

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 710**

51 Int. Cl.:

G01N 27/333 (2006.01)

G01N 27/416 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2010 E 10724737 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015 EP 2521908**

54 Título: **Sistema de sensor inteligente que utiliza un polímero electroactivo**

30 Prioridad:

07.01.2010 EP 10150280

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.12.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN (100.0%)
Cellule de Liaison Recherche Et Developpement
Place de l'Université 1
1348 Louvain-la-Neuve, BE**

72 Inventor/es:

**YUNUS, SAMI;
BERTRAND, PATRICK y
ATTOUT, ANNE**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 554 710 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

Sistema de sensor inteligente que utiliza un polímero electroactivo.

Campo de la invención

5 La invención se relaciona con el campo de sistemas para medir un pH de solución que comprende un potencióstato con un electrodo de trabajo hecho de un transductor de polímero sólido electroconductor.

Antecedentes de la invención

Los sensores basados en actividad electroquímica de un transductor de polímero sólido electroconductor tal como polianilina (PANI) o polipirrol están consiguiendo una creciente atención en la comunidad científica debido a sus numerosas ventajas.

10 La polianilina es un material muy conveniente cuando se utiliza como un transductor electroquímico sólido debido a sus muchas combinaciones intrínsecas interesantes de los estados redox y ácido-básico. Este polímero es conocido como estable y altamente conductor en su forma ácida emeraldina.

15 La polianilina también hace posible sensibilizar químicamente, es decir mediante injerto químico o físico, es decir mediante fisiorción, su superficie con agentes bioquímicos naturales o trabajados obtenidos mediante ingeniería con propósitos de biodetección. Como un ejemplo, algunas enzimas son bien conocidas por liberar protones de sus hidrólisis específicas de sustrato, esto permite desarrollar sensores basados en un mediador de enzima que libera protones.

20 En este contexto, el estado de protonación de la polianilina afecta de manera notoria el equilibrio entre sus estados redox. Este material se puede caracterizar electroquímicamente para indicar el pH de una solución acuosa. De hecho, una simple medición de potenciometría de un electrodo de trabajo cubierto con polianilina contra un electrodo de referencia despliega un comportamiento simple nernstiano como una función de la concentración de protones. Este simple sistema, similar a un electrodo de pH combinado convencional, se puede visualizar como una celda de batería que tiene una carga limitada y que produce su propia diferencia de potencial proporcional al pH.

25 Las dos mediciones de potenciometría de electrodos son pasivas: ocurre una constante descarga de la celda, a través de su resistencia interna y a través del voltímetro que mide la alta impedancia. Esto puede en algunos casos, originar una alteración no deseada de los estados redox de la polianilina y origina una deriva en los potenciales medidos. Es como si los electrodos de referencia y de trabajo fueran halando su potencial electroquímico el uno hacia el otro para anular su diferencia mediante un pequeño intercambio de corriente a través de la solución y la impedancia interna del instrumento de medición. Este efecto inconveniente puede ser fácilmente considerado despreciable al utilizar electrodos de trabajo con superficie grande, incrementando así la carga disponible, pero puede sin embargo evitar de manera completa la medición confiable a escalas micro y nano. Más aun, la impedancia electroquímica de la polianilina varía simultáneamente como una función tanto del pH como de su potencial electroquímico.

35 Por estas razones, y por razones de simplicidad, los sensores electroquímicos, que se suponen van a ser utilizados más de una vez o durante largos periodos de tiempo favorecen el uso del accionamiento continuo durante la detección en lugar de un protocolo suplementario diferido para el reinicio electroquímico o la recarga. En un sensor activo ideal, el canal de accionamiento tiene que controlar, como mejor pueda, algunas propiedades fisicoquímicas de interface tales como las actividades redox, ácido-básico y dieléctrica. Este accionamiento se hace con el fin de mantener las propiedades del transductor tan sin cambios como sea posible aunque observando al mismo tiempo como el sistema procede a hacerlo así en su control de retroalimentación. Más aun, en un arreglo de sensor diferentes actuaciones podrían conducir a una selectividad que siente o a una sensibilidad o precisión, iniciando desde micro o nano sensores inicialmente idénticos.

40 Un equipo bien conocido por investigar los mecanismos de reacción relacionados con la química redox y otros fenómenos químicos es el potencióstato. Un potencióstato es un dispositivo de control y medición que utiliza tres electrodos: un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un contraelectrodo. El uso básico de un potencióstato consiste en considerarlo como un circuito eléctrico que controla el potencial a través de la celda al detectar cambios en su impedancia, variando de acuerdo con esto la corriente suministrada al sistema: una mayor impedancia dará como resultado una corriente disminuida, mientras que una impedancia menor dará como resultado una corriente creciente, con el fin de mantener el voltaje constante. Como resultado, la impedancia del sistema variable y la corriente controlada son inversamente proporcionales.

$$I_o = \frac{E_c}{R_v}$$

Donde, I_o es la corriente eléctrica de salida del potencióstato, E_c es voltaje de entrada que se mantiene constante y R_v es la impedancia eléctrica que varía.

5 El potencióstato, Figura 1, en su arquitectura convencional requiere así una señal E_c de entrada, que es la diferencia de potencial a ser aplicada entre el electrodo W de trabajo y el electrodo R de referencia. Entonces, el potencióstato genera una señal U_{salida} de salida que es proporcional a la magnitud del flujo de corriente entre el contraelectrodo C y el electrodo W de trabajo. El flujo de corriente sirve para mantener el electrodo W de trabajo en el potencial deseado contra el electrodo de referencia. Este sistema puede ser considerado con las imbricaciones de amplificadores operacionales (circuito integrado, IC) en un ciclo de retroalimentación análogo. En el esquema de la Figura 1, A1 se utiliza como un agregador, A2 como un seguidor de voltaje y A3 como convertidor de corriente a voltaje graduado mediante una resistencia R3 seleccionada.

Resumen de la invención

Sería ventajoso lograr un aparato para medir el pH de una solución con un potencióstato en el cual la deriva del electrodo de trabajo de polianilina se controla para obtener mediciones confiables y repetibles.

