

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 991**

51 Int. Cl.:

**A61B 5/145** (2006.01)  
**A61B 5/1486** (2006.01)  
**A61B 5/1495** (2006.01)  
**C12Q 1/00** (2006.01)  
**G01N 27/26** (2006.01)  
**G01N 27/327** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.08.2004 PCT/US2004/027441**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2005 WO05022143**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2004 E 04782015 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 1656554**

54 Título: **Método y aparato para el análisis de propiedades electroquímicas**

30 Prioridad:

**21.08.2003 US 496787 P**  
**15.12.2003 US 529648 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.04.2019**

73 Titular/es:

**AGAMATRIX, INC. (100.0%)**  
**7C Raymond Avenue**  
**Salem, NH 03079, US**

72 Inventor/es:

**IYENGAR, SRIDHAR G y**  
**HARDING, IAN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 709 991 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**

Método y aparato para el análisis de propiedades electroquímicas

Antecedentes de la invención

Esta solicitud se refiere a métodos y un aparato para el análisis de propiedades electroquímicas, y en particular a métodos y un aparato para la determinación de analitos, por ejemplo, glucosa, a partir de muestras de pequeño volumen. Dichos sistemas electroquímicos se conocen a partir del documento US 6 251 260 por ejemplo.

Los medios electroquímicos para cuantificar o detectar un analito se han elegido a menudo debido a su simplicidad, tanto en términos de fabricación del dispositivo como en términos de facilidad de utilización. Los sensores electroquímicos a menudo han sido en la forma de dispositivos potenciométricos o amperométricos. Los dispositivos potenciométricos miden los efectos de las cargas en los átomos y sus posiciones; los ejemplos incluyen el chemFET (transistor de efecto de campo químico) y el electrodo selectivo de iones (incluyendo los electrodos de pH). Los dispositivos amperométricos funcionan según el principio de aplicar un potencial y medir la corriente resultante, donde la magnitud de la corriente generada generalmente está relacionada con la cantidad de analito presente; alternativamente, la carga total que pasa durante un tiempo se puede utilizar para representar la cantidad de analito en una región de la muestra. Debido a que el rango de compuestos que pueden generar corrientes electroquímicas es más pequeño que los que portan cargas, los dispositivos amperométricos a menudo pueden ofrecer una mayor selectividad. Por lo tanto, se ha concentrado mucho esfuerzo en sensores amperométricos en campos tan diversos como el control del medio ambiente y la medicina.

Una demanda de un número cada vez mayor de mediciones en muestras cada vez más pequeñas con un menor coste ha hecho que los sensores amperométricos estén alcanzando un límite natural. Una antigua forma de análisis amperométrico consistía en utilizar una celda de conducción, donde el movimiento de la especie desde un electrodo al otro a través de la muestra estaba relacionado con su concentración. Este enfoque requería una calibración cuidadosa de celda a celda para corregir las variaciones en el área y la separación de los electrodos, que se expresaban como una única constante de celda para la corrección de la lectura de celda. En formas más recientes de análisis amperométrico, tomar lecturas rápidamente implicaba que solo la especie cercana al electrodo investigado tenía un efecto en el resultado. Sin embargo, con las tendencias actuales hacia muestras cada vez más pequeñas, los efectos de la reacción en un electrodo se perciben rápidamente como una interferencia no deseada en otro electrodo, e incluso si este efecto se puede eliminar (por ejemplo, mediante la utilización de un cátodo de plata/cloruro de plata), el pequeño tamaño de la muestra también implica que la pequeña cantidad de corriente que pasa será más difícil de medir con precisión. Además, las lecturas de los dispositivos desechables en miniatura se vuelven inciertas debido a los límites de tolerancia de fabricación. Por lo tanto, sería útil y beneficioso un método y un aparato para realizar el análisis electroquímico en una celda de conducción en miniatura que fuese capaz de producir sus propios factores de corrección para la fabricación, el medio ambiente y las variaciones de la muestra.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un método para evaluar una muestra en busca de la presencia de un analito seleccionado en la muestra en un sistema electroquímico que utiliza un aparato del tipo de celda de conducción. El método comprende las etapas de

