción del par conjugado es al menos una de 1:9, 1:1, y 9:1.

13. Los procedimientos de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, además **caracterizados por**:

- 5 aplicar seis señales de entrada a la muestra con potenciales diferentes;
analizar las señales de salida de las seis señales de entrada;
determinar las concentraciones de seis especies medibles en la muestra con los potenciales diferentes; y
convertir al menos una de las seis concentraciones de especies medibles en la concentración de al menos un analito en la muestra.
- 14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el potencial de operación absoluto es -200 mV, 0 mV, o 200 mV, y el potencial de operación relativo es aproximadamente 0,4 V.
- 10 15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde al menos una de las señales de entrada tiene un potencial de sondeo o un potencial aplicado antes del análisis.

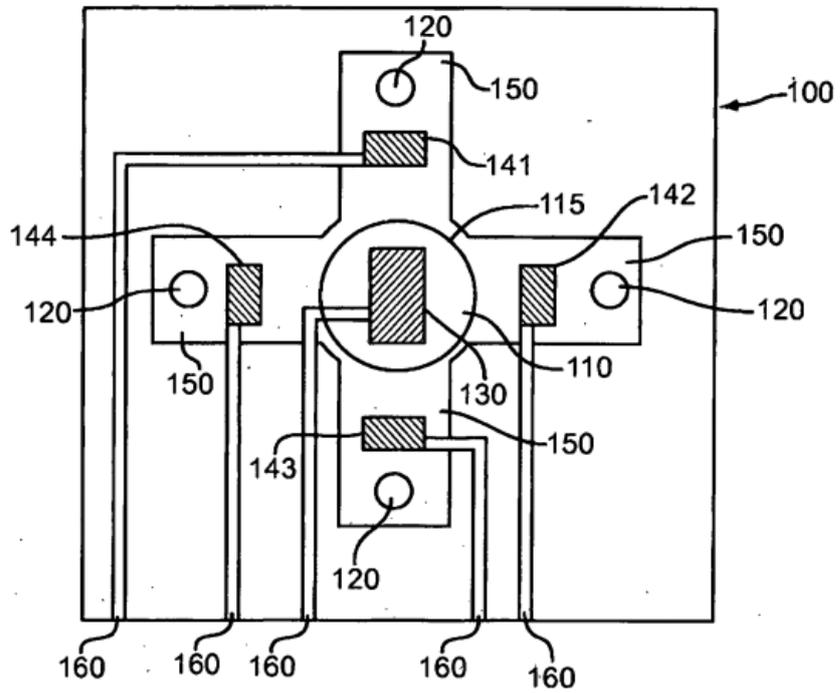


Fig. 1A

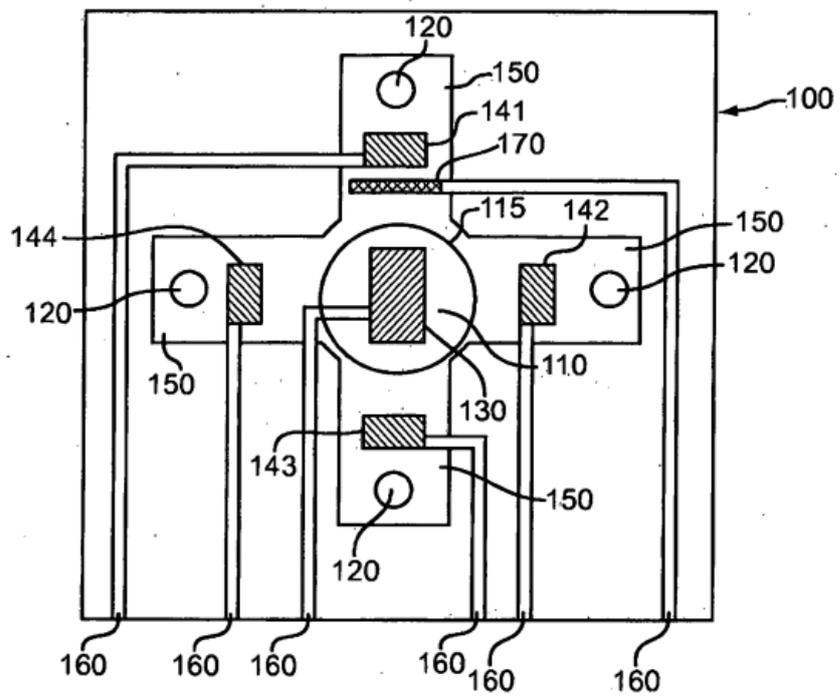


Fig. 1B

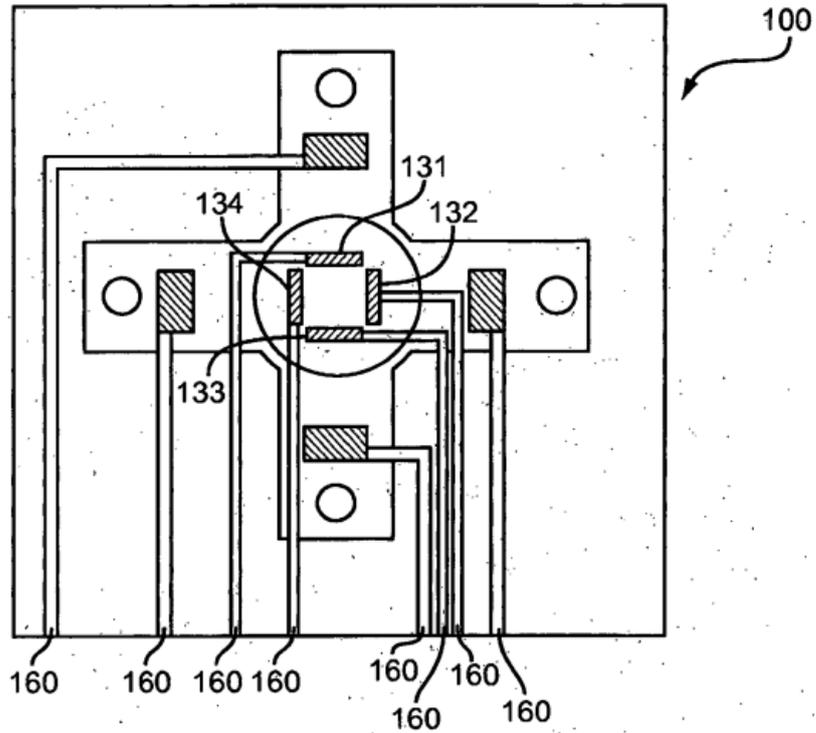


Fig. 1C