15 Para encausar mejor una o más preocupaciones, en un primer aspecto de la invención un sistema para medir una solución de pH comprende:

- Un potencióstato que comprende un electrodo de trabajo hecho de un transductor de polímero sólido electroconductor, una entrada para recibir una señal de entrada indicadora del potencial a ser aplicado entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia del potencióstato, y una salida para transmitir una señal de salida indicadora de la magnitud de la corriente que fluye entre un contraelectrodo del potencióstato y el electrodo de trabajo, estando los tres electrodos sumergidos en la solución;
- Un procesador digital conectado a un convertidor digital análogo para generar la señal de entrada del potencióstato; y un convertidor análogo digital para recibir un valor digital representativo de la señal de salida del potencióstato.

25 El procesador digital se adapta para modificar la señal de entrada del potencióstato con el fin de mantener la señal de salida dentro de un rango predeterminado de tal manera que el potencial de señal de entrada sea representativo del pH de la solución cuando la señal de salida está dentro del rango predeterminado.

En una realización particular:

- El electrodo de trabajo se hace de polianilina o polipirrol;
- El rango predeterminado se centra en cero;
- El potencióstato comprende un amplificador operacional que tiene una entrada conectada al electrodo de trabajo, la salida del amplificador operacional que genera la señal de salida y dicho amplificador operacional que se monta en paralelo con una resistencia para actuar como un convertidor de corriente a voltaje graduada por la resistencia, siendo la resistencia alta o infinita para limitar la corriente mediante saturación del amplificador operacional; y/o
- La resistencia se modifica en un rango que evita la saturación del amplificador operacional y el rango predeterminado de la señal de salida es externo a cero de tal manera que el estado redox del transductor de polímero sólido electroconductor se modifica por un flujo de corriente.

40 Dependiendo del tipo de medición, se puede preferir una realización particular que sea fácil de adaptar o que de un mejor resultado. Sin embargo, aspectos de estas realizaciones particulares se pueden combinar o modificar según sea apropiado o se desee.

En un segundo aspecto de la invención un sistema para detectar moléculas biológicas comprende un sistema como se mencionó anteriormente, en donde el transductor de polímero sólido electroconductor está sensibilizado por un mediador de enzima que libera protones.

En una realización particular el mediador de enzima que libera protones comprende una enzima β -lactamasa.

En un tercer aspecto de la invención, el método mide el pH de una solución con un potencióstato, el potencióstato que comprende un electrodo de trabajo hecho de un transductor de polímero sólido electroconductor, una entrada para recibir una señal de entrada indicadora del potencial a ser aplicado entre el electrodo de trabajo y un electrodo de referencia del potencióstato, y una salida para transmitir una señal de salida indicadora de la magnitud de la corriente que fluye entre un contraelectrodo del potencióstato y el electrodo de trabajo, los tres electrodos estando sumergidos en la solución. El método comprende:

- Generar la señal de entrada;
- Detectar la señal de salida;
- Modificar la señal de entrada para mantener la señal de salida dentro de un rango predeterminado de tal manera que el potencial de la señal de salida sea representativo del pH de la solución cuando la señal de salida está dentro del rango predeterminado.

En un cuarto aspecto de la invención, un producto de software de ordenador almacenado en un medio de grabación comprende un conjunto de instrucciones para posibilitarle al ordenar practicar el método anterior cuando el ordenador ejecuta un conjunto de instrucciones.

Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes y elucidados con referencia a la realización descrita a continuación donde:

- La Figura 1 es una vista esquemática de un potencióstato de acuerdo con la técnica anterior;
- La Figura 2 es una vista esquemática de un sistema de acuerdo a una realización de la invención;
- La Figura 3 es un diagrama de flujo de un primer método para controlar el sistema de la Figura 2;
- La Figura 4 es un diagrama de flujo de un segundo método para controlar el sistema de la Figura 2;
- La Figura 5 es una foto de electrodos milimétricos utilizados en el sistema de la Figura 2;
- Las Figuras 6A, 6B y 6C son vista de una disposición de electrodos interdigitados micrométricos donde la Figura 6A es una microfotografía del chip completo, la Figura 6B es una ampliación microscópica óptica de un conjunto de electrodos interdigitados en los cuales el electrodo más oscuro está cubierto con polianilina; y la Figura 6C es una ampliación de microscopía electrónica de exploración en la cual el electrodo más oscuro está cubierto con polianilina;
- La Figura 7A es un diagrama de electrosíntesis de polianilina en el periodo A y la posterior detección sobre un conjunto de electrodos milimétricos en los periodos B y C
- La Figura 7B es una ampliación de la curva de la Figura 7A durante un periodo B y C;
- La Figura 8 es un diagrama de la señal del potencial para detecciones sucesivas de pH 4 y pH 10 que utilizan dos algoritmos de las Figuras 3 y 4 que utilizan el conjunto de electrodos de la Figura 5
- La Figura 9 es un diagrama del potencial de la polianilina como una función del pH obtenido con el sistema de la Figura 2 y con un voltímetro simple, un electrodo de referencia comercial y el mismo electrodo de trabajo de la Figura 5;
- La Figura 10 es un diagrama del potencial y de las detecciones de señales de corriente para pH 4, 7 y 10 que utilizan el algoritmo de la Figura 4;
- La Figura 11A es un diagrama de las señales de potencial para las detecciones de pH 4, 7 y 10 que utilizan el electrodo de trabajo de la Figura 5;
- La Figura 11B es un diagrama de las señales de potencial para las detecciones de pH 4, 7 y 10 que utilizan los electrodos de trabajo de la Figura 6;
- La Figura 12A es un diagrama de las señales de potencial y corriente para las detecciones de pH 4, 7 y 10, que muestran la influencia del pH sobre la magnitud de la corriente alterna medida;

- La Figura 12B es una ampliación de las mediciones de las Figuras 12A en pH=10; y
- La Figura 13 es un diagrama de las detecciones de señales de potencial, que muestran una variante de realización.

5 En referencia a la Figura 2, un potencióstato 1 comprende una celda 3 de tres electrodos: un electrodo W de trabajo, un electrodo R de referencia y un contraelectrodo C.

10 El contraelectrodo C está conectado a la salida de un amplificador 5 operacional del cual una entrada se conecta a tierra y la segunda entrada se conecta a través de la resistencia 7 a un conector 9 de entrada. Un segundo amplificador 11 operacional tiene una primera entrada conectada al electrodo R de referencia y su segunda entrada conectada a su salida y, a través de la segunda resistencia 13, a la segunda entrada del primer amplificador 5 operacional. El electrodo W de trabajo se conecta a una primera entrada de un tercer amplificador 15 operacional, la segunda entrada del tercer amplificador operacional está conectada a tierra y su salida está conectada a un conector 17 de salida del potencióstato. Un selector 19 de resistencia denominado aquí como multiplexor, está conectado en paralelo a un tercer amplificador 15 operacional al electrodo W de trabajo y al conector 17 de salida.

