

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 195**

51 Int. Cl.:

G01N 31/00 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

G01N 31/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2014 PCT/US2014/032173**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14160937**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2014 E 14772704 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2979086**

54 Título: **Aparato de detección de sulfuro de hidrógeno**

30 Prioridad:

28.03.2013 US 201361806017 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.02.2018

73 Titular/es:

**BOARD OF SUPERVISORS OF LOUISIANA
STATE UNIVERSITY AND AGRICULTURAL AND
MECHANICAL COLLEGE (50.0%)
P.O. Box 25055
Baton Rouge, LA 70894-5055, US y
LOUISIANA TECH UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KEVIL, CHRISTOPHER, G. ;
GLAWE, JOHN, D. ;
FRILOT, CLIFTON, F. y
WEISS, LELAND**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 656 195 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

Aparato de detección de sulfuro de hidrógeno

- 5 La presente invención se refiere a un nuevo aparato y método para la medición del sulfuro de hidrógeno en sus diversas formas biodisponibles.

10 El sulfuro de hidrógeno (H_2S) es un gasotransmisor (molécula de señalización gaseosa) incoloro que juega un papel vital en numerosas funciones celulares del cuerpo humano. Por ejemplo, durante la pasada década, el papel del H_2S , más allá de un tóxico y un contaminante medioambiental, ha evolucionado para englobar diversas funciones bioquímicas que son importantes en varias respuestas fisiológicas y patológicas tales como la (dis)función cardiovascular, la (dis)función neurológica, la (dis)función gastrointestinal, la (dis)función inmunitaria y otras muchas respuestas de la biología molecular y celular.

15 Por ejemplo, se ha descubierto que el H_2S tiene un potencial significativo para contribuir a la detección y el tratamiento de la enfermedad cardiovascular, incluyendo la aterosclerosis y la enfermedad arterial periférica. Debido a una reducida modificación oxidante de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), también se ha demostrado que el H_2S juega un papel significativo en la aterosclerosis al tener unos efectos apreciables sobre el reclutamiento de monocitos, su transformación en macrófagos tisulares y la formación de macrófagos espumosos. Además, se ha demostrado que el H_2S inhibe la modificación aterogénica de las LDL mediada por hipoclorito y hemina. También se ha demostrado que los niveles plasmáticos de H_2S son menores en la placa aterosclerótica, y el tratamiento con sulfhidruro de sodio (NaHS) disminuye tanto la placa aórtica como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1). Además, el H_2S regula por disminución la expresión de la proteína quimiotáctica de monocitos 1, una quimiocina CC que se une al receptor de quimiocina C-C de tipo 2 (CCR2) y recluta monocitos en la capa subendotelial para formar una placa aterosclerótica. Otro papel crítico del H_2S en la patogenia de la aterosclerosis es el efecto inductor de la apoptosis sobre las células del músculo liso vascular, que genera una placa aterosclerótica. El sulfuro de hidrógeno, administrado en forma de NaHS, disminuye la proliferación de la célula del músculo liso vascular a través de la ruta de la cinasa de proteína activada por mitógenos (MAPK) de una forma dependiente de la dosis en modelos de rata. Un trabajo adicional con modelos de rata reveló que el H_2S reducía la calcificación vascular. Adicionalmente, estudios recientes han demostrado que el H_2S tiene una relación directa con el monóxido de nitrógeno y el monóxido de carbono en la identificación de la enfermedad arterial periférica (PAD).

35 El sulfuro de hidrógeno se produce a partir de múltiples fuentes y tejidos biológicos (por ejemplo, bacterias y producción específica de órganos). La producción biológica endógena del H_2S procede principalmente del metabolismo de la cisteína a través de la actividad de la sintasa de la cistationina β y de la γ -liasa de cistationina, o a través del metabolismo del 3-mercaptopiruvato por parte de la 3-mercaptosulfurtransferasa. El H_2S puede proceder del metabolismo dependiente de redox de los polisulfuros, que implica al glutatión o a otros modificadores de tiol de pequeño peso molecular. Finalmente, el H_2S también se produce en diferentes fuentes medioambientales que afectan a los seres humanos, tales como la producción y la exploración del petróleo, el procesado de alimentos y bebidas, la eliminación de desechos y el tratamiento de aguas, agricultura y ganadería, y la contaminación y función bacterianas.

45 La química del sulfuro de hidrógeno es compleja y juega diversos papeles en la modulación de la función del tiol proteico. Afecta a numerosas respuestas biológicas que implican respuestas de transcripción de señales, la respiración mitocondrial, la expresión génica y la supervivencia/viabilidad celular. A un pH fisiológico de $\sim 7,2 - 7,4$, el H_2S existe predominantemente ($\sim 80\%$) en su forma de anión HS^- con una menor cantidad en la forma gaseosa H_2S ($\sim 20\%$). Esto es debido a la regulación del pKa de las formas del H_2S en soluciones acuosas, según se ilustra en la siguiente ecuación:

$$pK_{a1} = 7,04 \quad pK_{a2} \cong 13$$



50 Debido a los diferentes pKa, la distribución iónica se manipula con facilidad, y a su vez, su distribución se controla tanto en la fase acuosa como en la gaseosa.

55 El sulfuro de hidrógeno es muy reactivo en sistemas biológicos o medioambientales, dando como resultado equivalentes de sulfuro presentes en tres conjuntos diferentes de azufre volátil, según se muestra en la Figura 1. Estos tres conjuntos - H_2S libre, H_2S ácido lábil y especies de azufre sulfano - son importantes en la regulación de la cantidad de azufre biodisponible. El sulfuro de hidrógeno libre se encuentra disuelto en el plasma y en otros fluidos tisulares. En las condiciones del cuerpo de los mamíferos (es decir, a un pH de 7,4 y una temperatura de $37^\circ C$), el $18,5\%$ del sulfuro de hidrógeno libre existe en forma de H_2S gaseoso, y el resto es prácticamente todo anión sulfhidruro (HS^-) con una contribución despreciable del S^{2-} . El azufre sulfano se refiere a átomos de azufre divalentes unidos a otro azufre, aunque pueden portar un hidrógeno ionizable a ciertos valores de pH. Algunos

ejemplos de estos azufres unidos incluyen tiosulfato $S_2O_3^{2-}$, persulfuros R-S-SH, tiosulfonatos R-S(O)-S-R', polisulfuros R-S_n-R, politionatos S_nO₆²⁻ y azufre elemental S⁰. El sulfuro ácido lábil, el otro conjunto biodisponible, consiste en azufre presente en agrupamientos de hierro-azufre contenidos en las proteínas de hierro-azufre (no hemo), que son ubicuas en los organismos vivos, y que incluyen una diversidad de proteínas y enzimas, incluyendo, sin limitación, rubredoxinas, ferredoxinas, aconitasa y deshidrogenasa de succinato. Los sulfuros ácidos lábiles liberan fácilmente H₂S libre en condiciones ácidas (pH < 5,4), y el proceso de liberación del ácido también puede liberar sulfuro de hidrógeno desde los persulfuros, que tradicionalmente se han clasificado como azufre sulfano. Se ha postulado que este conjunto de azufre ácido lábil es un sumidero de sulfuro reversible y puede ser un importante conjunto de almacenamiento que regula la cantidad de sulfuro de hidrógeno libre biodisponible.

Los equivalentes de H₂S son movilizados con facilidad desde estos conjuntos debido a cambios en el pH, la concentración de O₂ y la química oxidante/reductora que afectan a las respuestas biológicas y bioquímicas. Por lo tanto, la detección de la disponibilidad del H₂S a partir de estos distintos grupos es importante para el diagnóstico fisiopatológico clínico, la identificación de fuentes medioambientales y cualquier otro uso de la química orgánica o inorgánica.

Desafortunadamente, una barrera significativa para el estudio del papel del sulfuro de hidrógeno en la salud y la enfermedad humana ha sido la ausencia de una metodología precisa y de un medio de ensayo para la medición precisa y reproducible del sulfuro de hidrógeno tanto *in vivo* como *in vitro*. Se han empleado diversos métodos para medir el H₂S libre, pero con resultados divergentes. Estos métodos incluyen un método de derivatización espectrofotométrica que da como resultado la formación de azul de metileno, variaciones de este método con azul de metileno usando una cromatografía de líquidos de alta resolución, electrodos selectivos para el ion sulfuro, sensores polarográficos, cromatografía de gases y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) junto con métodos fluorimétricos que usan monobromobimano (MBB) con H₂S libre derivatizado. La complejidad de la medición analítica del H₂S, especialmente en los organismos vivos, refleja el hecho de que el sulfuro de hidrógeno es un gas reactivo y existe en el organismo en los tres conjuntos diferentes de azufre volátil mostrados en la Figura 1. Debido a la ausencia de métodos de detección analíticos fiables y precisos disponibles para cuantificar el H₂S y sus diversas formas, existe un importante desacuerdo relativo a las cantidades precisas y a las fuentes metabólicas del H₂S en entornos biológicos y bioquímicos. Por lo tanto, existe una gran necesidad de un aparato y de una metodología asociada que pueda usarse para medir de forma precisa y conveniente el H₂S en sus diversas formas biodisponibles.

El artículo "Analytical measurement of discrete hydrogen sulfide pools in biological specimens" de Shen et al, Free Radical Biology and Medicine; volumen 52, números 11-12, 1-15 de junio de 2012, páginas 2276-2283, desvela un protocolo para medir por separado los conjuntos específicos de sulfuro de hidrógeno usando el método del monobromobimano acoplado con una RP-HPLC. El método implica la liberación, el atrapamiento y la derivatización selectivas del sulfuro de hidrógeno. El sulfuro de hidrógeno ácido lábil es liberado mediante la incubación de una muestra en una solución ácida en un sistema cerrado para contener sulfuro de hidrógeno volatilizado. Este sulfuro de hidrógeno volatilizado es desviado después a Tris-HCl y se hace reaccionar con un exceso de monobromobimano. En una alícuota aparte se mide la contribución del conjunto de azufre sulfano unido mediante la incubación de la muestra con TCEP, un agente reductor, para reducir los puentes de disulfuro, y la medición del sulfuro de hidrógeno se lleva a cabo usando el método del monobromobimano. El conjunto ácido lábil se determina restando el valor del sulfuro de hidrógeno libre del valor obtenido mediante el protocolo de liberación del ácido. El conjunto de azufre sulfano unido se determina restando la medición del sulfuro de hidrógeno del protocolo de liberación de ácido individual.