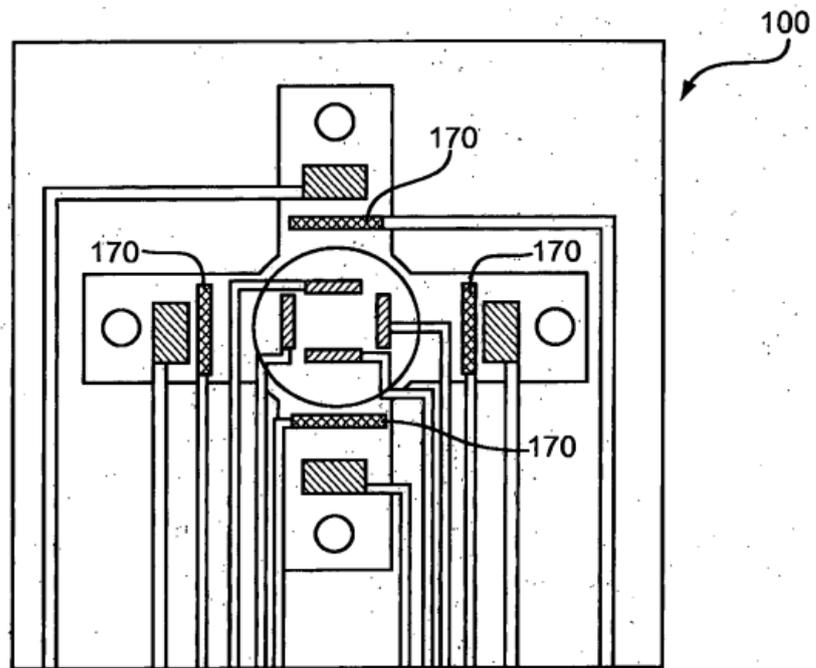


Fig. 1D

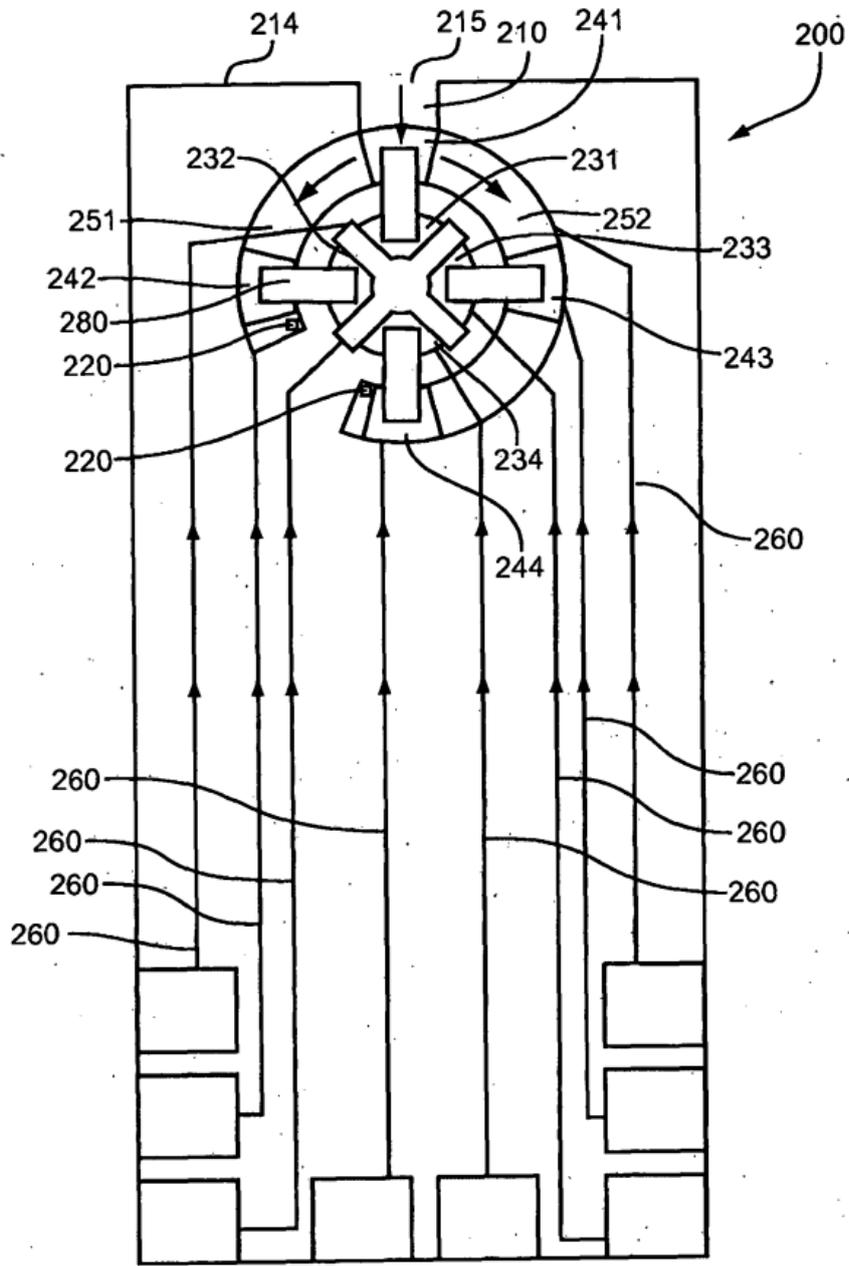


Fig.2A

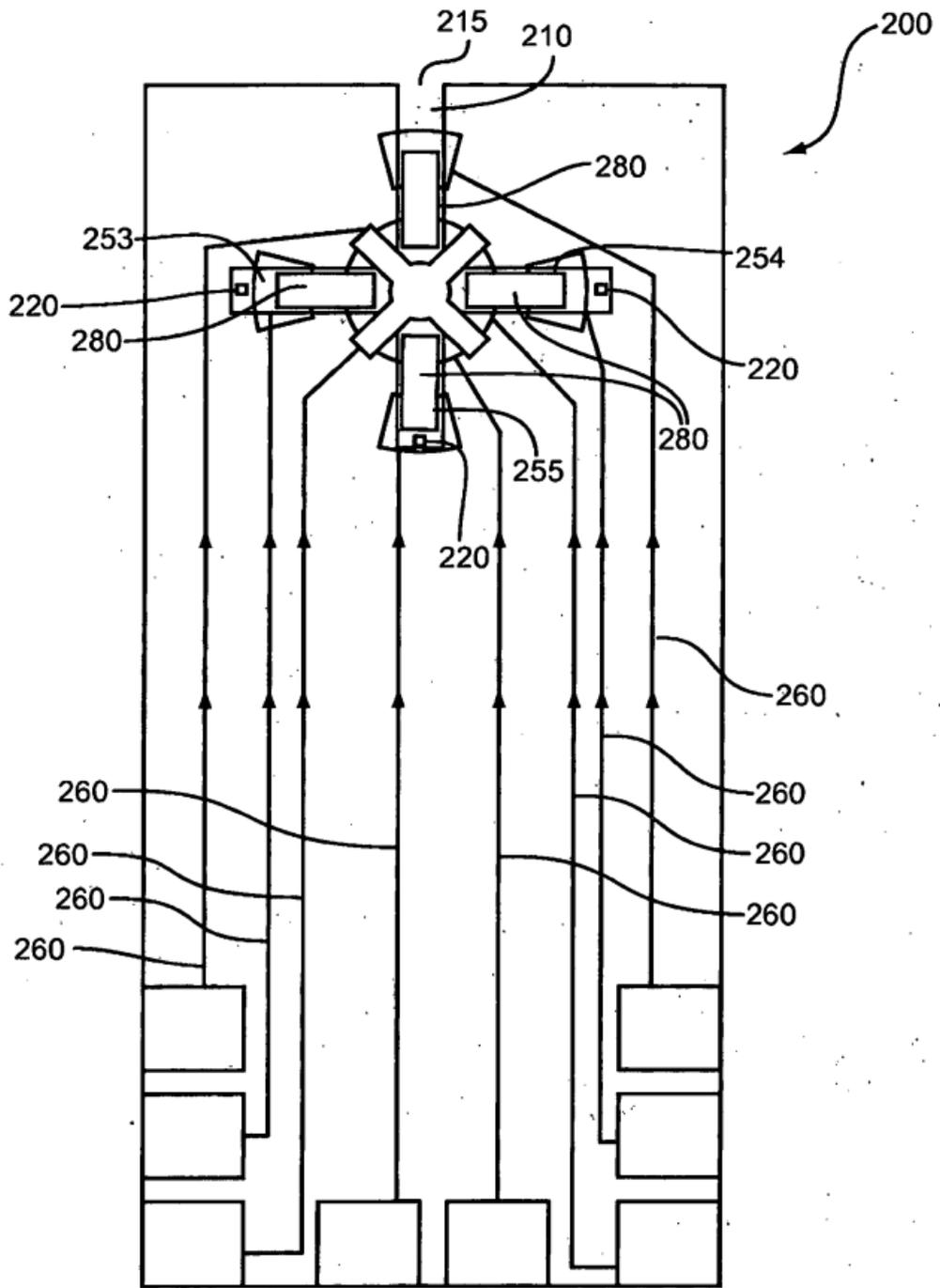


Fig. 2B

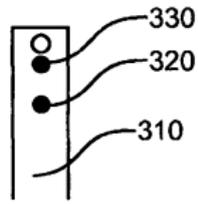


Fig. 3A

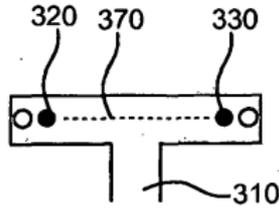


Fig. 3B

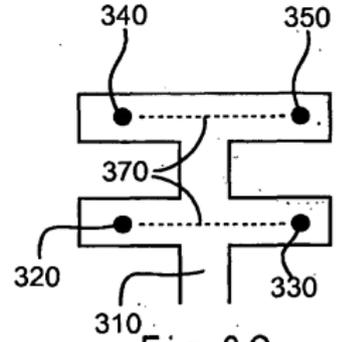


Fig. 3C

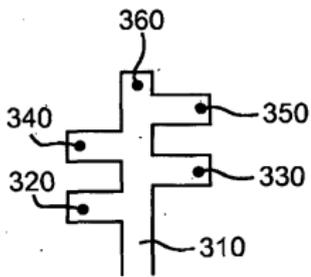


Fig. 3D

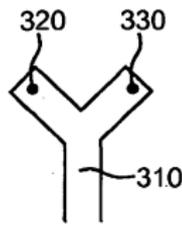


Fig. 3E

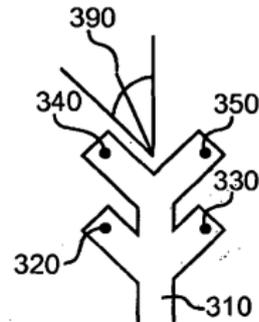


Fig. 3F

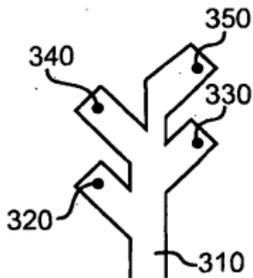


Fig. 3G