15 Un ordenador 21 comprende un procesador 23 digital conectado a un convertidor DAC 25 digital a análogo y a un convertidor ADC 27 análogo a digital. El DAC está conectado a un conector 9 de entrada del potencióstato 1 y el ADC a su conector 17 de salida.

El ordenador 21 comprende además una pantalla 29 de datos.

20 El procesador 23 define un valor de señal de entrada para ser generado por el DAC 25 como una señal de entrada del potencióstato 1 que es la diferencia en potencial a ser aplicada entre el electrodo W de trabajo y el electrodo R de referencia. Luego, el potencióstato genera una señal de salida que es proporcional a la magnitud de flujo de corriente entre el contraelectrodo C, y el electrodo W de trabajo. El flujo de corriente sirve para mantener el electrodo de trabajo en el potencial deseado. El primer amplificador 5 operacional se utiliza como un agregador, el segundo amplificador 11 operacional como un seguidor de voltaje, y el tercer amplificador 15 operacional como un convertidor de corriente a voltaje graduado mediante una resistencia 19 seleccionado.

25 El ordenador 21 actúa como un ciclo de retroalimentación suplementario entre la entrada y la salida del potencióstato. El objetivo de este ciclo de retroalimentación es mantener la señal de salida en un rango predeterminado al actuar sobre la señal de entrada. En esta configuración el ciclo de retroalimentación tiene que regular el potencial de trabajo aplicado como una función de la corriente medida.

30 El procesador puede ejecutar diferentes algoritmos que permitan el control de retroalimentación. Como un ejemplo en la Figura 3, el procesador aplica un potencial P_i de trabajo arbitrario sobre el potencióstato etapa 31. Esta acción dará como resultado un flujo de corriente en el electroquímico I_0 medido en la etapa 33. El potencial P_i de trabajo aplicado se puede incrementar o disminuir con un valor dS constante para iterativamente aproximar un flujo I_{0tar} de corriente deseada, etapa 35: si el flujo I_0 de corriente está por encima del valor I_{0tar} deseado, el potencial P_i se disminuye mediante dS y si el flujo I_0 de corriente es menor que el valor I_{0tar} deseado, el potencial P_i se incrementa mediante dS.

35 El diagrama de flujo de la figura 4 es un algoritmo diferente que consiste en un incremento variable o en etapas de disminución para un asentamiento de equilibrio más rápido. El disminución/incremento de la variable se define como un múltiplo de 1.4. El procesador aplica un potencial P_i de trabajo arbitrario sobre el potencióstato, etapa 41. Esta acción dará como resultado un flujo de corriente en la electroquímica I_0 medida en la etapa 43. El potencial P_i de trabajo aplicado se puede entonces incrementar, o disminuir con un valor variable múltiple de dS para aproximar iterativamente a un flujo I_{0tar} de corriente deseado, etapa 45: si el flujo I_0 de corriente está por encima del valor I_{0tar} deseado, el factor de incremento Inc es restablecido a 1 y el potencial P_i es disminuido por $Dec \cdot dS$, luego Dec se incrementa por un factor 1.4 y si el flujo I_0 de corriente es menor que el valor I_{0tar} deseado, el factor Dec de disminución se restablece a 1 y el potencial P_i se incrementa por $Inc \cdot dS$, luego Inc se incrementa por un factor 1.4.

45 Si un resistor infinito se selecciona en el multiplexor, el convertidor 15 de corriente a voltaje se saturará y limitará la corriente entre los contraelectrodos y los electrodos de trabajo para la pérdida de corriente intrínseca del amplificador operacional, es decir, típicamente 10 a 100 pA para amplificadores operacionales comunes. El convertidor 15 de corriente a voltaje alcanzara entonces una ganancia cuasi infinita y mayormente dará dos valores extremos que indican si el potencial aplicado es mayor o menor que el potencial de equilibrio del electrodo de trabajo de polianilina. En esta configuración, con un $I_{0tar} = 0$, el potencióstato actúa como un comparador de voltaje discreto que permite generar la detección del pH potenciométrico simple con polianilina u otro electrodo de trabajo electroactivo. Debido a las resoluciones instrumentales finitas (ADC y DCA) y el método real, las señales de voltaje y corriente primero evolucionaran, luego oscilaran alrededor del voltaje real del electrodo de trabajo y la corriente nula respectivamente. En ese momento, si un valor del resistor inferior se selecciona en el multiplexor, con el fin de mantener el convertidor de corriente a voltaje por debajo de la saturación la proporción de amplitud y la diferencia de fase entre el voltaje y las

oscilaciones de corriente serán indicadoras de la impedancia de la celda electroquímica. De hecho, una medición EIS típica (Espectroscopia de Impedancia Electroquímica) consiste en aplicar una oscilación de amplitud de voltaje pequeña (señal de excitación) a la celda electroquímica y medir la oscilación de corriente resultante (señal de respuesta). La impedancia de la celda es la característica electroquímica que relaciona el voltaje y las señales de corriente. El método real puede así ser utilizado para medir el potencial electroquímico y las características de impedancia electro químicas de la celda a la vez.

Experimentos que muestran la efectividad del potencioestado descrito aquí anteriormente se describen ahora.

El potencioestado es hecho en casa y es controlado por ordenador por vía de una tarjeta de control y adquisición multipropósito en NIDAQ USB-6009 de National Instrument. Los programas son construidos y compilados con Microsoft VisualBasic 5.0.

Se prueban dos tipos de arquitecturas de celda electroquímica.

El primer tipo de celda electroquímica es un poso de 200 μL que contiene tres electrodos de película dorada impresos en un área circular de un diámetro de 6 mm, Figura 5. La plataforma es una resina fenólica que es comúnmente utilizada como un sustrato para circuitos impresos de cobre sobre tarjeta (PCB).