El documento WO-A1-2010/102279 desvela dispositivos electroquímicos microfluidos en los que puede depositarse un analito en un canal hidrófilo definido entre barreras impermeables a líquidos, comunicando el canal hidrófilo con electrodos que están soportados sobre un sustrato. El dispositivo puede ser configurado para ser usado en una diversidad de métodos analíticos, tales como una medición de la impedancia, una amperometría, una biamperometría, una voltametría por desprendimiento, una voltametría de pulso diferencial, una voltametría psíquica, una coulombimetría y una potenciometría. Los analitos pueden ser glucosa, colesterol, ácido úrico, lactato, gases sanguíneos tales como oxígeno, ADN, hemoglobina, óxido nítrico y cetonas sanguíneas.

La invención divulgada en el presente documento se refiere a un aparato de detección de sulfuro de hidrógeno (H₂S) y a un método según se define en las reivindicaciones anexas.

Según la invención, el aparato de detección del H₂S presenta tres cámaras de reacción, a saber: una cámara de reacción del sulfuro libre que tiene un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5; una cámara de reacción del sulfuro ácido lábil que tiene un pH de entre aproximadamente 2,6 y aproximadamente 6,0; y una cámara de reacción del sulfuro total que tiene un pH de entre aproximadamente 2,6 y aproximadamente 6,0, y un agente reductor. Puede haber posicionadas tres correspondientes cámaras de atrapamiento adyacentes a la pluralidad de cámaras de reacción, de forma que el H₂S gaseoso liberado desde las cámaras de reacción difundirá a través de la membrana permeable al H₂S y hacia la correspondiente cámara de atrapamiento. Cada una de las cámaras de atrapamiento tiene un entorno alcalino con un pH de entre aproximadamente 9,5 y aproximadamente 10,0, con objeto de redissolver y atrapar el sulfuro de hidrógeno gaseoso. Después, la detección puede llevarse a

cabo mediante uno de los tres métodos siguientes: (a) electroquímico, (b) fluorescente, o (c) colorimétrico.

5 El aparato de detección de H₂S de la presente invención también puede presentar una tapa, una cámara de inyección y una base. La tapa puede estar posicionada adyacente a la cámara de inyección para permitir la inyección de una muestra de prueba a través de la tapa y hacia la cámara de inyección. Las cámaras de inyección pueden estar en comunicación fluida con las cámaras de reacción a través de una pluralidad de entradas. La base puede estar posicionada adyacente a la pluralidad de cámaras de atrapamiento. La base puede ser transparente para permitir la detección fluorimétrica o colorimétrica del H₂S en las cámaras de atrapamiento adyacentes. La base también puede presentar una pluralidad de sistemas de electrodos para permitir la detección electroquímica del H₂S en las cámaras de atrapamiento adyacentes.

15 El aparato de detección de H₂S de la presente invención permite la detección simultánea del H₂S libre, de cantidades ácido lábil de H₂S, del H₂S azufre sulfano unido disponible y del H₂S biodisponible total global a partir de una única muestra de prueba. La concentración del H₂S en los diversos conjuntos puede calcularse como sigue: el H₂S libre y las concentraciones totales de H₂S serán iguales a las concentraciones detectadas en la cámara de atrapamiento del sulfuro libre y en la cámara de atrapamiento del sulfuro total, respectivamente. La cantidad de H₂S ácido lábil puede ser determinada restando la cantidad medida en la cámara de atrapamiento del sulfuro libre de la de la cámara de atrapamiento del sulfuro ácido lábil. Finalmente, la concentración del H₂S unido puede ser determinada restando la concentración de la cámara de atrapamiento del ácido lábil (c) de la concentración de la cámara de atrapamiento del sulfuro total.

25 El sumario anterior no pretende describir cada realización ilustrada o cada posible implementación. Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención se comprenderán mejor con referencia a la siguiente descripción, las reivindicaciones anexas y los dibujos anexas.

Las figuras anexas, en las que números de referencia similares se refieren a elementos idénticos o funcionalmente similares a lo largo de las vistas individuales, que no están a escala real, y que, junto con la siguiente descripción detallada, se incorporan a, y forman parte de, la memoria descriptiva, sirven para ilustrar varias realizaciones adicionales y para explicar varios principios y ventajas según la presente invención:

30 la **Figura 1** ilustra los tres conjuntos biológicos de sulfuro que se encuentran en los organismos.
 la **Figura 2** es una vista en despiece de una realización de un aparato de detección de sulfuro de hidrógeno que ejemplifica los principios de la presente invención.
 35 la **Figura 3** es una vista en planta de una realización de la cámara de reacción del aparato de detección de sulfuro de hidrógeno representado en la Figura 2.
 la **Figura 4** ilustra unas condiciones de la cámara de reacción representativa y la metodología de detección electroquímica empleada por un aparato de detección de sulfuro de hidrógeno que ejemplifica los principios de la presente invención.
 40 la **Figura 5** ilustra la difusión del sulfuro de hidrógeno a través de una membrana de polidimetilsiloxano (PDMS) de diferentes espesores, que muestra la eficacia de la transferencia del sulfuro de hidrógeno desde las cámaras de reacción hacia las cámaras de atrapamiento del aparato de detección de sulfuro de hidrógeno representado en la Figura 2. La eficacia de la transferencia se midió mediante una cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) junto con métodos fluorimétricos usando monobromobimano (MBB) con H₂S libre derivatizado.
 45 la **Figura 6** ilustra una realización de un proceso de fabricación para la creación de un aparato de detección de sulfuro de hidrógeno que ejemplifica los principios de la presente invención.
 la **Figura 7** es una vista en despiece de una realización alternativa de un aparato de detección de sulfuro de hidrógeno que ejemplifica los principios de la presente invención.

50 Los detalles estructurales o funcionales específicos divulgados en el presente documento no deben ser interpretados como limitantes, sino simplemente como una base para las reivindicaciones y como una base representativa para enseñar al experto en la materia a emplear de formas diversas la presente invención en prácticamente cualquier estructura apropiadamente detallada. Pueden concebirse realizaciones alternativas sin desviarse del ámbito de la invención, que está definido por las reivindicaciones. Además, los términos y las frases usados en el presente documento no pretenden ser limitantes; más bien, proporcionar una descripción comprensible de la invención.
 55 Aunque la memoria descriptiva concluye con las reivindicaciones que definen las características de la invención que se contemplan como nuevas, se cree que la invención se comprenderá mejor a partir de una consideración de la siguiente descripción junto con las figuras y dibujadas, en las que se usan sucesivamente números de referencia similares.

60 Según se usa en el presente documento, los términos "un/a" o "uno/a" se definen como uno/a o más de uno/a. El término "pluralidad", según se usa en el presente documento, se define como dos o más de dos. El término "otro/a", según se usa en el presente documento, se define como al menos un segundo o más. Los términos "comprende", "que comprende", o cualquier otra variación de los mismos, pretenden cubrir una inclusión no excluyente, de forma que un proceso, un método, un artículo o un aparato que comprenda una lista de elementos no incluya únicamente esos elementos, si no que puede incluir otros elementos que no están recogidos expresamente o que son inherentes a dicho proceso, método, artículo o aparato. Un elemento precedido por "comprende ... un/a" no descarta, sin más
 65

restricciones, la existencia de elementos idénticos o adicionales en el proceso, el método, el artículo o el aparato que comprende el elemento. Los términos "que incluye", "que tiene" o "que presenta", según se usan en el presente documento, se definen como que comprenden (es decir, un lenguaje abierto). El término "acoplado", según se usa en el presente documento, se define como conectado, aunque no necesariamente de forma directa y no necesariamente mecánicamente. Según se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se aplica a todos los valores numéricos, tanto si están indicados explícitamente como si no. Estos términos se refieren de forma general a un intervalo de cifras que el experto en la materia consideraría equivalente a los valores indicados (es decir, que tiene la misma función o resultado). En muchos casos estos términos pueden incluir cifras que están redondeadas hasta la cifra significativa más próxima. Los términos relativos tales como primero y segundo, superior e inferior, derecho e izquierdo, y similares, pueden usarse únicamente para distinguir una entidad o acción de otra entidad o acción sin requerir o implicar necesariamente ninguna relación u orden real entre dichas entidades u opciones.

Según se usa en el presente documento, la abreviatura CA se refiere a una cronoamperometría; la abreviatura DPV se refiere a una voltametría de pulso diferencial; la abreviatura DTPA se refiere a pentaacetato de dietilenotriamina; la abreviatura HPLC se refiere a una cromatografía de líquidos de alta resolución; la abreviatura PCR se refiere a la reacción en cadena de la polimerasa; y la abreviatura PDMS se refiere a polidimetilsiloxano.

En el presente documento se describen varias realizaciones de la presente invención. Para evitar redundancias, en algunas circunstancias puede no realizarse una descripción repetitiva de características similares.