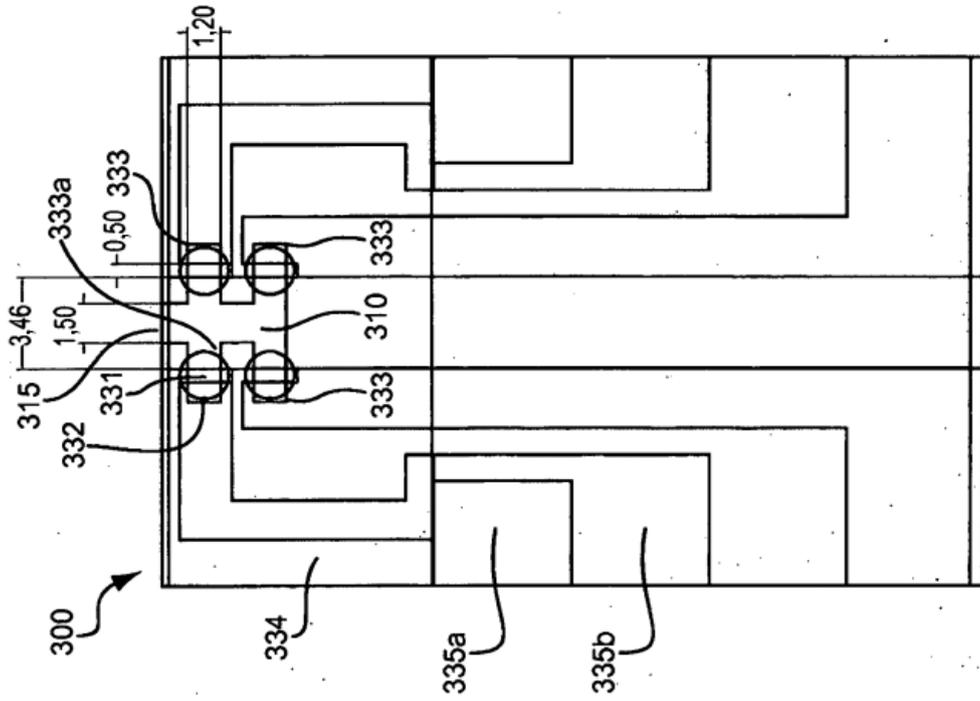


Fig. 3H

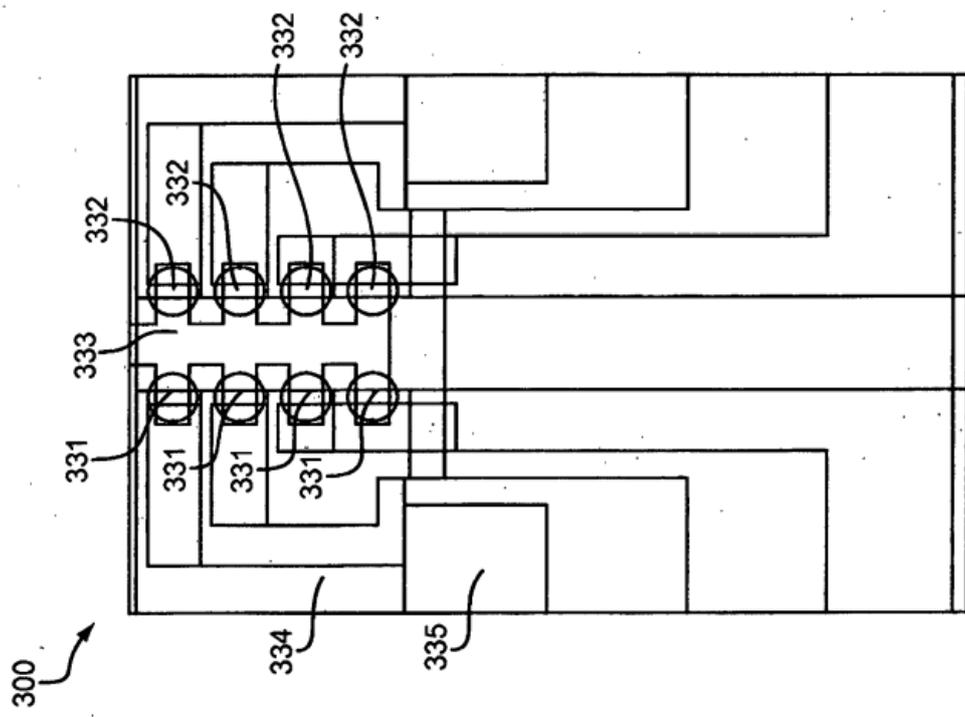


Fig. 3I

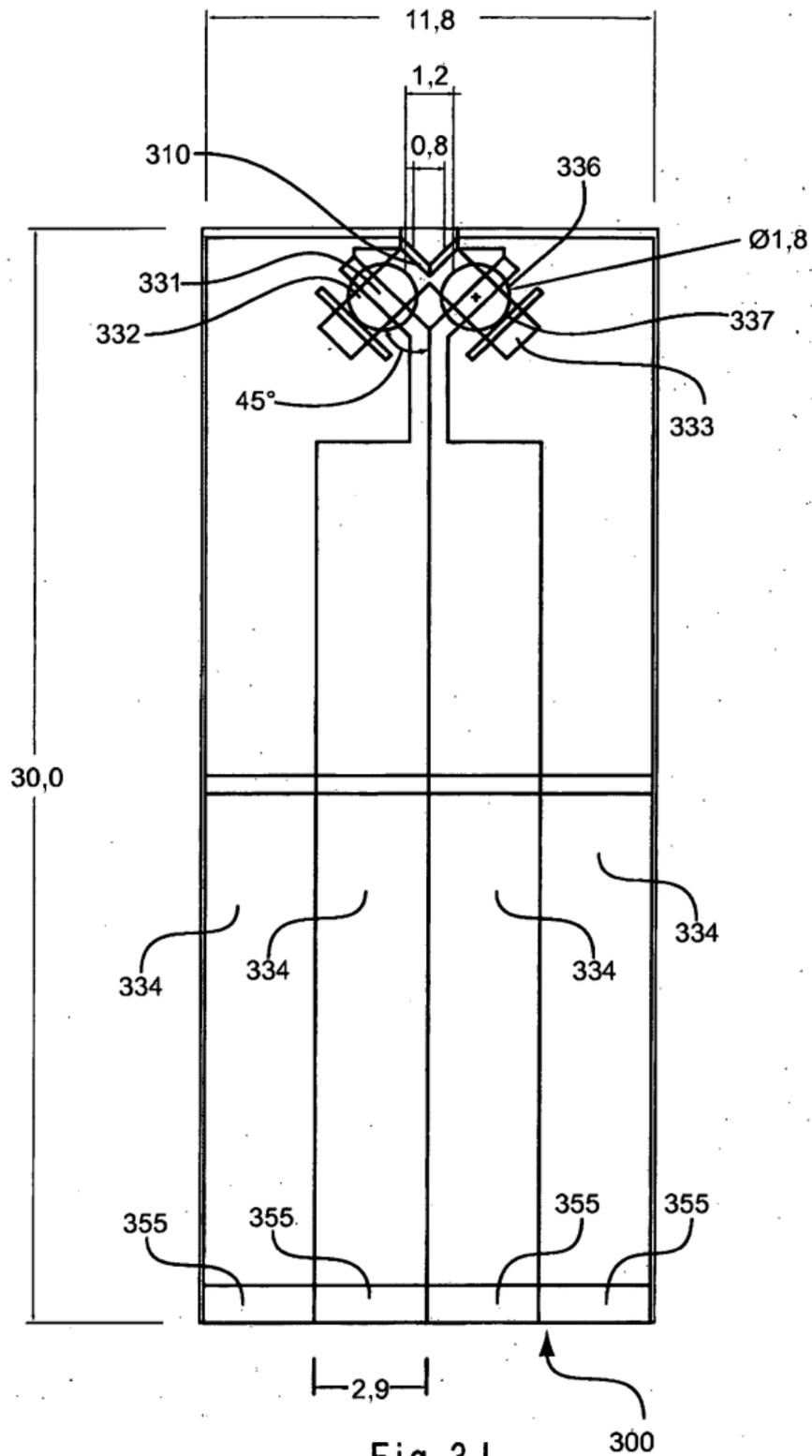


Fig. 3J

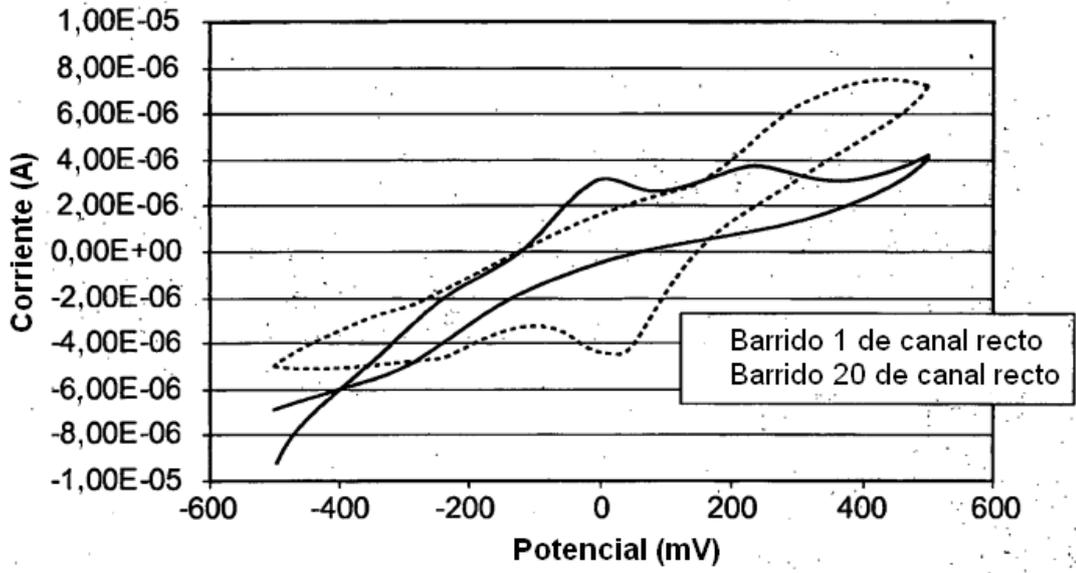


Fig.4A

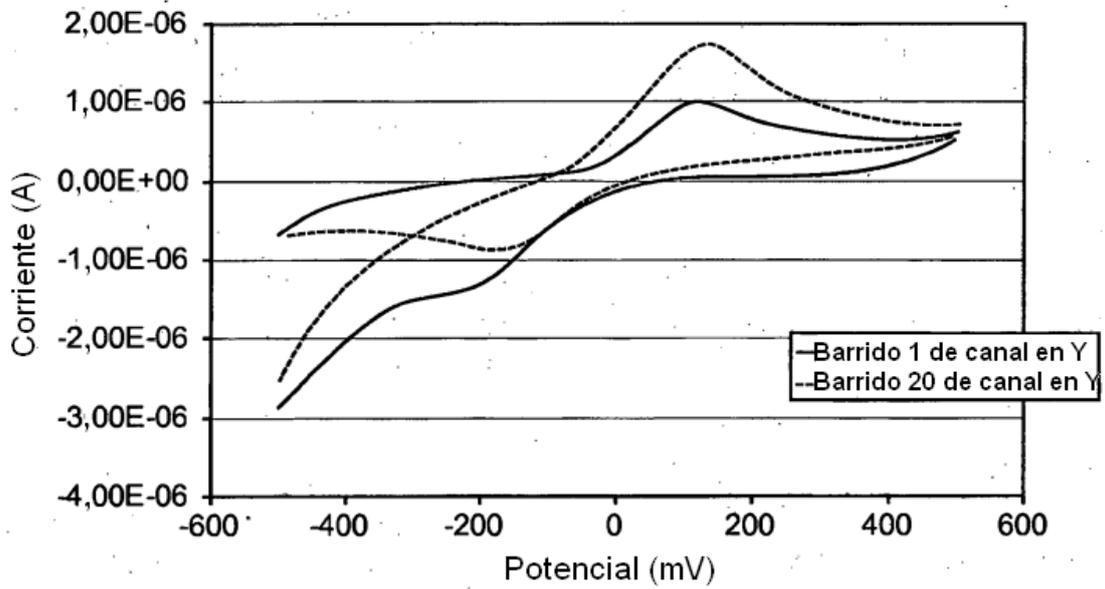


Fig.4B

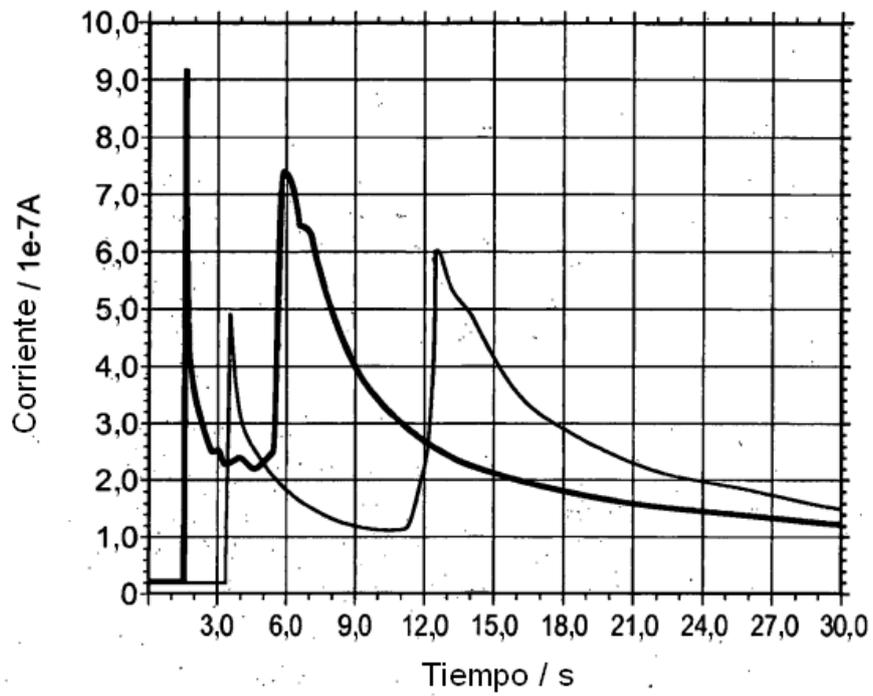


Fig. 5A

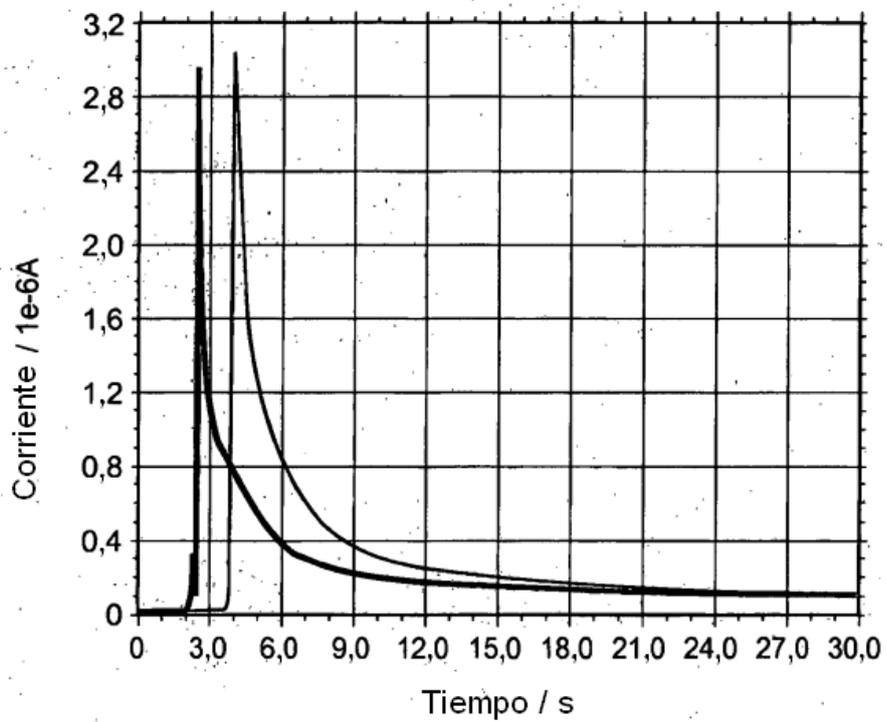


Fig. 5B

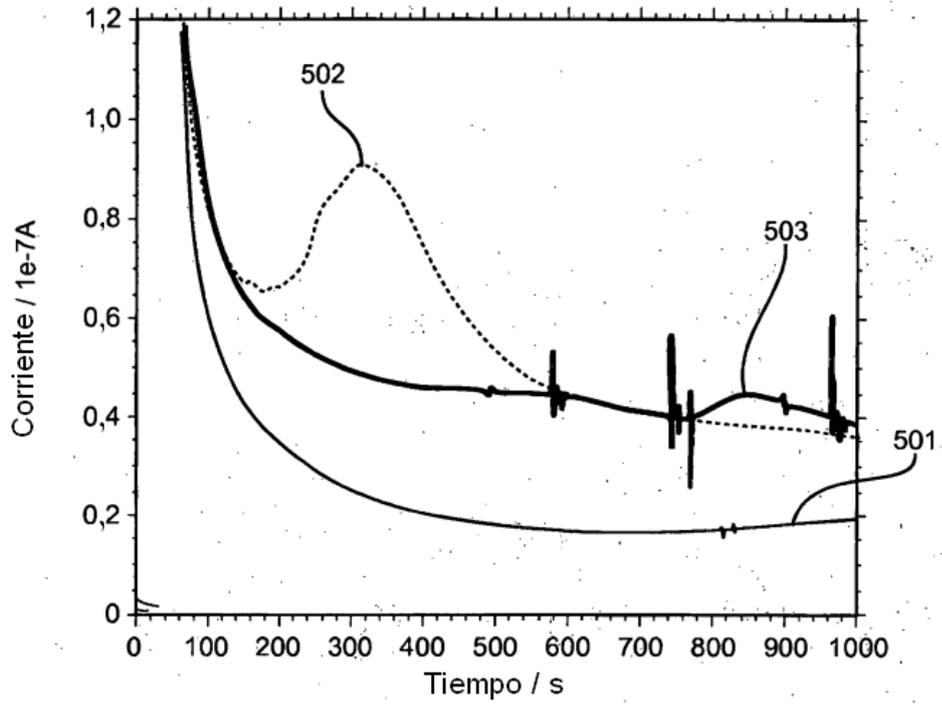


Fig. 5C

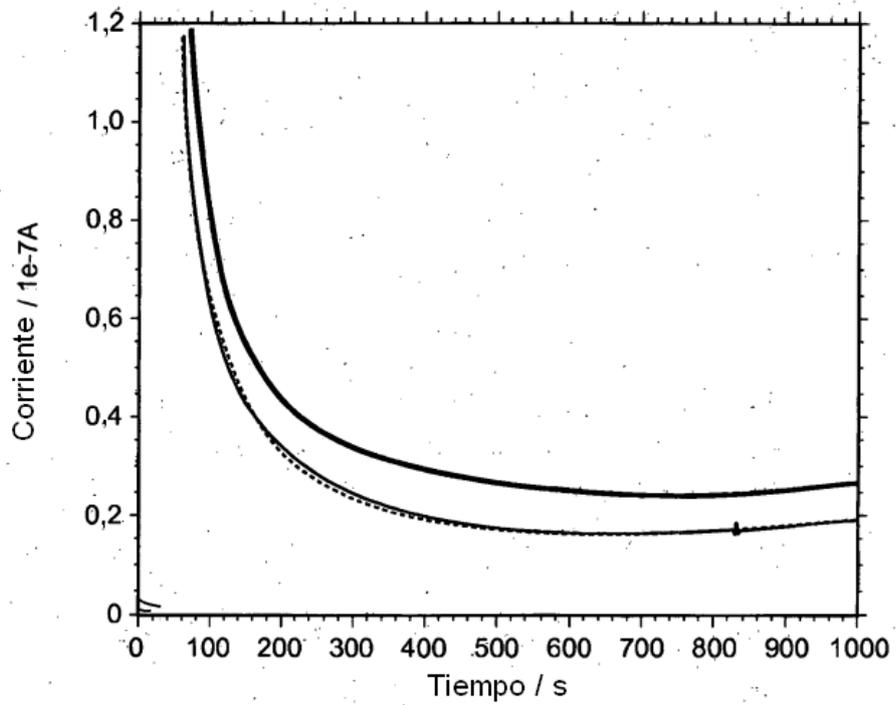
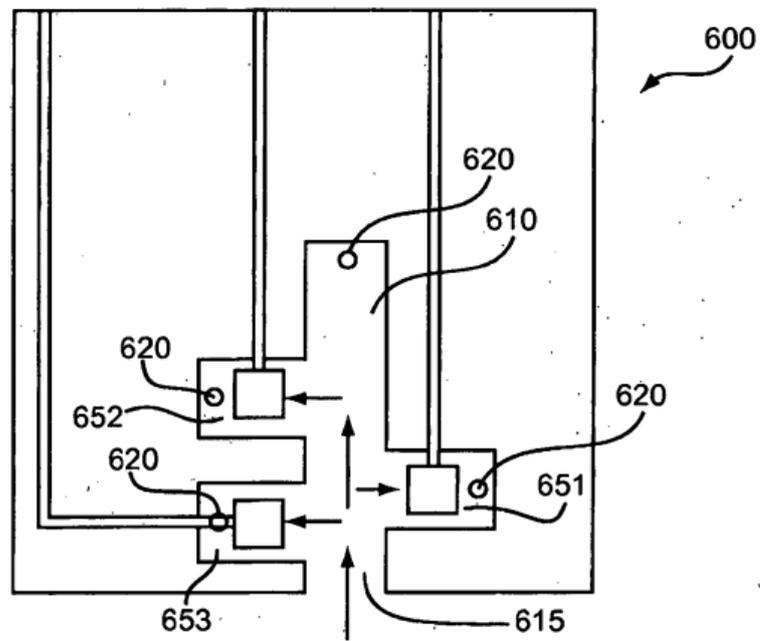
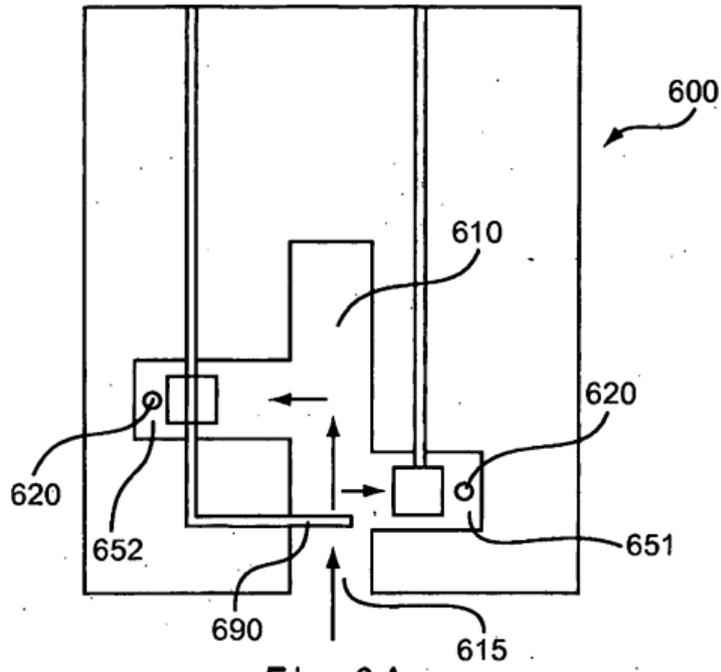