Iniciando desde la tarjeta revestida de cobre foto sensibilizada estándar, estos electrodos se obtienen mediante técnicas de realización de circuito impreso clásico sobre tarjeta (PCB). Como polianilina no puede ser electro sensibilizada fácilmente sobre cobre, la capa de cobre es primero grabada al agua fuerte en la forma de una máscara de sombra para el diseño del electrodo real. La realización del electrodo se efectúa con el depósito de una capa de 10 nm de titanio que forma una capa de adherencia y 100 nm de capa de oro obtenida después de una evaporación por haz de electrones. Después de la evaporación por haz de electrones, la capa de máscara de cobre se retira utilizando cloruro férrico. Todos los materiales y químicos para la realización del PCB son comprados en componentes RS.

El electrodo 50 de referencia se obtiene al aplicar una mancha 52 pequeña de amalgama Ag/AgCl sólida (composición de cloruro plata/plata 5874 de Dupont). Este electrodo de referencia Ag/AgCl sólido se ha revisado por su estabilidad, repetibilidad y confiabilidad en diferentes configuraciones de medición desde pH 2 a 12. Esta referencia despliega un potencial de electrodo 100 mV mayor (~ 300 mV vs. SHE) que el electrodo de referencia comercial (~ 197 mV vs SHE).

La capa de polianilina en el electrodo 54 de trabajo se puede obtener mediante voltamperometría cíclica o mediante una aplicación de corriente constante. El electrodo 54 de trabajo de polianilina representado en la Figura 5 se obtuvo al aplicar 1.5 μA durante 10 minutos en una solución acuosa de anilina 0.2M y 2M HCl utilizando la arquitectura del sensor inteligente presentada. El contraelectrodo 56 se localiza entre el electrodo 54 de trabajo y el electrodo 50 de referencia.

El segundo tipo de celda electroquímica es un poso de 40 μL que contiene nueve conjuntos de electrodos interdigitados micrométricos de platino mostrados en las Figuras 6A, 6B y 6C. El conjunto central es puesto en corto circuito por una pequeña mancha 61 de amalgama Ag/AgCl sólido (Composición de cloruro plata/plata 5874 Dupon). Este conjunto se ha revisado también por su estabilidad y repetibilidad como electrodo de referencia en diferentes configuraciones de medición de pH 2 a 12.

Los ocho conjuntos restantes son utilizados como parejas de contraelectrodos y electrodos de trabajo. Los contraelectrodos 63 se conectan juntos de tal manera que el sistema contiene solo una referencia común, con un contraelectrodo común y ocho electrodos 65 individuales de trabajo.

Estos electrodos de platino (5 nm Ti, 100 nm Pt) se producen mediante técnicas de evaporación y fotolitografía usuales sobre una capa de SiO₂ de 100 nm de grueso obtenida mediante oxidación en seco de un sustrato de silicio de 360 μm de grueso. Los electrodos de 6 μm de ancho (2*21 dígitos) están espaciados por 6 μm e interdigitados sobre una superficie cuadrada de 500*500 μm^2 . Con propósitos de detección en las soluciones acuosas, las pistas eléctricas son aisladas de líquido por medio de una capa de 500 nm de grueso de nitruro de silicio visible en las Figuras 6A y 6B. Esta capa se obtiene mediante una deposición de vapor químico mejorada con plasma a 250°C.

La capa de polianilina sobre los electrodos de trabajo interdigitados se puede obtener mediante voltamperometría cíclica o mediante una aplicación de corriente constante. El electrodo de trabajo de polianilina visible en las Figuras 6B y 6C se obtiene al aplicar 0.15 μA durante 5 minutos en una solución acuosa de anilina 0.2M y HCL 2M utilizando el sistema presentado.

Las diferentes soluciones amortiguadoras de pH para detectar pH se obtuvieron utilizando recetas que FIXANAL de Riedel de Hean Company. La conductividad de todas estas soluciones se ajustó a 11 mS utilizando soluciones de KCL y un conductímetro Hanna HI255.

La anilina se destilo dos veces bajo presión reducida con argón antes de uso.

Todos los químicos fueron adquiridos en Aldrich Chemicals.

La electrosíntesis y las mediciones se efectuaron a temperatura ambiente.

Las mediciones de potenciometría clásica se efectuaron utilizando el electrodo de trabajo PANI y milimétrico, un electrodo de referencia Ag/AgCl comercial HI 1083 de Hanna Instruments y un voltímetro Keithley 2000.

- 5 La figura 7A muestra un experimento completo que comprende electrosíntesis de polianilina y la posterior detección sobre una configuración de electrodo milimétrico que utiliza el mismo algoritmo núcleo descrito en relación con la Figura 4 con un $dS = 1 \mu V$ y una iteración cada 100 ms. La Figura 7B es una amplificación del periodo B, C y de la corriente medida. La curva 71 muestra el potencial de entrada con su escala sobre el lado izquierdo y la curva 73 muestra la corriente de salida con su escala sobre el lado derecho.
- 10 Durante el periodo A, la polianilina se electrosintetiza, utilizando el algoritmo mostrado en la Figura 4, manteniendo la corriente de la señal de salida en un objetivo de $1.5 \mu A$ y utilizando un resistor de carga de 10 KOhms en el multiplexor 19. La electrosíntesis ocurre a un potencial de ~ 0.75 voltios vs la referencia de Ag/AgCl sólida. Después de 10 minutos la electrosíntesis de polianilina, periodo de B, el registrador de carga es cambiado a infinito y el objetivo se establece a cero. El potencial de equilibrio del electrodo de trabajo PANI en su solución de síntesis se encuentra a ~ 0.7 voltios.
- 15 Durante el periodo C, se reemplaza la solución de síntesis mediante una solución amortiguadora a pH 4. El potencial de equilibrio del electrodo de trabajo de polianilina alcanza ~ 0.37 voltios, indicando el funcionamiento adecuado del dispositivo como un sensor de pH.

20 La curva de corriente de la Figura 7B ilustra de manera clara el potencióstato que actúa como un comparador de voltaje discreto: como el resistor elegido es infinito, la corriente que pasa a través del electrodo de trabajo se limita a la pérdida de corriente intrínseca del amplificador operacional. Por esta razón, la corriente curvada mostrada en la Figura 7B es la salida del convertidor de corriente a voltaje (es decir $-5V$ a $5V$) graduada con la especificación del fabricante de pérdida de corriente intrínseca del amplificador operacional (~ 10 pA). Es interesante notar que este tipo de señal podría ser directamente utilizada como una señal codificada binaria para la reducción del tamaño de datos. De hecho, ya que el algoritmo es conocido la curva de potencial se puede reconstruir utilizando esta señal de corriente discreta con una

25 operación digital simple.