Una realización de un aparato de detección de sulfuro de hidrógeno que ejemplifica los principios de la presente invención se muestra en las Figuras 2 y 3. El aparato **100** es un dispositivo labochip que permite la medición del H₂S en sus diversas formas biodisponibles de una forma analítica fiable empleando una química de reacción única, técnicas de microfabricación y técnicas de medición electroquímica selectiva. En particular, el aparato **100** permite la rápida medición del H₂S a partir de los conjuntos del H₂S libre, del sulfuro ácido lábil y del azufre sulfano (polisulfuro/persulfuro) presentando al menos tres cámaras de reacción, teniendo cada una un pH y unos productos químicos de reacción en particular presentes para permitir la liberación y el atrapamiento selectivos del H₂S a partir de estos conjuntos. El aparato **100** puede usarse para fines de investigación, medioambientales y de diagnóstico clínico en la determinación de la biodisponibilidad del sulfuro de hidrógeno en muestras biológicas o de otro tipo. El aparato **100** es particularmente útil para la detección del H₂S en plasma o en cualquier otra muestra biológica o líquida. En una realización preferida, el aparato **100** está diseñado para un único uso; sin embargo, el aparato **100** podría estar configurado para ser reutilizable en otras realizaciones.

Haciendo aún referencia a las Figuras 2 y 3, una realización del aparato de detección de sulfuro de hidrógeno **100** puede comprender: una tapa **111**; una cámara de inyección **121**; una pluralidad de cámaras de reacción **123, 124, 125**; una membrana permeable **131**; una pluralidad de cámaras de atrapamiento **143, 144, 145**; y una base **151**. La tapa **111** está hecha preferentemente de caucho de butilo y está posicionada adyacente a la cámara de inyección **121** para permitir la inyección de una muestra de prueba a través de la tapa **111** y en la cámara de inyección **121**. La cámara de inyección **121** está en comunicación fluida con las cámaras de reacción **123, 124, 125** a través de los canales de entrada **122a-c**. La membrana permeable **131** separa las cámaras de reacción **123, 124, 125** de las cámaras de atrapamiento adyacentes **143, 144, 145**. Las cámaras de atrapamiento **143, 144, 145** están posicionadas adyacentes a los sistemas de electrodo **153, 154, 155** sobre la base **151**.

En una realización preferida, la cámara de inyección **121** comprende una cámara de una única pieza moldeada en PDMS (polidimetilsiloxano) de la que se evacúa el aire y está adaptada para recibir el fluido inyectado directamente en ella. Un primer canal de entrada **122a** conecta la cámara de inyección **121** con la cámara de reacción del sulfuro libre **123**; un segundo canal de entrada **122b** conecta la cámara de inyección **121** con la cámara de reacción del sulfuro ácido lábil **124**; y un tercer canal de entrada **122c** conecta la cámara de inyección **121** con la cámara de reacción del sulfuro total **125**. En esta disposición, las cámaras de reacción **123, 124, 125** se llenan de forma reproducible con volúmenes uniformes procedentes de una única inyección mientras se minimiza la difusión de los componentes del tampón y de los productos de reacción entre las cámaras.

Cada cámara de reacción **123, 124 y 125** comprende preferentemente microcanales interdigitados de PDMS con componentes del tampón y/o agentes y reactivos secos o recubiertos con polvo que exponen la muestra entrante a un pH y un entorno químico en particular, con objeto de permitir la liberación y el atrapamiento selectivos del sulfuro de hidrógeno. La Figura 4 ilustra las condiciones de una cámara de reacción representativa del aparato de detección de sulfuro de hidrógeno **100**. El sulfuro de hidrógeno libre o volatilizado es derivatizado en condiciones alcalinas, preferentemente a un pH > 7,0. La derivatización se produce preferentemente en unas condiciones de poco oxígeno, preferentemente < 5 % de oxígeno, más preferentemente < 2 % de oxígeno, y lo más preferentemente < 1 % de oxígeno. Consecuentemente, en una realización preferida, la cámara de reacción del sulfuro libre **123** está en un entorno de pH neutro (a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5). No obstante, la liberación del sulfuro de hidrógeno desde el conjunto de ácido lábil requiere generalmente un pH menor de 5,4. Por lo tanto, la determinación del sulfuro ácido lábil implica la acidificación de la muestra, preferentemente a un pH < 4,0, más preferentemente aproximadamente a un pH de 2,0 y aproximadamente a un pH de 3,0, y lo más preferentemente aproximadamente a un pH de 2,6, causando así la liberación del sulfuro de hidrógeno libre desde el conjunto de

ácido lábil. Consecuentemente, la cámara de reacción del sulfuro ácido lábil **124** está preferentemente en un entorno de pH ácido (a un pH de entre aproximadamente 2,6 y aproximadamente 6,0). Finalmente, la cámara de reacción del sulfuro total **125** está en un entorno de pH ácido (a un pH de entre aproximadamente 2,6 y aproximadamente 6,0) con un agente reductor presente, tal como clorhidrato de tris (2-carboxietil) fosfina 1 mM (TCEP). La cantidad total de sulfuro lábil, incluyendo el componente de azufre sulfano junto con el ácido lábil y el sulfuro libre, se determina usando un agente reductor con una solución ácida. El agente reductor es preferentemente TCEP, que rompe los puentes de disulfuro para liberar el átomo de azufre sulfano. Aunque también podría usarse ditioneitol (DTT), se prefiere el TCEP debido a que es soluble en agua, no volátil, reduce los puentes de disulfuro más rápidamente y se ha demostrado que es muy estable a lo largo de un intervalo de pH más amplio (2,0-9,5) que el DTT. El TCEP no tiene una fracción tiol y tiene la ventaja adicional de no requerir la eliminación del tiol antes de la reacción con el MBB. Por el contrario, el DTT contiene una fracción tiol y se ha notificado que tiene pequeñas cantidades de contaminantes de sulfuro.

La membrana permeable **131** está posicionada entre las cámaras de reacción **123**, **124**, **125** y las correspondientes cámaras de atrapamiento **143**, **144**, **145**. La membrana permeable al H₂S **131** está preferentemente basada en silicona o puede comprender materiales mezclados, tales como mezclas de silicona-policarbonato. El espesor de la membrana permeable al H₂S **131** puede variar entre aproximadamente 75 µm y aproximadamente 500 µm o más, dependiendo de la construcción, la aplicación y la fuerza mecánica requerida del dispositivo. Otras construcciones pueden utilizar materiales de membrana que incluyen silicona y compuestos aditivos para aumentar la especificidad de la permeabilidad al sulfuro hidrógeno. Estos incluyen, pero no se limitan a, la combinación de silicona y policarbonato para membranas, o dimetil silicona. Otros materiales de base de la membrana que pueden utilizarse incluyen, pero no se limitan a, membranas de composite con un recubrimiento de silicona o de PDMS sobre una estructura de celulosa microporosa. La fabricación de la membrana puede completarse a través de una microfabricación o de otras técnicas. Algunas técnicas preferidas incluyen rotar el polímero de la membrana en forma líquida sobre una superficie plana como una oblea de silicio-nitruro. La membrana puede ser posteriormente liberada después del curado, la eliminación de las burbujas de aire atrapadas y la solidificación. Otras técnicas incluyen, pero no se limitan a, procesos de decapado con iones reactivos (RIE). Este incluye la deposición de la membrana de polímero líquido por encima de una oblea, y después estampar y eliminar el sustrato de la oblea para liberar la membrana para su uso.

Las cámaras de atrapamiento **143**, **144**, **145** están posicionadas por debajo de las cámaras de reacción **123**, **124**, **125** de forma que el H₂S gaseoso liberado desde cada cámara de reacción difundirá a través de la membrana permeable **131** y hacia la correspondiente cámara de atrapamiento. Las tres cámaras de atrapamiento **143**, **144**, **145** están llenas de una solución alcalina (NaOH 100 mM, a un pH de entre aproximadamente 9,5 y aproximadamente 10) para atrapar y redissolver el sulfuro de hidrógeno gaseoso que difunde a través de la membrana permeable **131**. En una realización preferida, las cámaras de atrapamiento están construidas con PDMS. Sin embargo, pueden utilizarse otros materiales y procesos de construcción, que incluyen, pero no se limitan a, un moldeado sólido, un estampado de silicona con RIE y una impresión tridimensional de cámaras no porosas usando un material de impresión tridimensional.

La base **151** está construida preferentemente con plástico. Sin embargo, puede estar construida con cualquier otro material de base que incluye, pero no se limita a, silicio, nitruro de silicio o materiales metálicos. En la realización representada en las Figuras 2 y 3, la base **151** presenta unos sistemas de electrodo interdigitados **153**, **154**, **155** para la detección electroquímica del H₂S en las cámaras de atrapamiento adyacentes **143**, **144**, **145**. Los sistemas de electrodo **153**, **154**, **155** pueden presentar, cada uno, un electrodo de trabajo, un contraelectrodo y un electrodo de referencia. Los electrodos de trabajo pueden estar contruidos con materiales inertes tales como oro, plata o platino, preferentemente son fibras de carbono de calidad médica (6 µm de diámetro; 12 Ω-cm). Otras realizaciones pueden incluir el uso de grafeno o de materiales de lámina fina similares para la aplicación del electrodo. Los electrodos de trabajo pueden estar fijados a la base **151** longitudinalmente, de forma que permitan la exposición a la muestra en las cámaras de atrapamiento **143**, **144**, **145**. El contraelectrodo está construido preferentemente con un material electroquímicamente inerte tal como oro, platino o carbono, y puede estar fijado a la base **151** paralelo al electrodo de trabajo (preferentemente con una separación de 1 mm - 5 mm) con objeto de detectar los electrones producidos por la reacción de oxidación que se produce en las cámaras de atrapamiento **143**, **144**, **145**. El electrodo de referencia está construido preferentemente con un alambre de platino o Ag/AgCl en contacto eléctrico con la muestra. Alternativamente, y como se representa en la Figura 7, la base **151** puede estar construida con un material transparente (por ejemplo, plástico) para permitir la detección de los niveles de H₂S en las cámaras de atrapamiento **143**, **144**, **145** a través de una fluorescencia, de una quimioluminiscencia y de una detección colorimétrica. En otra realización alternativa, la base **151** puede estar construida con un material transparente, presentando también sistemas de electrodo, proporcionando así al usuario la opción de métodos de detección.