Fig. 5D



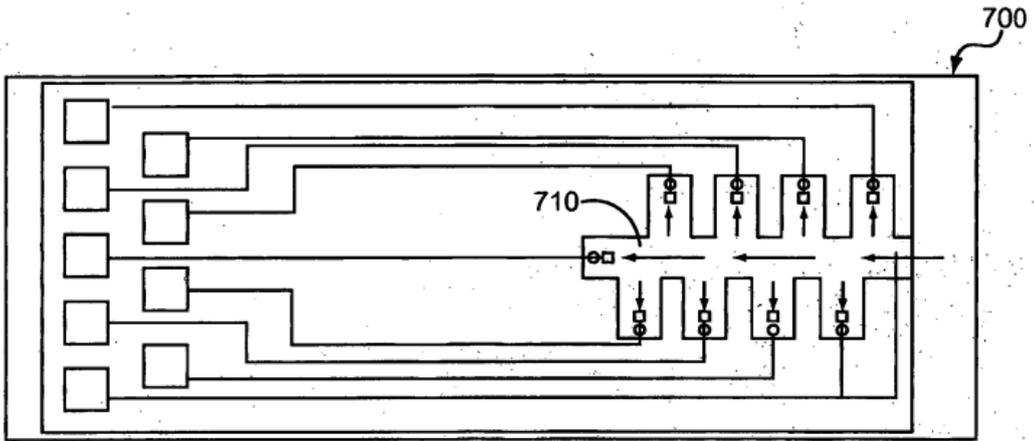


Fig. 7A

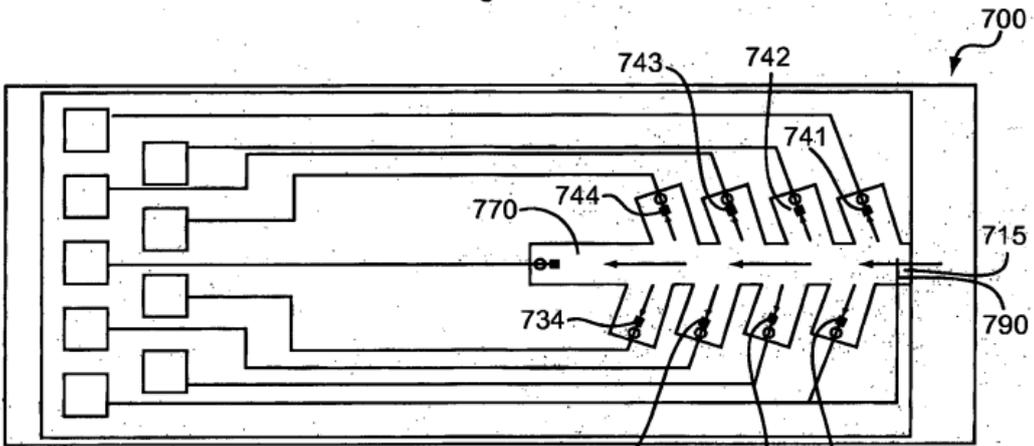


Fig. 7B

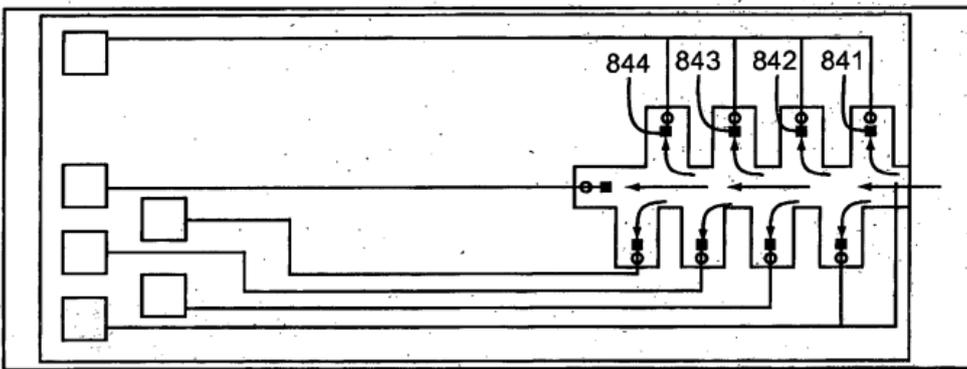


Fig. 8A

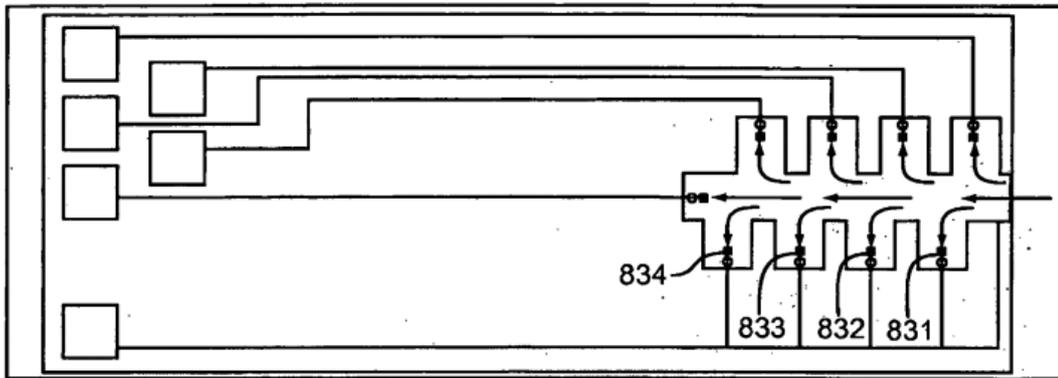


Fig. 8B

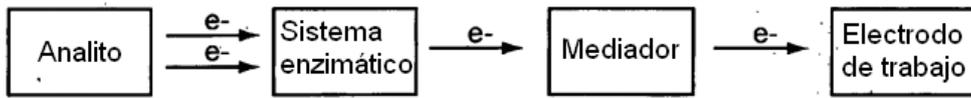


Fig. 9A

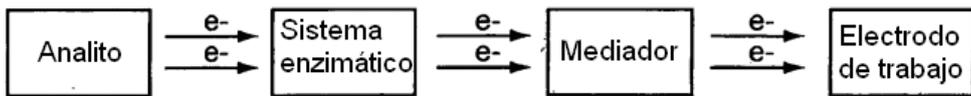


Fig. 9B