- (a) introducir la muestra dentro de un espacio entre dos electrodos de una celda de conducción;
- (b) aplicar un potencial o corriente entre los dos electrodos suficiente para provocar la oxidación o reducción del analito o de un mediador en un sistema redox de detección de analitos, formando de este modo un gradiente de potencial químico del analito o mediador entre los dos electrodos;
- (c) después de que el gradiente se haya establecido, interrumpir el potencial o la corriente aplicados y obtener una señal independiente del analito que refleje la relajación del gradiente de potencial químico;
- (d) aplicar opcionalmente un potencial o una corriente entre los electrodos después de obtener la señal independiente del analito;
- (e) obtener una señal dependiente del analito durante la aplicación del potencial o la corriente en la etapa (b) o la etapa (d) o ambas, y
- (f) corregir la señal dependiente del analito obtenida en la etapa (e) utilizando la señal independiente del analito obtenida en la etapa (c) para obtener una señal corregida dependiente del analito indicativa de la presencia del analito seleccionado en la muestra.

La utilización de las dos señales, la señal independiente del analito y la señal dependiente del analito, permite una medición mejorada de la concentración del analito sobre la utilización convencional de una sola señal dependiente del analito, porque la señal independiente del analito proporciona información acerca de factores específicos de la prueba y del dispositivo específico, tales como el transporte (movilidad) del analito y/o mediador, el área eficaz de

los electrodos y la separación de electrodos (y como resultado, el volumen de la muestra), sin necesidad de valores de calibración diferentes. Esto significa que utilizando la autocalibración del método y del aparato de la invención se puede lograr que mejore la exactitud y la precisión de la medición sin aumentar el coste.

- 5 La presente invención también proporciona un aparato para utilizar en la puesta en práctica del método de la invención. El aparato comprende una carcasa en la que se aloja una electrónica efectiva para generar y observar las señales primera y segunda. En formas de realización preferidas, la carcasa es de un tamaño que puede ser portátil, y tiene una abertura para recibir una tira reactiva desechable de un solo uso del tipo conocido actualmente para el análisis de glucosa en sangre.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra las reacciones de un sistema de detección de analitos de ejemplo para el análisis de glucosa.

- 10 La Fig. 2 muestra una forma de realización de la invención.

La Fig. 3 ilustra el funcionamiento general de una celda de conductancia.

La Fig. 4 ilustra un método para realizar la autocorrección de acuerdo con la invención.

- 15 La Fig. 5 muestra los resultados de una simulación por ordenador de la relación entre la concentración de ferricianuro y la distancia normalizada a través de una celda electroquímica en diferentes momentos después de abrir el circuito de la celda.

La Fig. 6 muestra la caída de potencial como una función del tiempo para varios valores de  $P_T$ .

Las Fig. 7A-C ilustran una forma de realización de la celda electroquímica de un sensor electroquímico de celda de conducción.

La Fig. 8 muestra una celda con electrodos uno al lado del otro.

- 20 La Fig. 9 muestra una relación de ejemplo que puede existir entre  $P_T$  y la corriente medida para diferentes concentraciones de analito.

La Fig. 10 muestra curvas de calibración representativas para diferentes valores de  $P_T$ .

La Fig. 11 ilustra un ejemplo del tipo de error que puede surgir si el valor de  $P_T$  varía.

La Fig. 12 ilustra una relación entre  $P_T$  y el tiempo  $t$  empleado para alcanzar una diferencia de potencial de 0,06 V.

- 25 Las Fig. 13A-C ilustran escenarios para la corrección de una estimación debida a variaciones en  $P_T$ .

Las Fig. 14A-C ilustran formas de realización de ejemplo en forma de diagrama de flujo de la invención.

La Fig. 15 ilustra un esquema de una forma de realización de ejemplo del aparato de control del transductor.

La Fig. 16 muestra una forma de realización de un aparato de control del transductor.

- 30 La Fig. 17 ilustra una representación esquemática de la señal de relajación potenciométrica como una función del tiempo para diferentes valores de  $P_T$ .

La Fig. 18 ilustra de forma esquemática un ejemplo de cuantificación de una medida de  $P_T$  a partir de los datos medidos.