La Figura 8 ilustra la diferencia en las señales 81 y 83 de potencial medido utilizando los algoritmos propuestos en las Figuras 3 y 4, respectivamente. Las dos curvas se han obtenido al cambiar sucesivamente la solución amortiguadora entre pH 4 (~ 0.36 V) y pH 10 (~ 0.1 V) con un algoritmo de iteración cada 100 ms, un resistor de carga infinito y una corriente de salida objetivo nula. La curva punteada se obtuvo con una etapa de voltaje de incremento y disminución fija de $dS = 1$ mV (algoritmo de la Figura 3), mientras que la curva sólida se obtuvo con un incremento variable y una etapa de voltaje disminuida con $dS = \mu V$ (algoritmo de la Figura 4).

30

De la Figura 8, es claro que el tipo de algoritmo tiene su importancia en la velocidad de detección o el tiempo requerido para que el sistema electrónico alcance un estado de cuasi equilibrio. Pero más importante este puede tener una influencia muy fuerte si el resistor multiplexor no es infinito, y de hecho, en un instrumento real, el resistor nunca puede ser realmente infinito.

35

En la Figura 9, la respuesta nerstiana de la polianilina hacia el pH obtenido con el sistema descrito, curva 91, se compara con una detección de voltímetro simple con un electrodo de referencia comercial y el mismo electrodo milimétrico PANI, curva 93.

40 Como se observa en la Figura 9, los experimentos con el sensor inteligente y el potenciómetro clásico despliegan pendientes muy cercanas de -74 y -70 mV/pH respectivamente y unas desviaciones estándar muy equivalentes. El desfase observable de aproximadamente 100mV entre los dos experimentos es solo debido al uso de diferentes tipos de electrodos de referencia Ag/AgCl como se explicó aquí anteriormente.

45 El arreglo de los electrodos interdigitados micrométricos ha sido entonces considerado. La proximidad del contraelectrodo a cada uno de los ocho electrodos de trabajo y su escala micrométrica ha sido intuitivamente seleccionada para el confinamiento de las corrientes eléctricas en volúmenes separados muy pequeños de la misma muestra. En esta configuración de celda electroquímica, las mediciones de potenciómetro clásicas como una función del pH utilizan solamente los electrodos de trabajo y los electrodos de referencia sólidos, que utilizan solo los electrodos de trabajo y los electrodos de referencia sólida, se han encontrado difíciles de reproducir. La proximidad y el tamaño reducido de estos electrodos es responsable de una descarga constante de la celda electroquímica: La diferencia en el

50 potencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia tiende a cancelarse tal como se observa en la Figura 10 que utiliza el sistema descrito aquí anteriormente y un conjunto de electrodos interdigitados micrométricos como en la Figura 6A. Las oscilaciones rápidas, la señal de corriente indican claramente los periodos de cuasi equilibrio.

La influencia del algoritmo se puede observar sobre el comportamiento de la celda en el caso de los electrodos micrométricos en los cuales una corriente muy baja puede cambiar rápidamente los estados redox PANI. En la Figura 10, la curva 101 de potencial de la señal de entrada y la curva 103 de corriente de la señal de salida de corriente son dibujadas para tres diferentes mediciones de pH a pH 4, 7 y 10. Cada periodo 105 de medición es precedido por un periodo 107 de activación. El algoritmo de la Figura 3 se encontró que produce un ruido reducido cuando se comparó con el algoritmo de la Figura 4. De la figura 10, un algoritmo simple podría disminuir la iteración de actuación durante el estado de cuasi equilibrio electrónico para mantener el nivel de carga de polianilina más constante.

Sin embargo, el algoritmo de la Figura 4 permitió efectuar un barrido de pH más rápido y así reducir el efecto de descarga constante tal como se observó en la Figura 11A, que muestra la curva 110 de potencial para las detecciones de pH 4, 7 y 10 utilizando el electrodo de trabajo de las Figuras 5 y en la Figura 11 B que muestra un arreglo de las curvas 111 de potencial para detecciones de Ph 4, 7 y 10 utilizando los electrodos de trabajo de la Figura 6. Las mediciones de la Figura 11B también verifican la reproducibilidad de los ocho sensores paralelos en un arreglo.

Algunas pequeñas discrepancias pueden ser observadas algunas veces entre las mediciones de pH cuando se comparan los voltajes obtenidos en la Figura 8 con aquellos obtenidos en las Figuras 11A y 11B. Esto es la consecuencia de utilizar una amalgama de Ag/AgCl como electrodo de referencia. La amalgama puede dar pequeñas diferencias en el potencial electroquímico debido al envejecimiento de la tinta utilizada. De esta observación, puede ser útil calibrar el sistema completo cuando se mide el pH en una aplicación específica tal como aquella que será descrita posteriormente en la Figura 3.

La Figura 12A ilustra el potencial 120 electroquímico y las mediciones 121 de corrientes asociadas para un electrodo de polianilina sumergido sucesivamente en pH = reguladores 10, 7 y 4 en 11 mS de conductividad.

Durante los remplazos del amortiguador de pH, los intercambios de corriente son deliberadamente restringidos al utilizar un resistor infinito en el convertidor 15 de corriente a voltaje con el fin de limitar las alteraciones redox de la polianilina. Cuando se alcanza un potencial electroquímico estable, se permiten y se miden los intercambios de corriente al utilizar un resistor de 1 MOhm en el convertidor 15 de corriente a voltaje.

Como se observó en la Figura 12A, la magnitud de la corriente alterna medida, que resulta de las alternaciones de voltaje aplicado alrededor del potencial electroquímico de equilibrio real (observable en la Figura 12B), se incrementa globalmente cuando disminuye el pH, tal como se representa por medio de las flechas 122, 123 y 124, respectivamente asociadas con pH=10, pH=7 y pH=4. Esta observación está de acuerdo con el incremento de resistividad de polianilina bien conocido con el pH.

La Figura 12B muestra un agrandamiento de la medición de la Figura 12A a pH=10. Como se puede observar en la Figura 12B, el potencial 130 alterna cada 200 ms (periodo de iteración) con una amplitud seleccionada de 6 mV alrededor del potencial de equilibrio como consecuencia del algoritmo. Para cada iteración, solamente la primera adquisición de corriente se utiliza para aplicar el algoritmo. Estas alternaciones de voltaje bajo de onda cuadrada induce las relajaciones 131 sucesivas de corriente. Estas curvas 131 de relajación de corriente son indicaciones directas de los procesos electroquímicos que tiene lugar en la superficie del electrodo de trabajo (impedancia electroquímica, procesos redox, etc.).