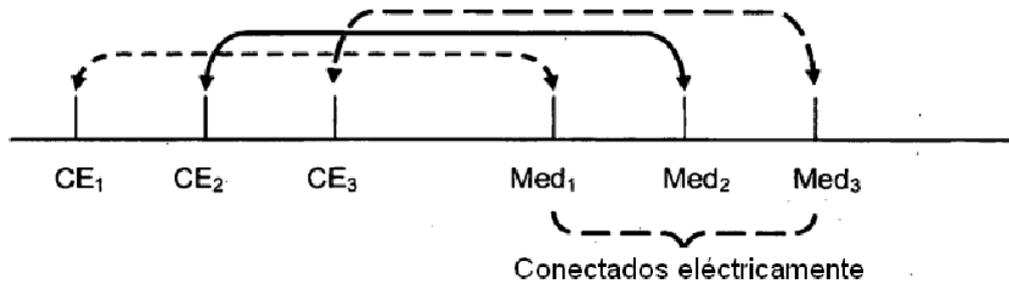


Fig.10A

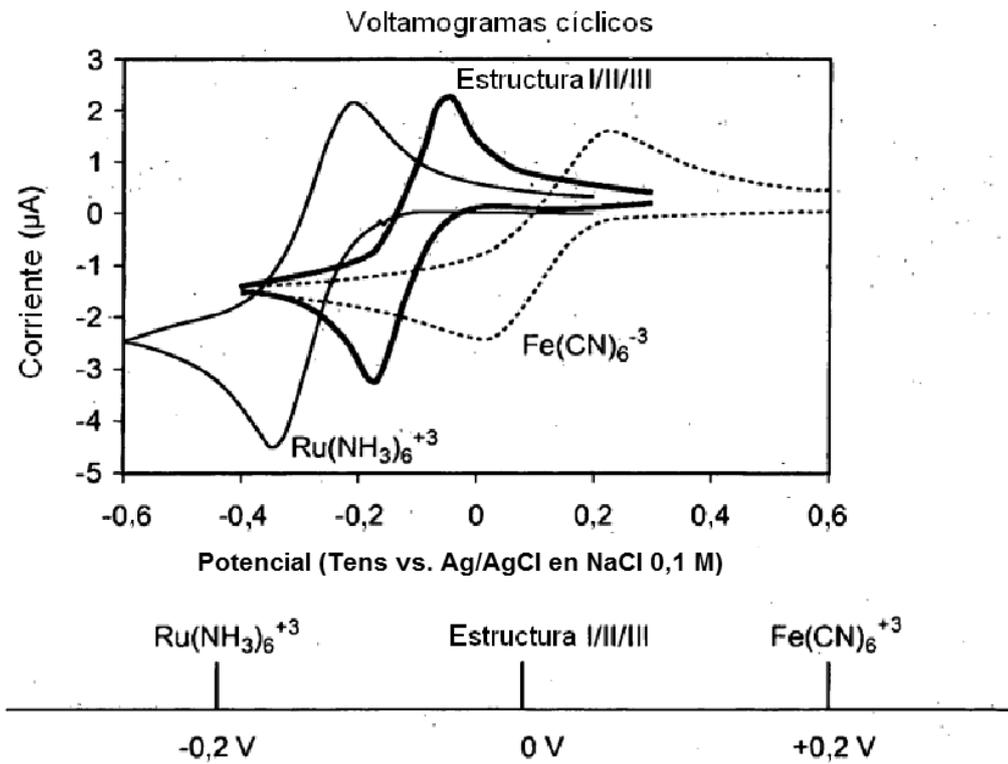


Fig.10B

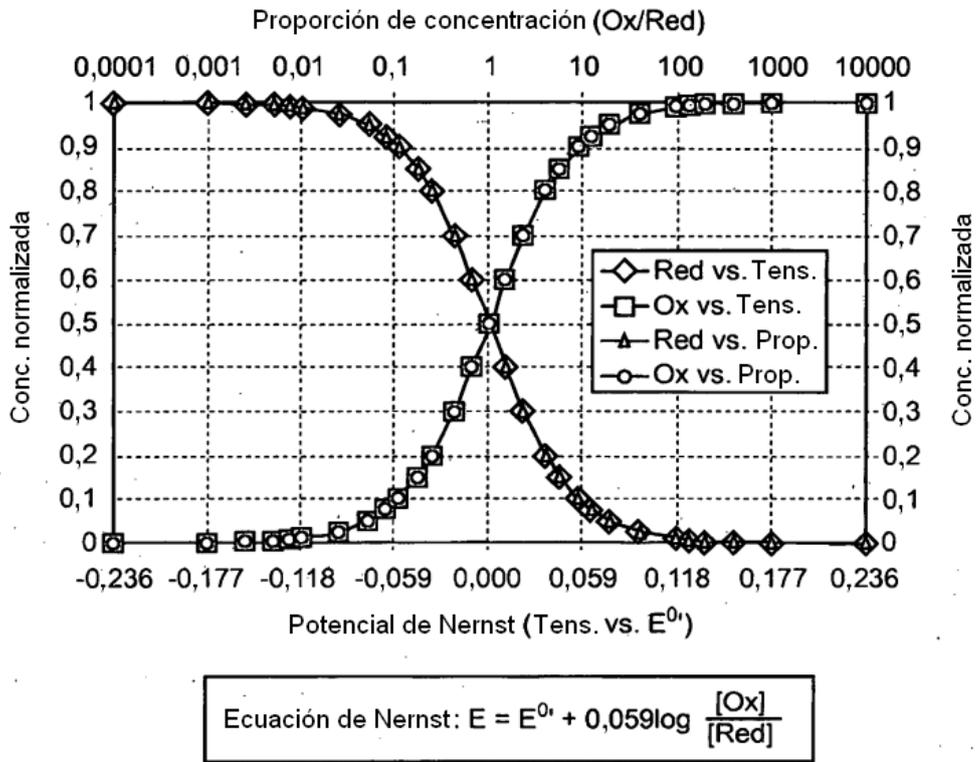


Fig.10C

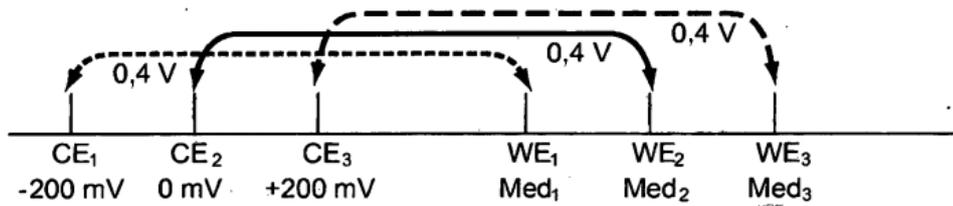


Fig.10D

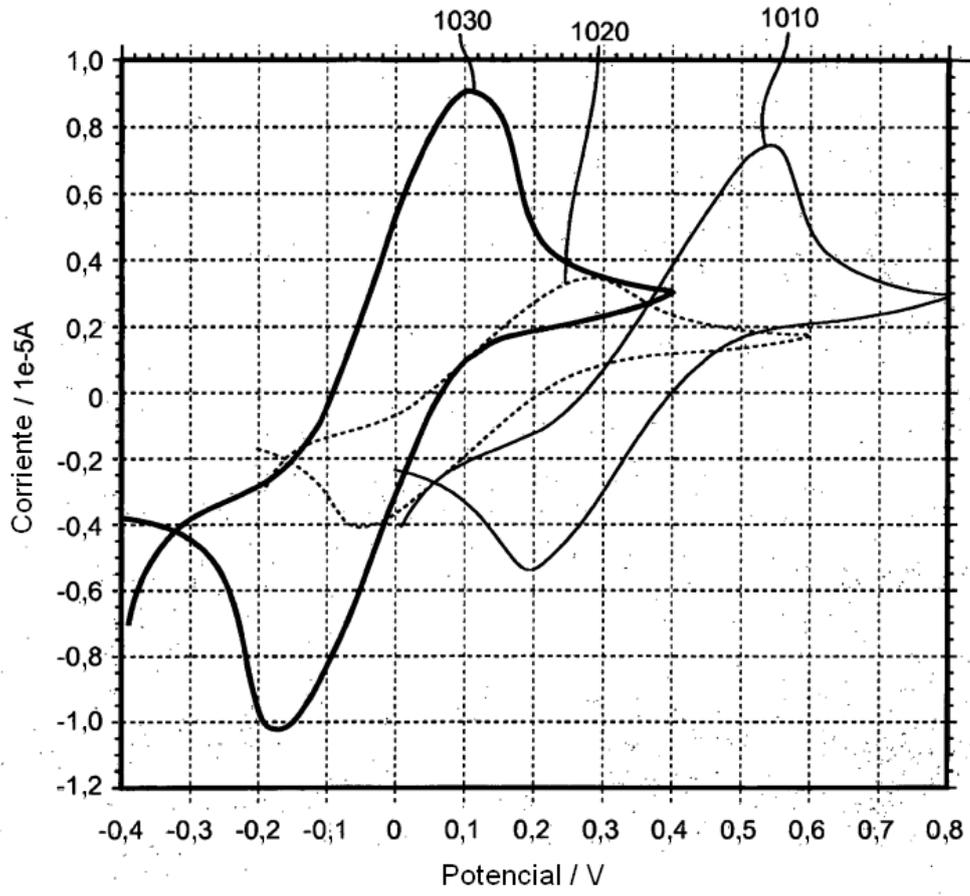
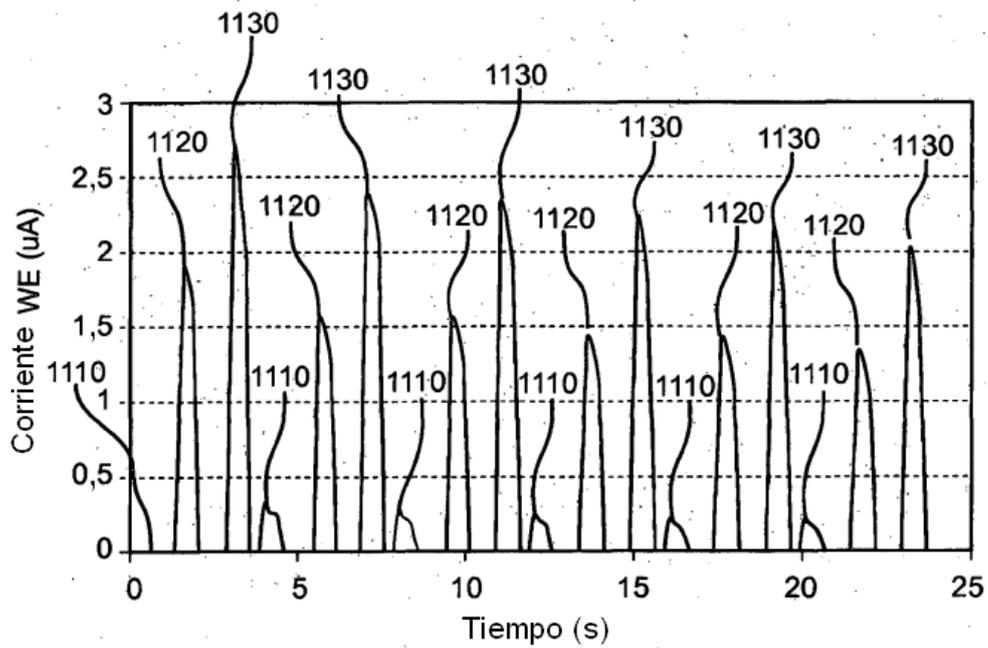
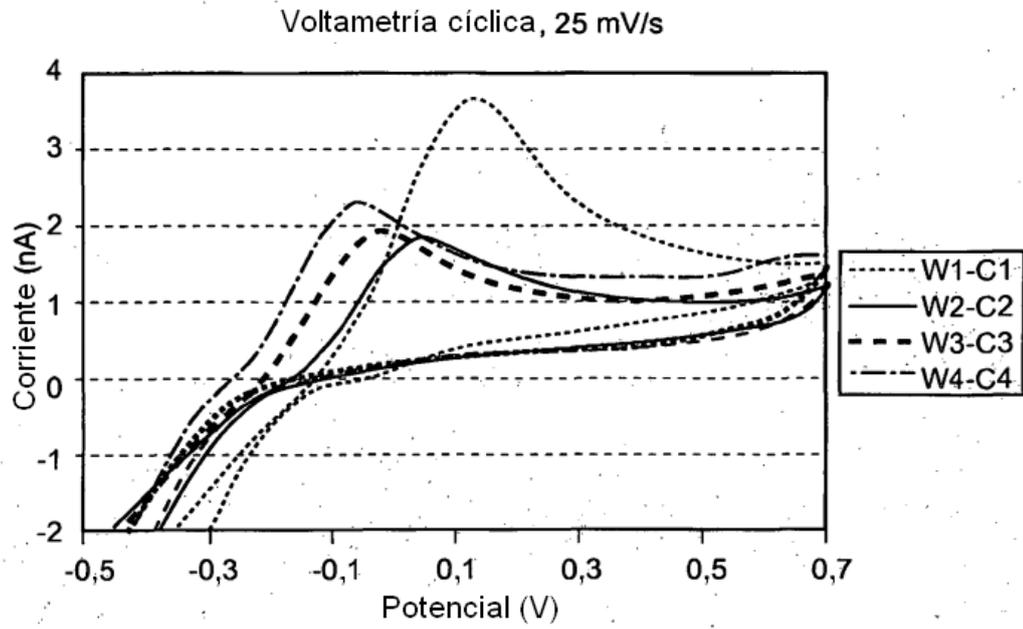