Durante su funcionamiento, puede depositarse una muestra en la cámara de inyección **121** usando una aguja para perforar la tapa **111**. La muestra será transmitida en volúmenes uniformes a la cámara de reacción del sulfuro libre **123**, a la cámara de reacción del sulfuro ácido lábil **124** y a la cámara de reacción del sulfuro total **125** a través del primer canal de entrada **122a**, del segundo canal de entrada **122b** y del tercer canal de entrada **122c**, respectivamente. Las cámaras de liberación **123**, **124**, **125** están separadas de sus correspondientes cámaras de atrapamiento **143**, **144**, **145** por la membrana permeable al H₂S **131**. En la cámara de reacción del sulfuro libre **123**,

únicamente el H₂S gaseoso libre difundirá a través de la membrana **131** hacia la cámara de atrapamiento del sulfuro libre **143**. En la cámara de reacción del sulfuro ácido lábil **124**, tanto el conjunto del H₂S libre como el del H₂S ácido lábil difundirán a través de la membrana 131 hacia la cámara de atrapamiento del sulfuro ácido lábil **144**. En la cámara de reacción del sulfuro total **125**, el H₂S de los tres conjuntos (libre, ácido lábil y azufre sulfano unido) será liberado y difundirá hacia la correspondiente cámara de atrapamiento del sulfuro total **145**. Después de su entrada en las cámaras de atrapamiento **143, 144, 145**, el H₂S se convierte desde su forma gaseosa en la forma de HS⁻ debido a la presencia de unas condiciones básicas (pH ~ 9,5 - 10,0). La concentración del H₂S en los diversos conjuntos puede calcularse después como sigue: la concentración del H₂S libre y del H₂S total es igual a la medida por la cámara de atrapamiento del sulfuro libre **143** y por la cámara de atrapamiento del sulfuro total **145**, respectivamente. La cantidad del H₂S ácido lábil se determina restando la cantidad medida en la cámara de atrapamiento del sulfuro libre **143** de la de la cámara de atrapamiento del sulfuro ácido lábil **144**. La concentración de H₂S unido se determina restando la concentración de la cámara de atrapamiento del ácido lábil 144 de la concentración de la cámara de atrapamiento del sulfuro total **145**. De esta forma, el dispositivo detecta simultáneamente el H₂S libre, las cantidades ácido lábil de H₂S, el azufre sulfano H₂S unido disponible, y el H₂S global biodisponible total, a partir de una muestra.

Detección electroquímica

Como se representa en las Figuras 2 y 4, el aparato de detección de sulfuro de hidrógeno **100** puede presentar una base **151** que tiene sistemas de electrodo integrados **153, 154, 155** para la detección electroquímica del H₂S en las cámaras de atrapamiento **143, 144, 145**. Los actuales métodos electroquímicos usados para la detección *in vivo* e *in vitro* de compuestos biológicos son la cronoamperometría (CA) y la voltametría de pulso diferencial (DPV). Tanto la CA como la DPV utilizan un sistema de tres electrodos (de referencia, contraelectrodo y de trabajo). En la CA, el potencial del electrodo de trabajo se mantiene constante (con respecto al electrodo de referencia) y se mide la corriente en función del tiempo. Con esta técnica se consigue una excelente resolución temporal y sensibilidad. Sin embargo, no puede distinguirse el origen de la corriente, ya que la corriente medida es una superposición de cualquier especie que sea electrolizada a, o por debajo de, el potencial del electrodo de trabajo. Para la determinación de la concentración de especies individuales, deben usarse electrodos de trabajo selectivos.

La DPV es un híbrido entre una voltametría cíclica tradicional y una CA. La sensibilidad es similar a la de la CA, pero la resolución temporal es menor. La DPV tiene un potencial aplicado al electrodo de trabajo que es un tren de pulsos con incrementos lineales. La diferencia en la corriente por pulso se registra en función de un voltaje en crecimiento lineal. La corriente se mide en dos puntos para cada pulso, el primer punto justo antes de la aplicación del pulso y el segundo al final del pulso. Esta técnica produce una curva con un pico que es directamente proporcional a la concentración de la especie. Esto permite la discriminación de la concentración de la especie en solución cuyo potencial de semionda difiere en tan poco como entre 40 y 50 mV.

El H₂S tiene una reacción de oxidación a -0,14 V produciendo dos electrones a través de una reacción del HS⁻ con Fe(CN)₆ para producir la ecuación global de: $\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{S} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$. tanto la CA como la DPV pueden detectar los electrones generados por la oxidación del HS⁻. Y dado que ambas modalidades están incorporadas en los actuales potenciostatos, pueden usarse ambas para determinar la detección electroquímica óptima. Durante la detección con una CA, el electrodo de trabajo está fijado a entre -0,20 - 0,30 V para oxidar el H₂S/HS⁻, y durante la DPV se aplica un intervalo de voltajes. Los voltajes para la detección de electrones deben barrer desde -0,3 V hasta 0,3 V con una velocidad de barrido de 5-10 mV/s y un incremento en el barrido de 2-4 mV. Un ejemplo de los parámetros del pulso son una altura del pulso de 25 mV, un tiempo de etapa/caída de 100 ms y un ancho de pulso de 50 ms; aunque éstos pueden variar en un 50 % dependiendo del rendimiento del chip.

La Figura 4 ilustra una realización de las condiciones de la cámara de trabajo y de la metodología de detección electroquímica. La detección electroquímica del H₂S se lleva a cabo en tres cámaras de atrapamiento individuales: la cámara de atrapamiento del sulfuro libre **143**; la cámara de atrapamiento del sulfuro ácido lábil **144**; y la cámara de atrapamiento del sulfuro total **145**. Como se ha explicado anteriormente, la cámara de reacción del sulfuro libre 123 está preferentemente a un pH neutro de 7,0, la cámara de reacción del sulfuro ácido lábil **124** a un pH ácido (a un pH de entre aproximadamente 2,6 y aproximadamente 6), y la cámara de reacción del sulfuro total **125** a un pH ácido (a un pH de entre aproximadamente 2,6 y aproximadamente 6) más TCEP 1 mM para liberar el H₂S unido. El sulfuro de hidrógeno gaseoso difundirá a través de la membrana permeable y será atrapado en las correspondientes cámaras de atrapamiento debido a las condiciones básicas presentes (un pH de entre aproximadamente 9,5 y aproximadamente 10,0). El FeCN oxidará el HS⁻ para producir 2e⁻. Los cambios en el potencial electroquímico pueden medirse usando un potenciostato acoplado a los electrodos incluidos. El potenciostato puede estar acoplado a los sistemas de electrodo integrados **153, 154, 155**, preferentemente a través de un hilo de cobre que es adherido a los electrodos con una epoxi de plata.

Detección por fluorescencia, quimioluminiscencia y colorimétrica

Como se representa en la Figura 7, el aparato de detección de sulfuro de hidrógeno **100** puede presentar como alternativa una base transparente **151** para permitir la detección de los niveles de H₂S en las cámaras de atrapamiento **143, 144, 145** a través de colorantes fluorescentes, quimioluminiscentes y colorimétricos. Pueden

usarse colorantes tales como compuestos de bimano, que incluyen, pero no se limitan a, dibromobimano, monobromobimano, benzoditolona y dansil azida, junto con una espectrometría de excitación y de emisión de fluorescencia para la detección del sulfuro. La reacción del sulfuro de hidrógeno con sustancias químicas aromáticas pobres en electrones u otros electrófilos puede producir desplazamientos en el color en el espectro de luz visible.

5 Por ejemplo, los compuestos de nitrobenzofurazan tioéter pueden reaccionar para formar nitrobenzofurazan tiol con un desplazamiento en el espectro de absorbancia a 534 nm. El sulfuro de hidrógeno contenido en las cámaras de atrapamiento **143, 144, 145** puede ser detectado mediante quimioluminiscencia a través de una reacción con ozono u otros compuestos electrófilos para estimular la liberación de fotones.

10 Fabricación del dispositivo

Un aparato de detección de sulfuro de hidrógeno que ejemplifica los principios de la presente invención puede ser fabricado utilizando una diversidad de materiales y técnicas. Un método preferido es fabricar en capas a través de PDMS. Pueden utilizarse materiales poliméricos alternativos, aparte del PDMS, que incluyen polímeros de SU-8 o estructuras similares. Pueden emplearse aditivos para el material de la base, tales como óxido de polietileno (PEO). Estos aditivos pueden aumentar la acción capilar de los dispositivos. Otros métodos incluyen, pero no se limitan a, el uso de silicio, o de metales tales como el cobre. Por ejemplo, un procedimiento de microfabricación adecuado sería utilizar obleas de silicio micro-fabricadas a granel que sirven como sustrato del dispositivo. Pueden utilizarse procesos de fabricación alternativos que incluyen desde una deposición por capas hasta una impresión y un procesamiento avanzados, pero no se limitan a una impresión tridimensional. También podría usarse un moldeado a través de un molde y un vertido para generar las estructuras apropiadas dados unos materiales no permeables.