La Figura 13 muestra una variante de realización que utiliza una enzima de β -lactamasa como un sensibilizador. Las enzimas de β -lactamasa pueden hidrolizar los antibióticos a base de β -lactama, tal como la penicilina G, para conducir a una disminución global del pH. El experimento inicia desde ocho electrodos de trabajo prístinos.

Durante el periodo A, los electrodos son sumergidos en anilina 0.2 M, solución acuosa de HCl 2 M y la polianilina es electro sensibilizada utilizando el algoritmo mostrado en la Figura 4. La electrosíntesis ocurre en un potencial de aproximadamente 0.75 voltios vs la referencia Ag/AgCl sólida. Después de aproximadamente 10 minutos de electro síntesis de polianilina, el resistor de carga es cambiado a infinito y la corriente objetivo se ajusta a cero para todos los electrodos. Los potenciales de equilibrio de los electros de trabajo PANI y en sus solución de síntesis disminuyen.

Durante el periodo B, los ocho electrodos son sucesivamente sumergidos juntos en reguladores de pH = 4,7 y 10 con el fin de efectuar una calibración de pH utilizada para ajustar el segundo eje de las ordenadas (eje pH) de la Figura 13.

La medición es luego pausada y cuatro de los electrodos son sumergidos en $1\mu\text{g/ml}$ de la solución amortiguada pH = 7 de β -lactamasa, mientras que los otros son solo mantenidos en un amortiguador puro de pH = 7. Después de esta absorción de enzima, los ocho electrodos son agrupados y la medición se reasume.

Durante el periodo C, se hacen tres detecciones sucesivas 141, 142 y 143 de penicilina G a una concentración de 1 mM. Los electrodos se lavan en un amortiguador pH = 7 entre cada medición. Los cuatro electrodos sensibilizados despliegan una respuesta 144 abrupta a la penicilina, desde pH~7 a pH~5, mientras que los otros potenciales 145

electroquímicos de los electrodos solo se incrementan lentamente como consecuencia de la difusión de protones de los electrodos sensibilizados.

Este ejemplo demuestra las posibles extensiones de los experimentos previos a esquemas de biodetenciones más específicos cuando se utilizan biomarcadores marcados con enzima.

5 Se pueden obtener resultados muy similares sobre varios tipos de electrodos o materiales de electrodos de trabajo (Au, Pt, Pd, C, inox).

10 El método se puede ejecutar mediante un producto de programa de ordenador que es capaz de ejecutar cualquiera de las etapas del método como se describió anteriormente cuando se cargan y corren en medios de ordenador. El programa de ordenador se puede almacenar/distribuir en un medio adecuado suministrado junto con o como parte de otro hardware, pero también se puede distribuir en otras formas, tales como por vía de la internet u otros sistemas de telecomunicación alámbrico o inalámbrico.

Un circuito integrado se puede disponer para efectuar cualquiera de las etapas del método de acuerdo con las realizaciones descritas.

15 Mientras que la invención se ilustrado y descrito en detalle en los dibujos y en la descripción anterior, tal ilustración y descripción va a ser considerada ilustrativa o de ejemplo y no restrictiva; la invención no está limitada a la realización descrita.

20 Otras variaciones de las realizaciones descritas se pueden entender y efectuar por aquellos expertos en la técnica al practicar la dimensión reivindicada de un estudio de los dibujos, la descripción y las reivindicaciones finales. En las reivindicaciones, la palabra "que comprende" no excluye otros elementos y el artículo indefinido "un" o "una" no excluyen una pluralidad.

REIVINDICACIONES

1. Sistema para medir un pH de solución que comprende

• Un potenciostato (1), dicho potenciostato comprende un electrodo (W) de trabajo hecho de un transductor de polímero sólido electroconductor, una entrada (9) para recibir una señal de entrada indicativa del potencial al ser aplicado entre dicho electrodo de trabajo y un electrodo (R) de referencia del potenciostato, y una salida (17) para transmitir una señal de salida indicativa de la magnitud del flujo de corriente entre un contraelectrodo (C) del potenciostato y dicho electrodo de trabajo, dichos tres electrodos se sumergen en dicha solución;

• Un procesador (23) digital conectado a un convertidor (25) digital análogo para generar dicha señal de entrada; y un convertidor (27) análogo digital para recibir un valor digital representativo de la señal de salida; caracterizada porque dicho procesador digital se adapta para modificar dicha señal de entrada para mantener dicha señal de salida dentro de un rango predeterminado de tal manera que el potencial de señal de entrada es representativo del pH de solución cuando dicha señal de salida está dentro de dicho rango predeterminado.

2. Sistema de acuerdo a la reivindicación 1, en donde el electrodo de trabajo se hace de polianilina o polipirrol.

3. Sistema de acuerdo a la reivindicación 1 o 2, en donde dicho rango predeterminado se centra en cero.

4. Sistema de acuerdo a la reivindicación 3, en donde dicho potenciostato comprende un amplificador operacional que tiene una entrada conectada a dicho electrodo de trabajo, la salida del amplificador operacional que genera dicha señal de salida y dicho amplificador operacional están montados en paralelo con una resistencia para actuar como un convertidor de corriente a voltaje grabado mediante dicha resistencia, dicha resistencia es alta o infinita para limitar la corriente mediante la saturación del amplificador operacional.

5. Sistema de acuerdo a la reivindicación 4, en donde dicha resistencia se modifica en un rango que evita la saturación del amplificador operacional y dicho rango predeterminado de señal de salida es externo a cero de tal manera que el estado redox del transductor de polímero sólido electroconductor se modifica por medio de un flujo de corriente.

6. Un sistema de acuerdo a la reivindicación 4, en donde dicha resistencia se modifica en un rango que evita la saturación del amplificador operacional de tal manera que dicha señal de salida oscila dentro de dicho rango predeterminado, la amplitud y fase y de dichas oscilaciones son indicadores de la impedancia electroquímica de dichas celda electroquímica.

7. Sistema para detectar las moléculas biológicas que comprende un sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el transductor de polímero sólido electroconductor se sensibiliza mediante un mediador de enzima de liberación de protones.