Fig.10E



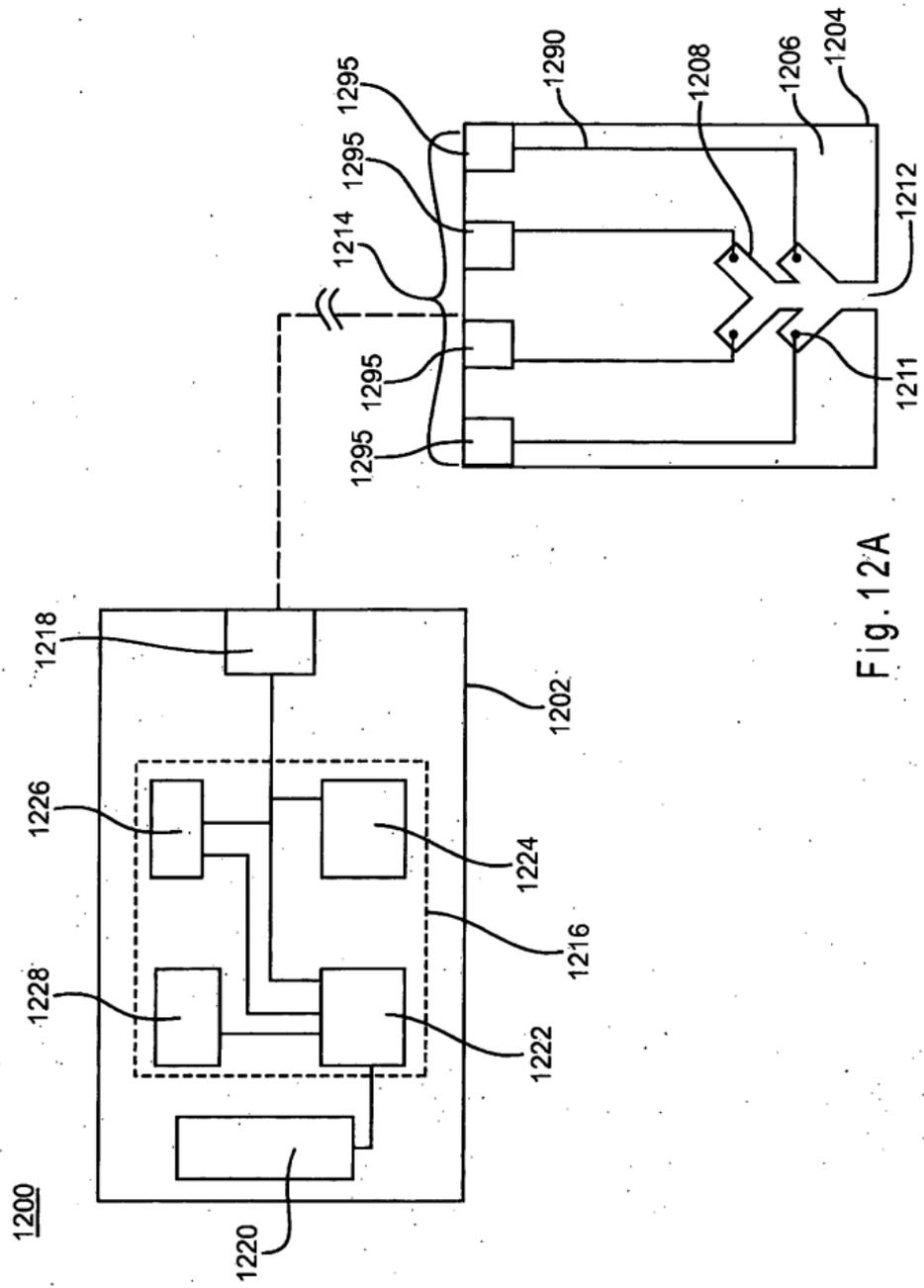


Fig. 12A

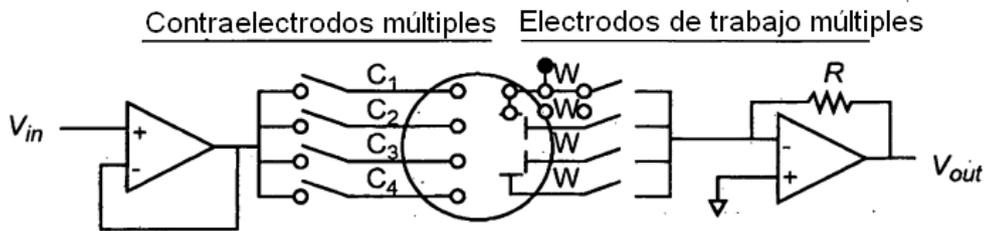


Fig.12B

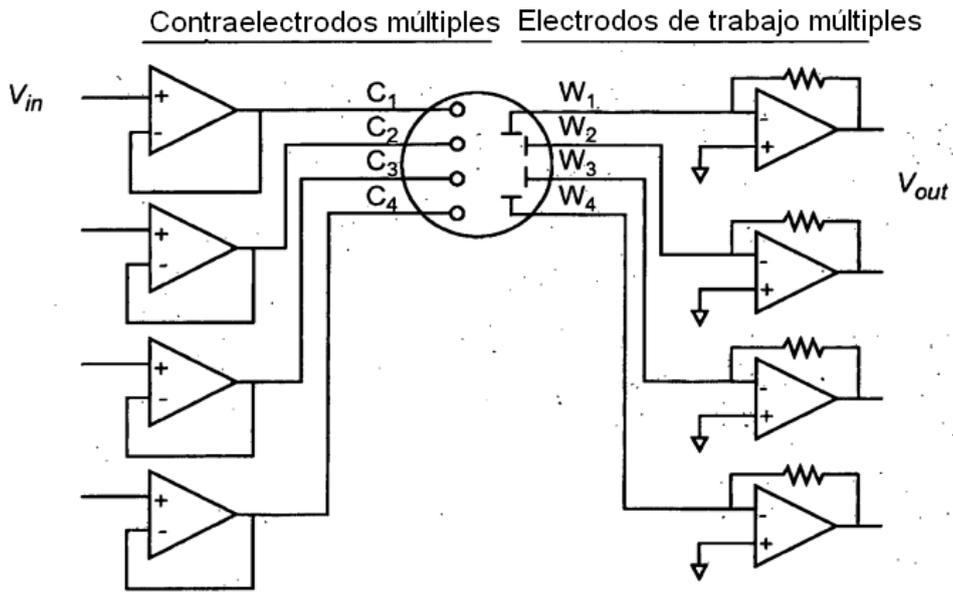


Fig.12C

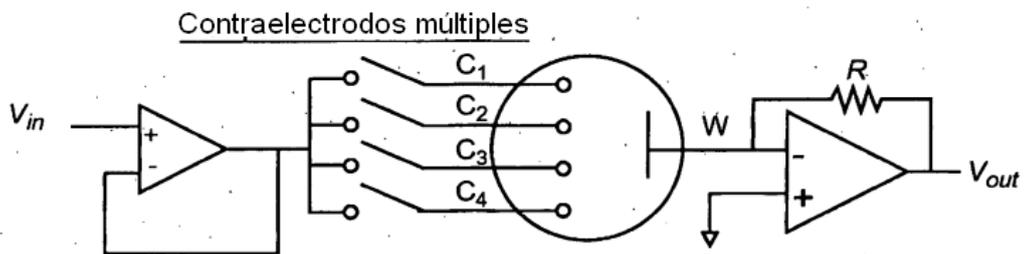


Fig.12D

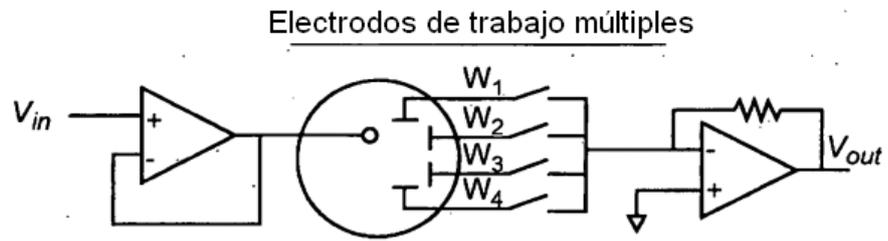


Fig.12E