En una realización preferida, el aparato de detección de sulfuro de hidrógeno de la presente invención está construido con capas que utilizan una construcción de PDMS junto con otros materiales poliméricos. Por ejemplo, el aparato de detección de sulfuro de hidrógeno **100** representado en la Figura 2 está formado por cinco capas. Haciendo referencia a la Figura 2, la primera capa **110** puede comprender una capa de caucho de butilo **111**. La segunda capa **120**, que está unida a la primera capa **110**, puede ser moldeada a partir de un molde reutilizable para formar la cámara de inyección **121**, la pluralidad de cámaras de reacción **123, 124, 125** y los canales de entrada **122a-c**. La tercera capa **130** puede comprender una membrana de PDMS **131** y está unida a la segunda capa **120**. El espesor de la membrana **131** puede variar dependiendo del material usado y de la tecnología de fabricación empleada. La cuarta capa **140** está unida a la tercera capa **130** y comprende una pluralidad de cámaras de atrapamiento **143, 144, 145** llenas con un tampón de atrapamiento (por ejemplo, NaOH 100 mM, a un pH de entre aproximadamente 9,5 y aproximadamente 10). En la construcción preferida, la cuarta capa **140** es de PDMS con una sección de 1 mm de grosor que tiene las cámaras de atrapamiento **143, 144, 145** cortadas a partir del material de PDMS y alineadas con las cámaras de reacción **123, 124, 125**. La quinta capa **150** consiste preferentemente en una base de plástico **151** con sistemas de electrodo interdigitados **153, 154, 155** para la detección electroquímica de la muestra de prueba. La superficie de los sistemas de electrodo **153, 154, 155** puede ser impresa a través de técnicas de microfabricación, y estar alineados con las cámaras de atrapamiento **143, 144, 145** formadas por cortes de la cuarta capa **140**. La quinta capa **150** es preferentemente más larga que la cuarta capa **140**, permitiendo el acceso a los electrodos del aparato **100**. Por ejemplo, la primera capa **110** puede ser de 10 nm x 2 nm, la segunda, tercera y cuarta capas **120, 130, 140** pueden ser de 40 nm x 2,5 nm, y la quinta capa **150** puede ser de 50 nm x 2,5 nm. Otras realizaciones del diseño del chip podrían presentar un tamaño mayor o menor para permitir la detección de volúmenes mayores o menores, respetuosamente. Finalmente, la quinta capa **150** está unida a la cuarta capa **140** y se evacúa el aire de las cámaras de inyección y de liberación.

La Figura 6 ilustra un proceso ejemplar **200** para la fabricación de la segunda capa **120** del aparato de detección de sulfuro de hidrógeno **100**. En la fabricación preferida de PDMS, se proporciona una oblea de nitruro de silicio en la etapa **201**. En la etapa **202**, la oblea de nitruro de silicio se recubre por rotación con SU-8 fotorresistente de 500 µm de grosor y se cuece suavemente. Después, la oblea se expone a una máscara litográfica y se cuece después de la exposición (etapa **203**). Después se desarrolla el fotorresistente y se aclara en la etapa **204**. En la etapa **205**, se vierte el PDMS sin curar en el molde y se cura. En la construcción preferida del polímero de PDMS, el molde se retira en la etapa **206** y la cámara de inyección se corta a lo largo de la totalidad del grosor del molde en la etapa **207**. Los tampones de reacción química requeridos para el ácido lábil (un pH ácido de entre aproximadamente 2,6 y aproximadamente 6,0) y el sulfuro total (un pH ácido más TCEP 1 mM) pueden ser recubiertos mediante una evaporación de las soluciones concentradas en la superficie de las respectivas cámaras **124, 125** para completar la segunda capa **120**. El peso final del material de PDMS debería ser lo suficientemente elevado para encapsular los canales diseñados con unas alturas de 2000 micrones. Las características del diseño incluyen unas elevadas áreas superficiales que consisten en, pero no se limitan a, canales capilares que varían entre 1 y 400 micrones de ancho, con unas alturas variables de entre 10 y 2000 micrones. Sin embargo, el experto en la materia apreciará que la altura del canal se determina basándose en el tamaño volumétrico requerido de la muestra. Adicionalmente, el experto en la materia reconocerá que el anterior proceso también puede ser utilizado para la fabricación de la cuarta capa **140** del aparato de detección de sulfuro de hidrógeno **100**.

65 Ejemplos

Ejemplo 1

Se demostró la eficacia de transferencia del H₂S a través de membranas de PDMS de 75 µm y de 150 µm usando una realización de un aparato de detección de sulfuro de hidrógeno que ejemplifica los principios de la presente invención. Se introdujo una muestra en una única cámara de reacción ácida separada por una membrana de PDMS de 75 µm de una cámara de atrapamiento alcalina que contiene monobromobimano 10 mM (MBB). Este experimento se repitió con una membrana de PDMS de 150 µm. Se midió la eficacia de transferencia del H₂S con el tiempo mediante una detección con una RP-HPLC del sulfuro de dibromano (SDB). La Figura 5 ilustra la difusión del H₂S a través de una membrana de PDMS con diferentes espesores, utilizando una detección fluorescente mediante una HPLC. La eficacia de transferencia del H₂S desde la cámara de reacción ácida hacia la cámara de atrapamiento está representada según se midió usando un detector de MBB tanto para la membrana de 75 µm como para la membrana de 150 µm. El sulfuro de sodio volatilizó el anión sulfuro en H₂S gaseoso, que difundió a través de la membrana y fue atrapado en una cámara individual a un pH de 9,5 con DTPA 0,1 mM. Se tomaron alícuotas de la muestra desde la cámara de atrapamiento en unos momentos específicos. La cantidad de sulfuro fue detectada usando un análisis mediante una HPLC fluorescente según se describe en el documento PCT/US2013/031354, que se incorpora al presente documento como referencia. Como se muestra en la Figura 5, se produjo una eficacia de transferencia de aproximadamente el 15 % en 10 minutos usando la membrana de 75 µm, mientras que se produjo una eficacia de transferencia de aproximadamente el 50 % en 10 minutos usando la membrana de 150 µm. La eficacia de transferencia del H₂S a través de la membrana permeable puede ser utilizada para calibrar el aparato de detección de sulfuro de hidrógeno 100.

20 Ejemplo 2

Una realización de un aparato de detección de sulfuro de hidrógeno que ejemplifica los principios de la presente invención puede usarse para determinar la concentración de H₂S en una muestra usando métodos de detección electroquímicos, fluorescentes o colorimétricos. En dichos casos, se obtendrá una muestra de sangre de un sujeto y se colocará en tubos vacutainer que contienen heparina litiada (BD Biosciences, nº de cat. 367886), que a continuación es centrifugada inmediatamente a 4 °C a 1500 RCF durante 4 minutos para separar el plasma de los glóbulos rojos sanguíneos. Después, la muestra de plasma se inyectará en la cámara de inyección **121** del aparato **100** a través de una aguja de calibre 26 y una jeringa de 1 cc. La muestra será introducida en la cámara de inyección **121** en la que se ha evacuado el aire mediante una acción capilar, donde será introducida adicionalmente en tres cámaras de reacción paralelas **123**, **124**, **125** para la detección del sulfuro libre, del ácido lábil + sulfuro libre y del sulfuro total, respectivamente. Los componentes del tampón que recubre las cámaras se disolverán en la muestra de plasma, proporcionando el pH y las concentraciones químicas correctas necesarios para que se produzcan las reacciones a la temperatura ambiente. Después de aproximadamente 15 minutos se liberará sulfuro de hidrógeno desde cada una de las cámaras de reacción **123**, **124**, **125**; difundirá a través de la membrana **130**; y será atrapado en el tampón alcalino de las respectivas cámaras de atrapamiento **143**, **144**, **145**. Después, la detección puede llevarse a cabo mediante uno de los siguientes tres métodos: (a) electroquímico, (b) fluorescencia o (c) colorimétrico.

Si se va a emplear el método electroquímico, el aparato **100** se conectará a un potencióstato tal como el VersaStat 4 (Princeton Applied Research), con una derivación para cada uno del electrodo de trabajo, el contraelectrodo y el electrodo de referencia. Se usará un método tal como una voltametría de pulso diferencial (DPV) para adquirir una señal, que es una medición de la concentración del sulfuro de hidrógeno en la muestra de plasma. Los ajustes típicos de los parámetros de la DPV son 25 mV para el alto del pulso, 50 ms para el ancho del pulso, 1 mV para la altura de la etapa y 100 ms para el ancho de la etapa. Se obtendrán las corrientes de pico para cada cámara y se convertirán en concentraciones de sulfuro basándose en una función de calibrado (véase el Ejemplo 1).

Si se va a emplear el método de fluorescencia, el aparato **100** tendrá un colorante fluorescente, tal como dibromobimano (DBB), disuelto en solución en las cámaras de atrapamiento **143**, **144**, **145**. Después de la reacción entre el colorante y el sulfuro de hidrógeno en las cámaras de atrapamiento **143**, **144**, **145**, se medirá la fluorescencia usando las apropiadas longitudes de onda de excitación y de emisión. Si se usa el colorante DBB, éstas son de 358 nm y de 484 nm, respectivamente. Se cuantificará la fluorescencia y se convertirá en concentraciones de sulfuro por medio de una función de calibrado (véase el Ejemplo 1).

Si se va a usar un método colorimétrico, el aparato **100** tendrá un compuesto tal como nitrobenzofurazan tioéter disuelto en solución en las cámaras de atrapamiento **143**, **144**, **145**. Después de la reacción con el sulfuro, formará nitrobenzofurazan tiol, con un desplazamiento en el espectro de absorbancia a 534 nm como se ha indicado previamente. Se cuantificará la absorbancia y se convertirá en concentraciones de sulfuro por medio de una función de calibrado (véase el Ejemplo 1).