8. Sistema para detectar las moléculas biológicas de acuerdo a la reivindicación 7, en donde el mediador de enzima de liberación de protones comprende una enzima de β-lactamasa.

9. Método para medir un pH de solución con un potenciostato, dicho potenciostato comprende un electrodo de trabajo hecho de un transductor de polímero sólido electroconductor, una entrada para recibir una señal de entrada indicadora del potencial a ser aplicado entre dicho electrodo de trabajo y un electrodo de referencia al potenciostato, y una salida para transmitir una señal de salida indicadora de la magnitud de la corriente que fluye entre un contraelectrodo del potenciostato y dicho electrodo de trabajo, dichos tres electrodos son sumergidos en dicha solución, dicho método comprende:

• Generar (31,41) la señal de entrada;

• Detectar (33,43) la señal de salida;

• Modificar (35,45) la señal de entrada para mantener dicha señal de salida dentro de un rango predeterminado de tal manera que el potencial de la señal de entrada es representativo del pH de la solución cuando dicha señal de salida está dentro de dicho rango predeterminado.

10. Producto de software de ordenador almacenado en un medio de grabación y que comprende un conjunto de instrucciones para posibilitarle a un ordenador practicar el método de acuerdo con la reivindicación 9 cuando el ordenador ejecuta dicho conjunto de instrucciones.

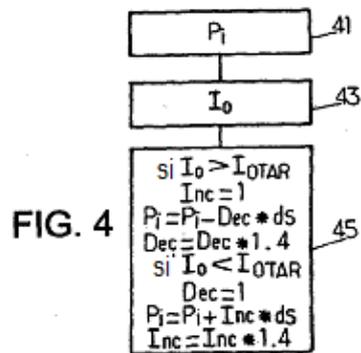
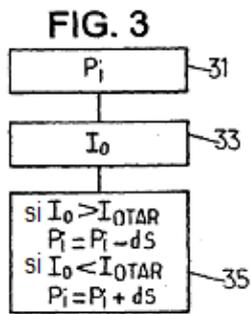
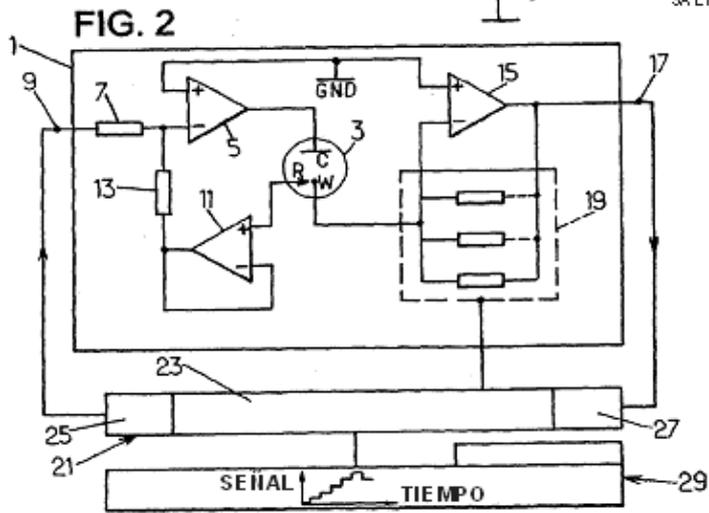
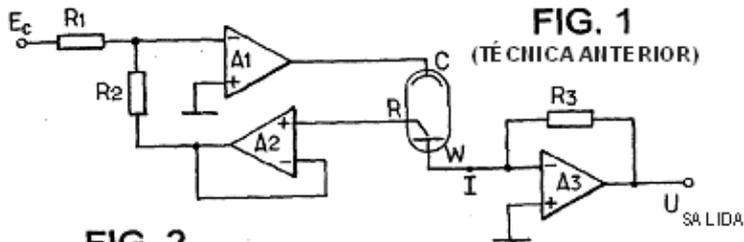


FIG. 5

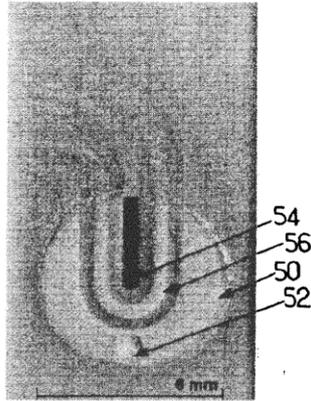


FIG. 6A

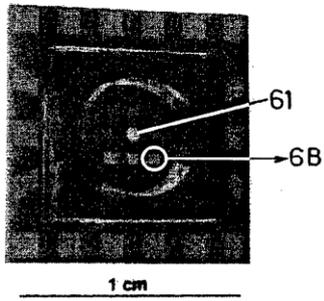


FIG. 6B

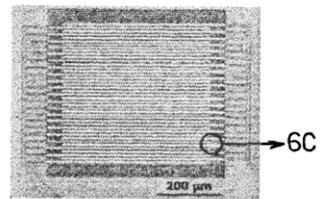
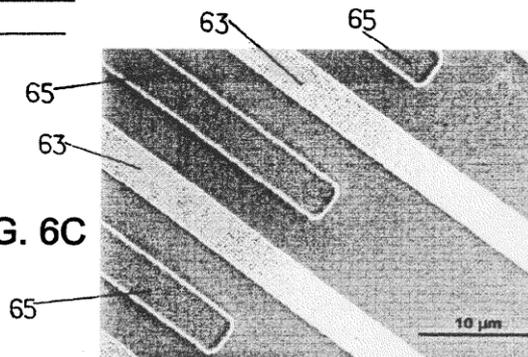