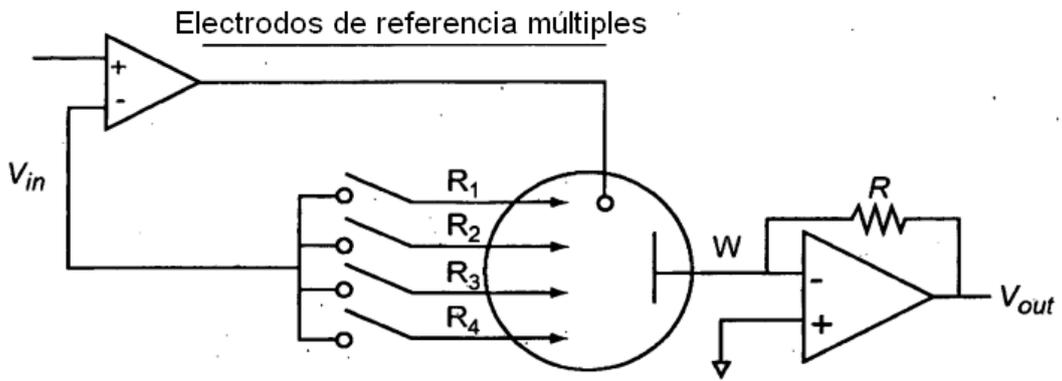


Fig.12F

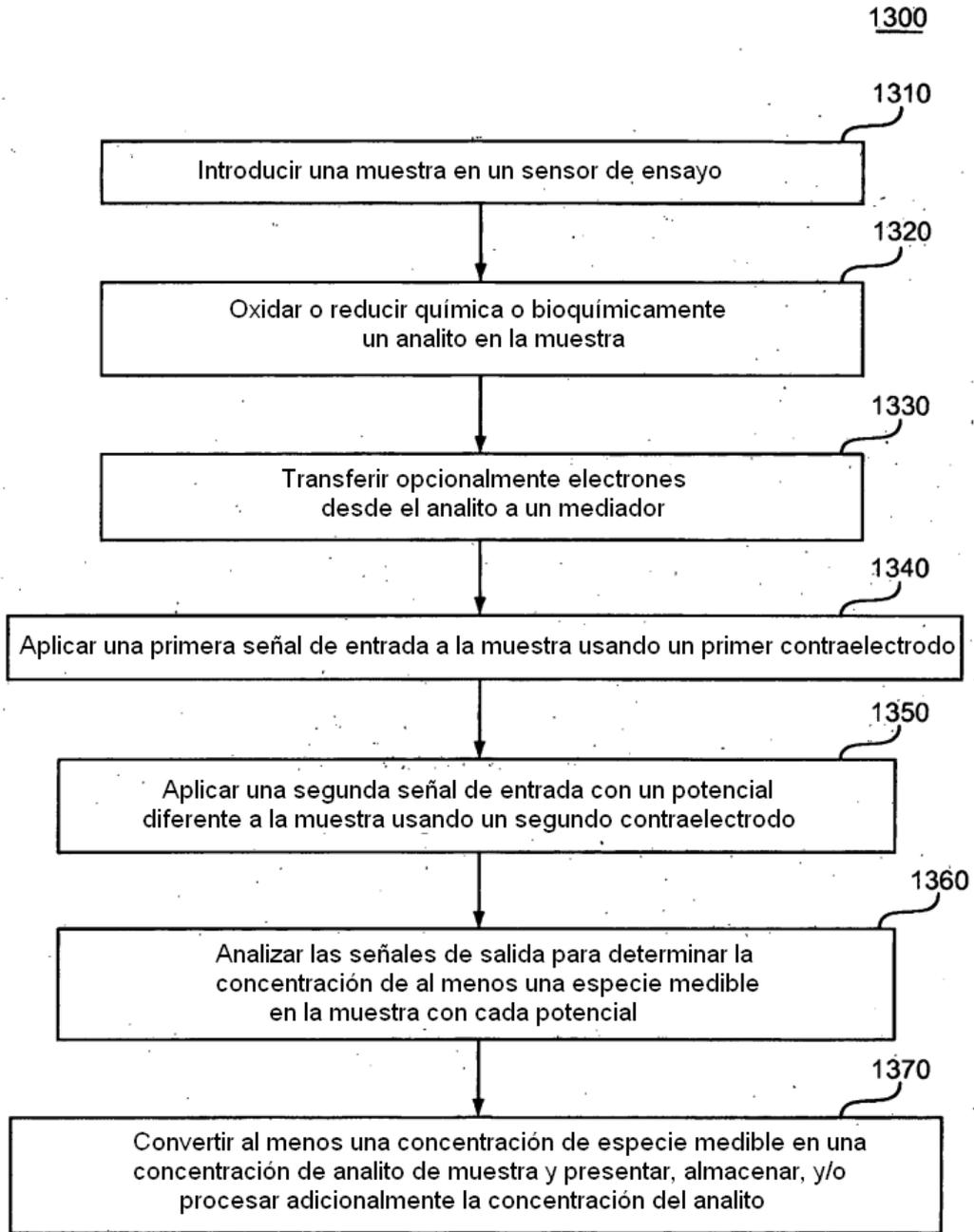


Fig.13

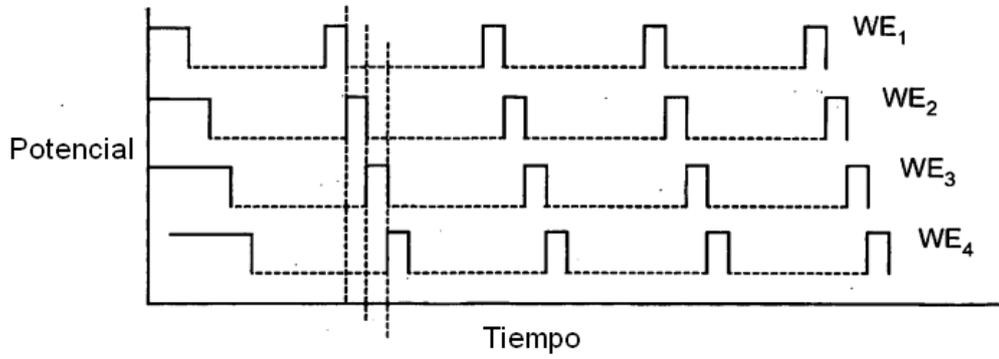


Fig.14A

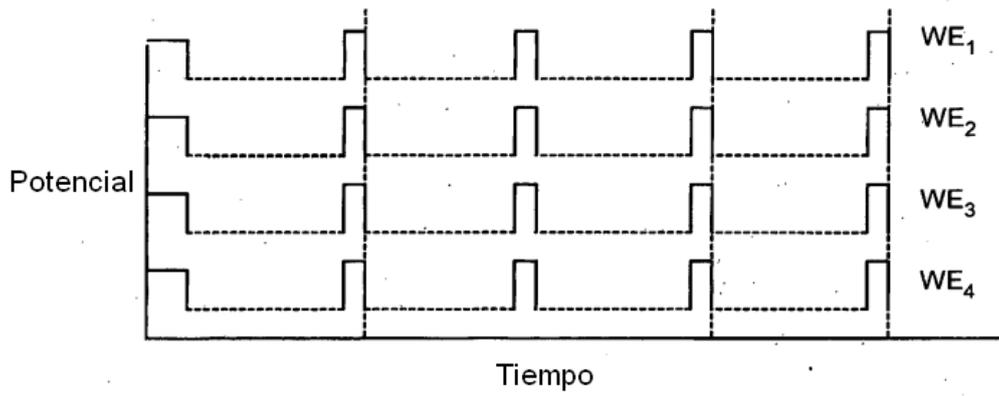


Fig.14B

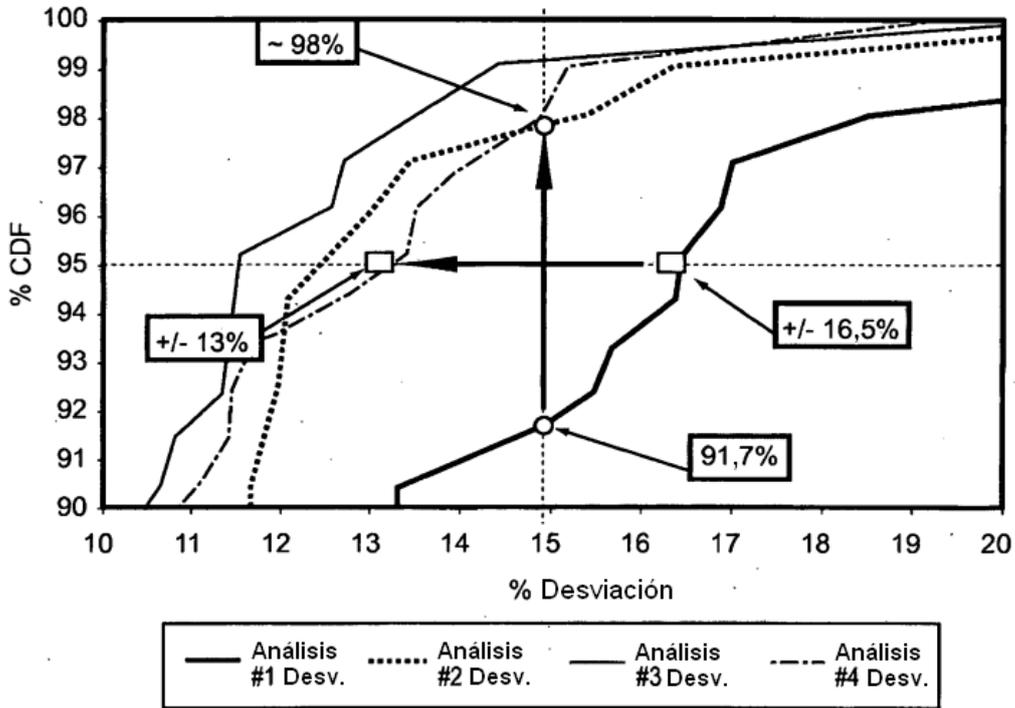


Fig.15

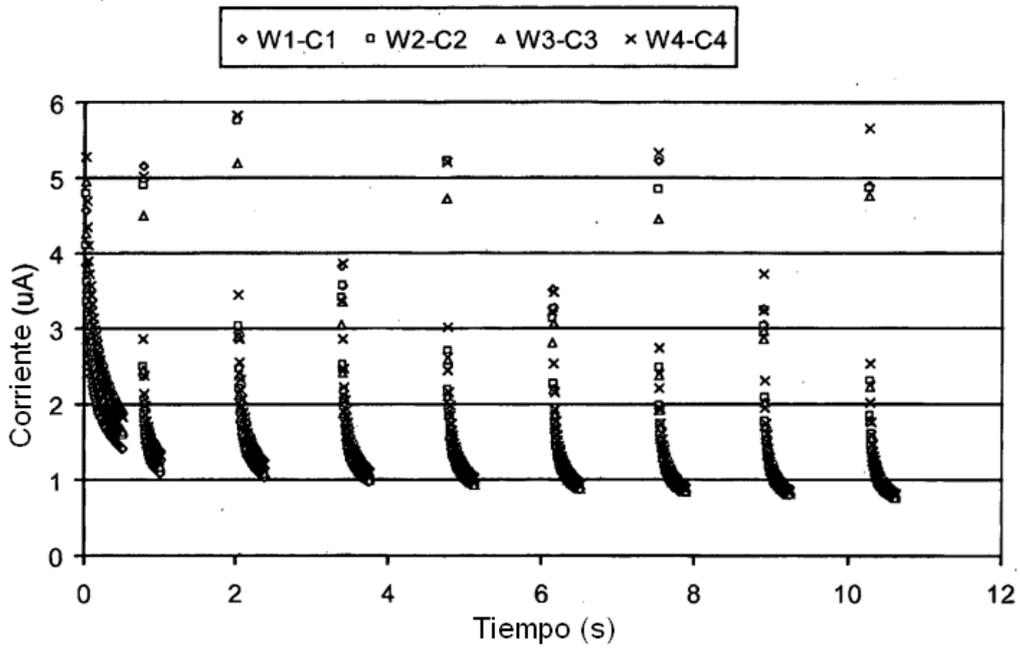


Fig.16