Después, el sulfuro libre, el sulfuro ácido lábil, el azufre sulfano unido y el sulfuro total pueden calcularse como sigue. Las concentraciones de sulfuro libre y de sulfuro total serán iguales a las medidas en las cámaras de atrapamiento del sulfuro libre y del sulfuro total **143**, **145**, respectivamente. La concentración del sulfuro ácido lábil será igual a la medida en la cámara de "ácido lábil + sulfuro libre" **144** menos la concentración en la cámara del sulfuro libre **143**. La concentración del azufre sulfano unido se hallará restando la concentración medida en la cámara de "ácido lábil + sulfuro libre" **144** de la medida en la cámara del sulfuro total **145**.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato de detección de sulfuro de hidrógeno (H_2S) (100) que comprende:
- 5 a. una cámara de inyección (121);
 b. una pluralidad de cámaras de reacción (123, 124, 125) en comunicación fluida con la cámara de inyección (121);
 c. una pluralidad de cámaras de atrapamiento (143, 144, 145) posicionada adyacente a la pluralidad de cámaras de reacción (123, 124, 125), definiendo la pluralidad de cámaras de atrapamiento (143, 144, 145) una cámara de
 10 atrapamiento del sulfuro libre (143), una cámara de atrapamiento del sulfuro ácido lábil (144) y una cámara de atrapamiento del sulfuro total, teniendo cada una de la pluralidad de cámaras de atrapamiento (143, 144, 145) un entorno alcalino;
 d. una membrana permeable al H_2S (131) posicionada entre la pluralidad de cámaras de reacción (123, 124, 125) y la pluralidad de cámaras de atrapamiento (143, 144, 145); y
 15 e. medio para detectar la concentración de H_2S en la cámara de atrapamiento del sulfuro libre (143) para determinar la concentración de sulfuro de hidrógeno libre en la muestra;
 f. medio para detectar la concentración de H_2S en la cámara de atrapamiento del sulfuro ácido lábil (144) y en la cámara de atrapamiento del sulfuro total (145);
 g. medio para determinar la concentración de sulfuro ácido lábil restando la concentración de H_2S detectada en
 20 la cámara de atrapamiento del sulfuro libre (143) de la concentración de H_2S detectada en la cámara de atrapamiento del sulfuro ácido lábil (144); y
 h. medio para determinar la concentración de azufre sulfano unido restando la concentración detectada de H_2S en la cámara de atrapamiento del sulfuro ácido lábil (144) de la concentración detectada de H_2S en la cámara de
 25 atrapamiento del sulfuro total (145).
2. El aparato de detección de sulfuro de hidrógeno (100) de la reivindicación 1, en el que la pluralidad de cámaras de reacción (123, 124, 125) comprende: una cámara de reacción del sulfuro libre (123); una cámara de reacción del sulfuro ácido lábil (124); y una cámara de reacción del sulfuro total (125).
- 30 3. El aparato de detección de sulfuro de hidrógeno (100) de la reivindicación 2, en el que la cámara de reacción del sulfuro libre (123) tiene un entorno de pH neutro, con un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5.
4. El aparato de detección de sulfuro de hidrógeno (100) de la reivindicación 3, en el que la cámara de reacción del sulfuro ácido lábil (124) tiene un entorno con un pH ácido de entre aproximadamente 2,6 y aproximadamente 6,0.
- 35 5. El aparato de detección de sulfuro de hidrógeno (100) de la reivindicación 4, en el que la cámara de reacción del sulfuro total (125) tiene un entorno con un pH ácido de entre aproximadamente 2,6 y aproximadamente 6,0 y comprende adicionalmente un agente reductor.
- 40 6. El aparato de detección de sulfuro de hidrógeno (100) de la reivindicación 5, en el que el agente reductor se selecciona entre el grupo que consiste en: clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina y ditiotreitól.
7. El aparato de detección de sulfuro de hidrógeno (100) de la reivindicación 5, en el que:
- 45 a. la cámara de atrapamiento del sulfuro libre (143) está posicionada adyacente a la cámara de reacción del sulfuro libre, de forma que el H_2S gaseoso liberado desde la cámara de reacción del sulfuro libre (123) difundirá a través de la membrana permeable al H_2S (131) y hacia la cámara de atrapamiento del sulfuro libre (143);
 b. la cámara de atrapamiento del sulfuro ácido lábil (144) está posicionada adyacente a la cámara de reacción del sulfuro ácido lábil (124), de forma que el H_2S gaseoso liberado desde la cámara de reacción del sulfuro ácido
 50 lábil (124) difundirá a través de la membrana permeable al H_2S (131) y hacia la cámara de atrapamiento del sulfuro ácido lábil (144); y
 c. la cámara de atrapamiento del sulfuro total (145) está posicionada adyacente a la cámara de reacción del sulfuro total (125), de forma que el H_2S gaseoso liberado desde la cámara de reacción del sulfuro total (125) difundirá a través de la membrana permeable al H_2S (131) y hacia la cámara de atrapamiento del sulfuro total
 55 (145).
8. El aparato de detección de sulfuro de hidrógeno (100) de la reivindicación 5 o 6, en el que cada una de la pluralidad de cámaras de atrapamiento (143, 144, 145) tiene un entorno alcalino con un pH de entre aproximadamente 9,5 y aproximadamente 10,0.
- 60 9. El aparato de detección de sulfuro de hidrógeno (100) de la reivindicación 7 u 8, que comprende adicionalmente una base (151) posicionada adyacente a la pluralidad de cámaras de atrapamiento (143, 144, 145).
10. El aparato de detección de sulfuro de hidrógeno (100) de la reivindicación 9, en el que la base (151) comprende una pluralidad de sistemas de electrodo (153, 154, 155) para permitir la detección electroquímica del H_2S en la pluralidad de cámaras de atrapamiento adyacentes (143, 144, 145), en el que opcionalmente la pluralidad de
- 65

sistemas de electrodo (153, 154, 155) comprende: un primer sistema de electrodo (153) posicionado adyacente a la cámara de atrapamiento del sulfuro libre (143); un segundo sistema de electrodo (154) posicionado adyacente a la cámara de atrapamiento del sulfuro ácido lábil (144); y un tercer sistema de electrodo (155) posicionado adyacente a la cámara de atrapamiento del sulfuro total (145).

5 11. El aparato de detección de sulfuro de hidrógeno (100) de la reivindicación 10, en el que la pluralidad de sistemas de electrodo (153, 154, 155) comprende cada uno un electrodo de referencia, un contraelectrodo y un electrodo de trabajo.

10 12. El aparato de detección de sulfuro de hidrógeno (100) de la reivindicación 9, en el que la base (151) es transparente para permitir la detección fluorimétrica o colorimétrica del H₂S en la pluralidad adyacente de cámaras de atrapamiento (143, 144, 145).

15 13. El aparato de detección de sulfuro de hidrógeno (100) de la reivindicación 9, en el que la cámara de inyección (121) está en comunicación fluida con la pluralidad de cámaras de reacción (123, 124, 125) a través de una pluralidad de canales de entrada (122a-c), en el que la pluralidad de canales de entrada (122a-c) comprende:

20 a. un primer canal de entrada (122a) que conecta la cámara de inyección (121) con la cámara de reacción del sulfuro libre (123);

b. un segundo canal de entrada (122b) que conecta la cámara de inyección (121) con la cámara de reacción del sulfuro ácido lábil (124); y

c. un tercer canal de entrada (122c) que conecta la cámara de inyección (121) con la cámara de reacción del sulfuro total (125);

25 en el que opcionalmente el aparato de detección de sulfuro de hidrógeno (100) comprende adicionalmente una tapa (111) posicionada adyacente a la cámara de inyección (121) para permitir la inyección de una muestra de prueba a través de la tapa (111) y en la cámara de inyección (121).

30 14. Un método para medir las concentraciones de sulfuro de hidrógeno libre, de sulfuro ácido lábil y de azufre sulfano unido en una muestra, método que comprende:

35 a. proporcionar un aparato de detección de sulfuro de hidrógeno (H₂S) (100) que tiene: una cámara de inyección (121); una pluralidad de cámaras de reacción (123, 124, 125) en comunicación fluida con la cámara de inyección (121); una pluralidad de cámaras de atrapamiento (143, 144, 145) posicionada adyacente a la pluralidad de cámaras de reacción (123, 124, 125), definiendo la pluralidad de cámaras de atrapamiento (143, 144, 145) una cámara de atrapamiento del sulfuro libre (143), una cámara de atrapamiento del sulfuro ácido lábil (144) y una cámara de atrapamiento del sulfuro total, teniendo cada una de la pluralidad de cámaras de atrapamiento (143, 144, 145) un entorno alcalino; y una membrana permeable al H₂S (131) posicionada entre la pluralidad de cámaras de reacción (123, 124, 125) y la pluralidad de cámaras de atrapamiento (143, 144, 145);

40 b. depositar una muestra en la cámara de inyección (121);

c. detectar la concentración de H₂S en la cámara de atrapamiento del sulfuro libre (143) para determinar la concentración de sulfuro de hidrógeno libre en la muestra;

d. detectar la concentración de H₂S en la cámara de atrapamiento del sulfuro ácido lábil (144) y en la cámara de atrapamiento del sulfuro total (145);

45 e. determinar la concentración de sulfuro ácido lábil restando la concentración de H₂S detectada en la cámara de atrapamiento del sulfuro libre (143) de la concentración de H₂S detectada en la cámara de atrapamiento del sulfuro ácido lábil (144); y

f. determinar la concentración de azufre sulfano unido restando la concentración de H₂S detectada en la cámara de atrapamiento del sulfuro ácido lábil (144) de la concentración de H₂S detectada en la cámara de atrapamiento del sulfuro total (145).