FIG. 6C



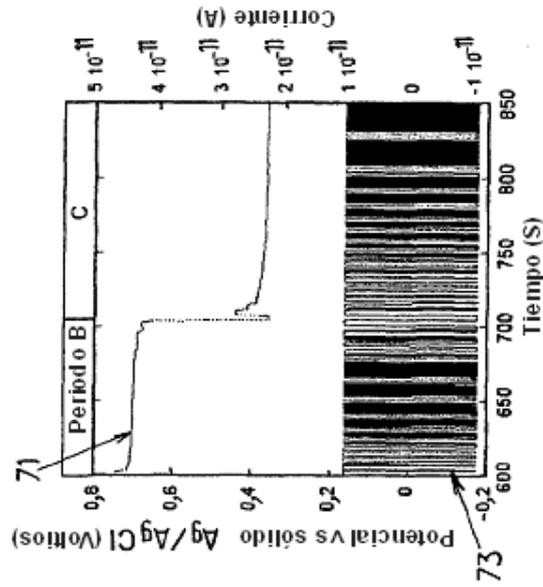


FIG. 7B

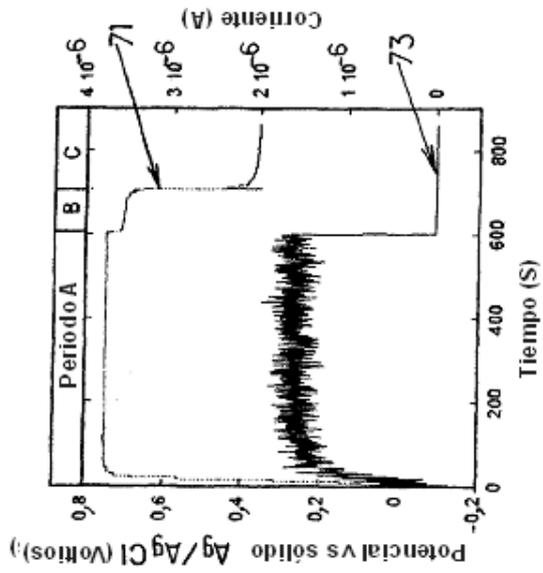


FIG. 7A

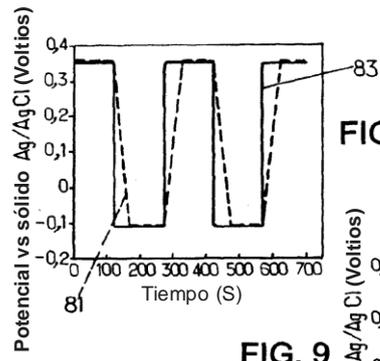


FIG. 8

FIG. 9

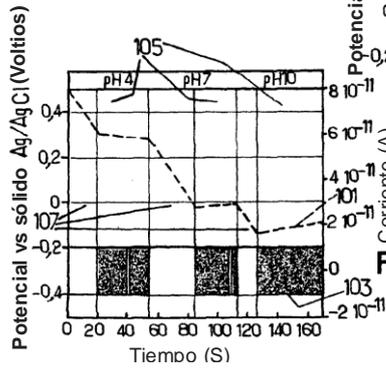
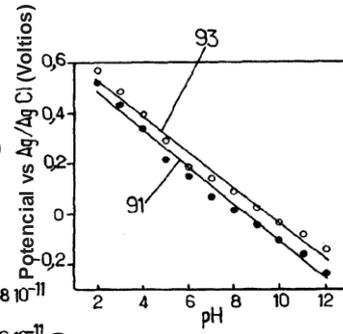
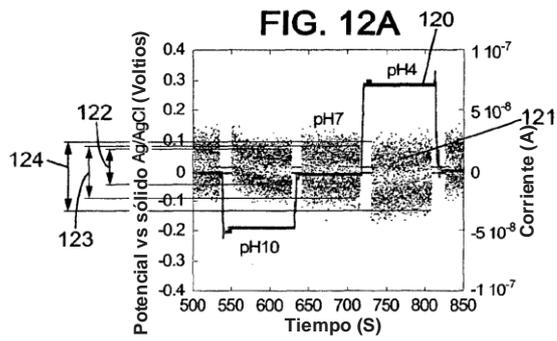
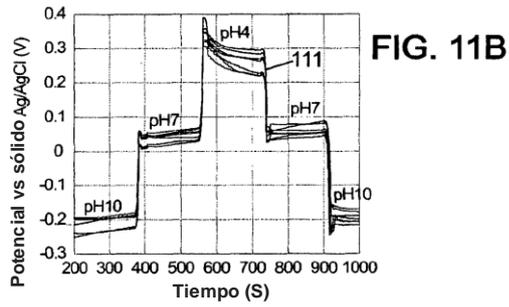
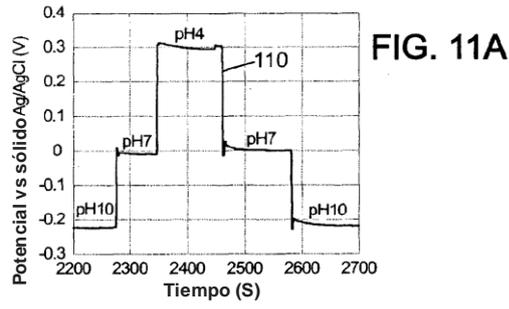


FIG. 10



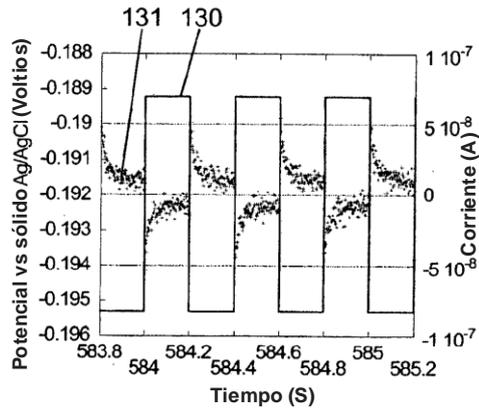


FIG. 12B

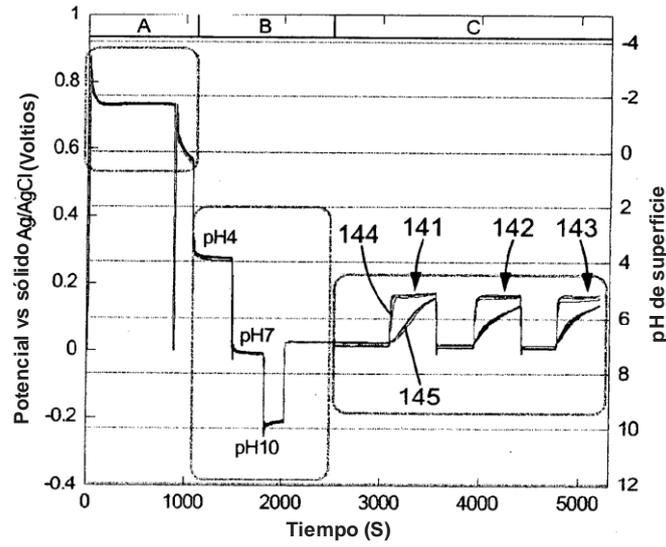


FIG. 13