50

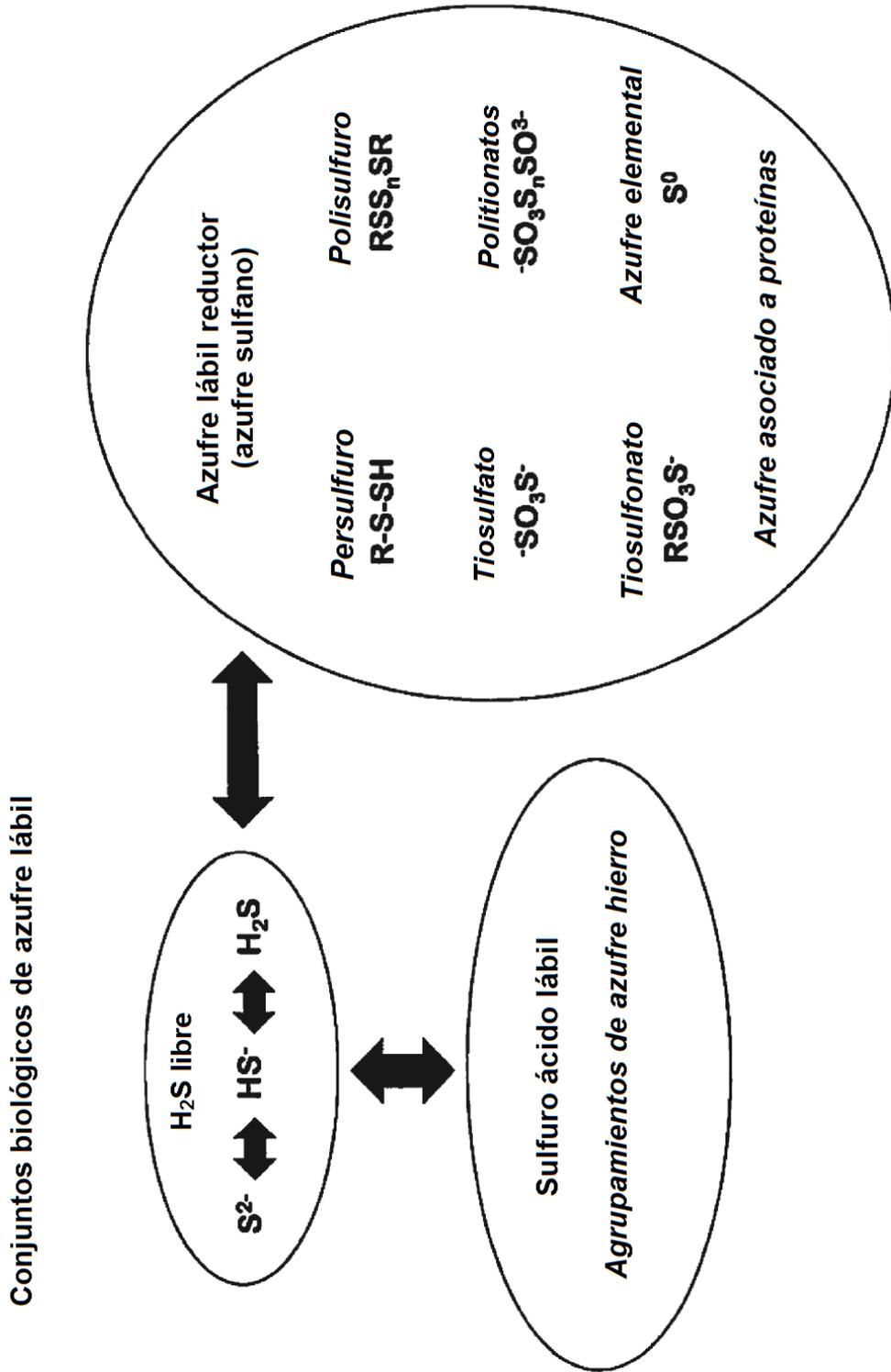


Fig. 1

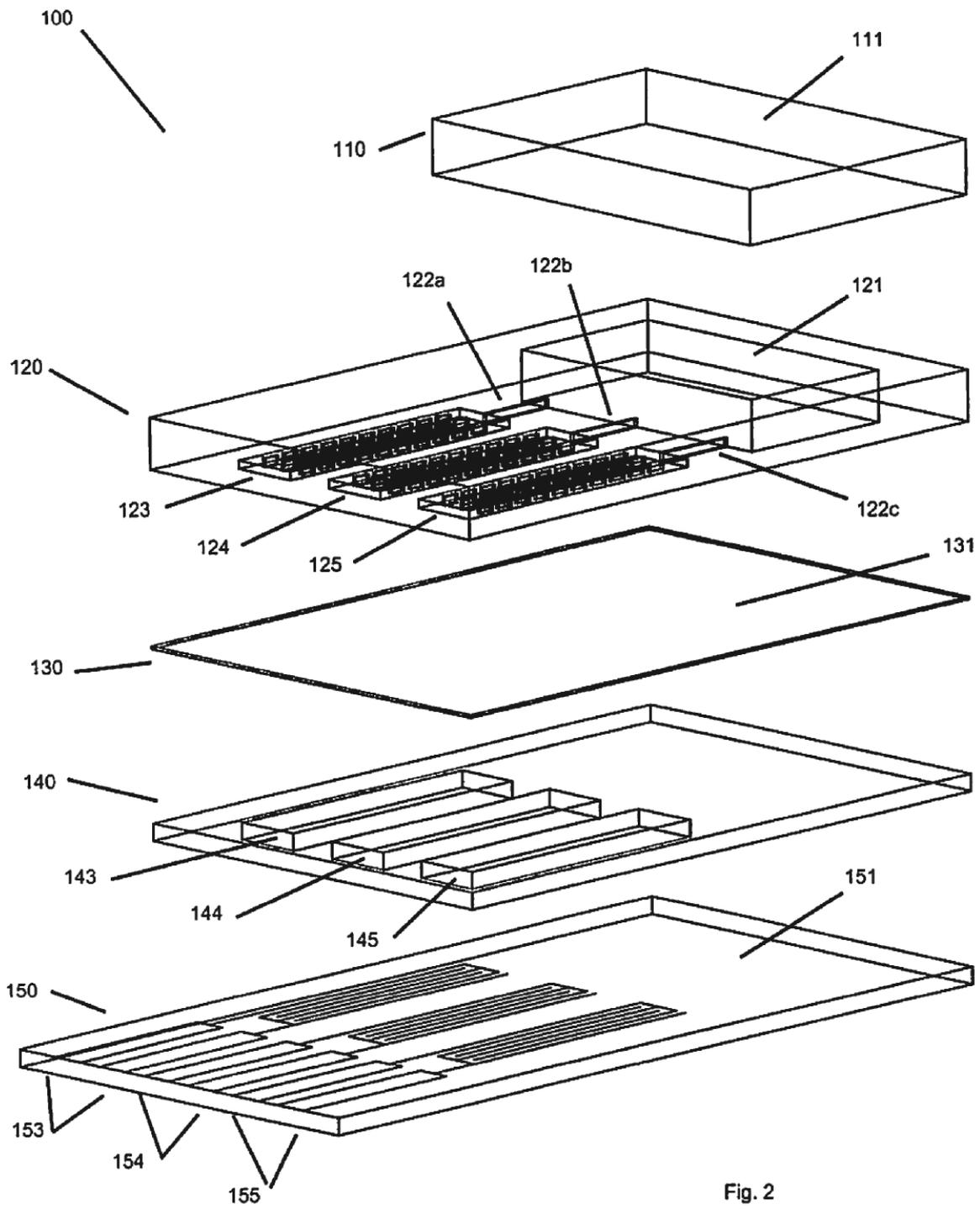


Fig. 2

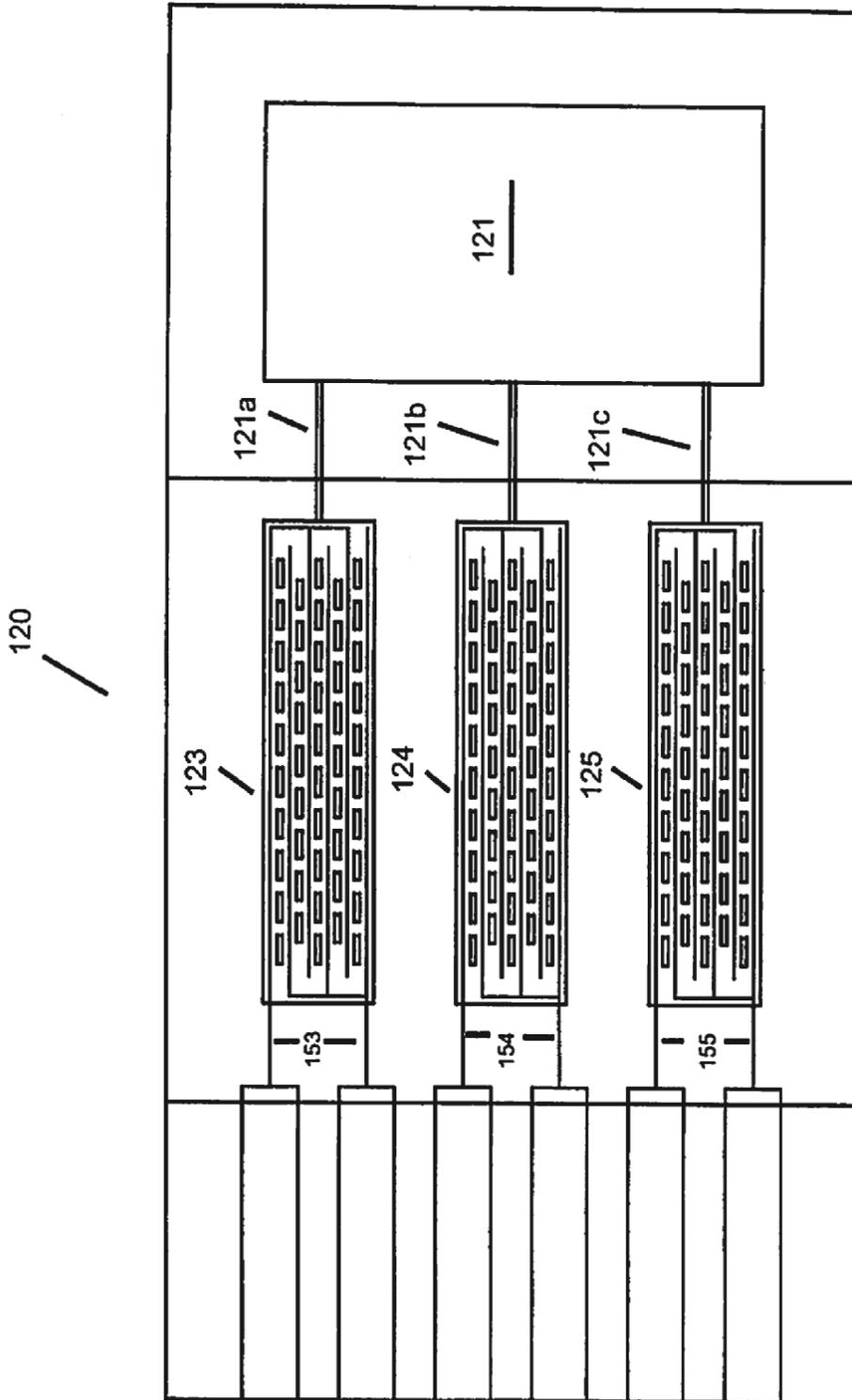
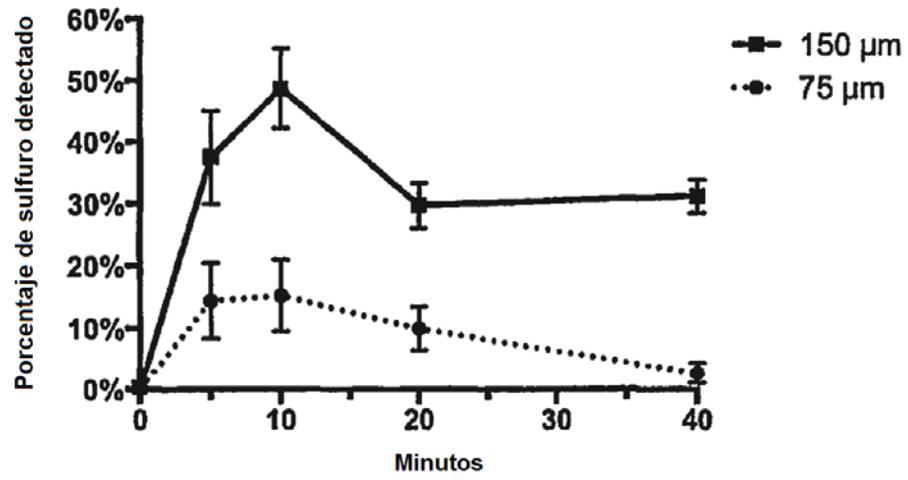
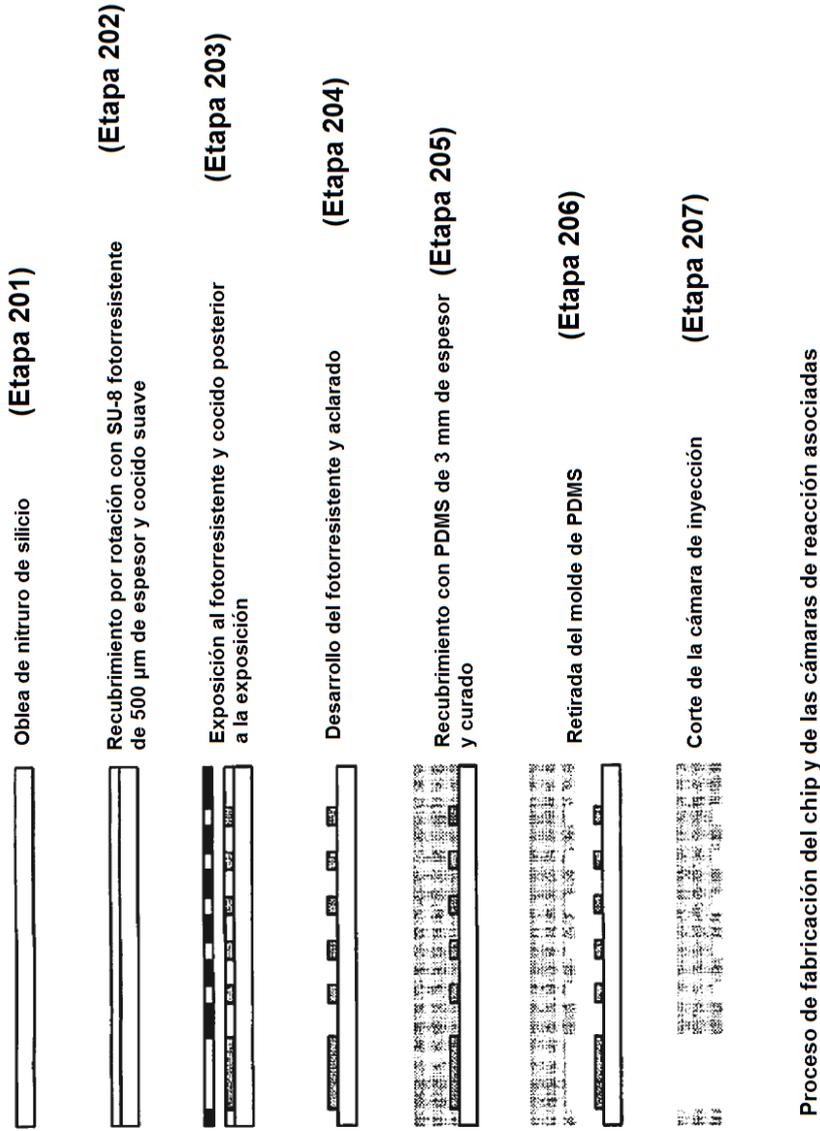


Fig. 3



Difusión del H₂S a través de los diferentes espesores de PDMS y detección de fluorescencia mediante una HPLC, que muestra la eficacia de la transferencia del H₂S gaseoso desde la cámara de reacción ácida hacia la cámara de atrapamiento medida usando un detector de MBB.

Fig. 5



Proceso de fabricación 200 del chip y de las cámaras de reacción asociadas

Fig. 6

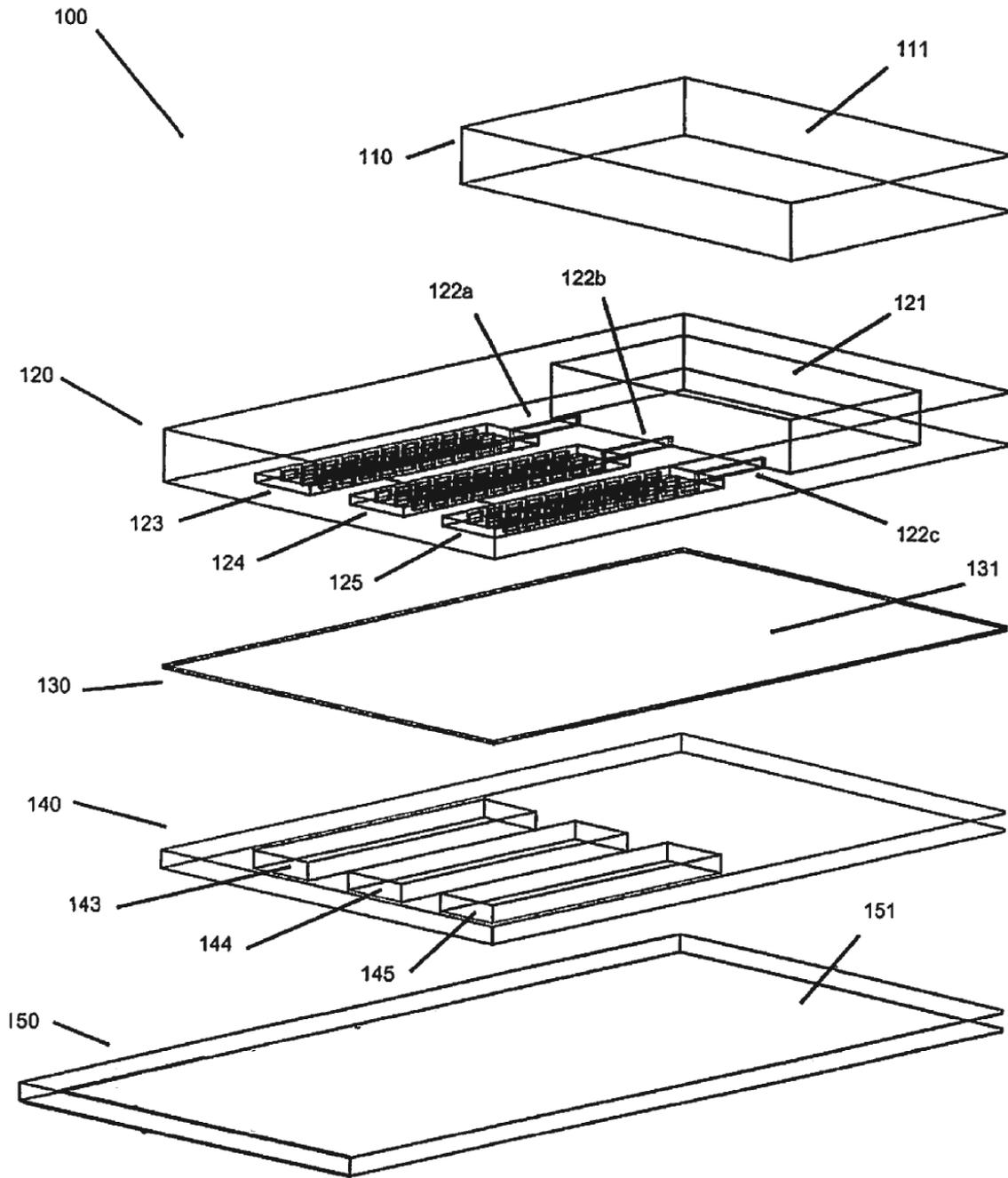


Fig. 7