La Fig. 19 ilustra de forma esquemática señales amperométricas de ejemplo para un sistema transitorio.

- 35 Las Fig. 20A-C ilustran de forma esquemática varias señales amperométricas de ejemplo que se pueden generar mediante sistemas de biosensores basados en celdas de conducción.

Las Fig. 21A-D ilustran de forma esquemática varias disposiciones de ejemplo de electrodos, en esencia, coplanares.

La Fig. 22 muestra una vista externa de una forma de realización de un aparato de acuerdo con la invención.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

- 40 Según se utiliza en la presente memoria, el término "analito" se refiere a una especie química o biológica que un experimento o dispositivo pretende detectar y/o medir.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "interferente" se refiere a una especie química o biológica que es un agente de interferencia en el análisis del analito, que está presente en la muestra y que contribuye al error en la detección o medición.

5 Según se utiliza en la presente memoria, el término "autocorrección" se refiere a un proceso donde la información obtenida sobre un aparato durante el curso de la utilización de ese aparato se aplica a otras formas de información del aparato obtenidas durante el curso de la utilización de ese aparato para mejorar la precisión de toda o partes de la información.

10 Según se utiliza en la presente memoria, el término "celda de conducción" se refiere a un dispositivo que comprende dos electrodos en contacto con una solución, de manera que la conductancia de la solución se puede calcular haciendo pasar corriente entre los electrodos.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "celda de conductividad" se refiere a una celda de conducción.

15 Según se utiliza en la presente memoria, el término "factores de la muestra" se refiere a propiedades y/o factores relacionados con la solución de muestra a partir de los cuales se registra una señal electroquímica para medir determinadas propiedades de esa solución de muestra. Los ejemplos incluyen, entre otros, la concentración específica de analito, las concentraciones de interferentes, la viscosidad de la solución, el dieléctrico de la muestra y la carga de partículas de la muestra.

20 Según se utiliza en la presente memoria, el término "factores del aparato" se refiere a propiedades y/o factores relacionados con el aparato utilizado para medir la señal electroquímica relacionada con la solución de muestra. Los ejemplos incluyen, entre otros, la geometría de los electrodos, las dimensiones de los electrodos y las capas protectoras en el aparato, que podrían incluir mallas o recubrimientos de polímeros.

25 Según se utiliza en la presente memoria, el término "relajación potenciométrica" se refiere al cambio en el potencial con el tiempo. Un ejemplo de relajación potenciométrica incluye el cambio en el potencial entre dos electrodos cuando se ha eliminado un potencial aplicado y fluye, en esencia, corriente cero entre los electrodos. Este cambio en el potencial puede ser el resultado de cambios en los perfiles de concentración de una especie química reducida y una especie química oxidada en una muestra con la que los dos electrodos están en contacto electrolítico.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "factores ambientales" se refiere a propiedades y/o factores distintos de los "factores de la muestra" o los "factores del aparato". Los ejemplos incluyen, entre otros, la temperatura, la humedad, las vibraciones físicas y las ondas de radio ambientales.

30 Según se utiliza en la presente memoria, el término "área eficaz del electrodo" se refiere al área del electrodo que está en contacto electrolítico con la muestra. El área eficaz de los electrodos se puede variar alterando la geometría del electrodo o mediante el contacto parcial del electrodo con la muestra.

35 Según se utiliza en la presente memoria, el término "contacto electrolítico" se refiere a tener un sistema electroquímico constituido al menos por un electrodo utilizado de una manera que recopile información electroquímica de una muestra. Los ejemplos incluyen, entre otros, un electrodo en contacto físico con una muestra; un electrodo separado de una muestra mediante una membrana, una película u otro material; y un electrodo separado de una muestra mediante un medio acuoso. Los ejemplos de información electroquímica incluyen la corriente faradaica, la corriente no faradaica y el potencial químico.

40 Según se utiliza en la presente memoria, el término "estado estacionario" se refiere a una condición en la que alguna característica especificada de una condición tal como, entre otras, la velocidad, la periodicidad o la amplitud, exhibe solo un cambio insignificante durante un período de tiempo arbitrariamente largo. Esta frase también incluye una condición que existe después de que todos o casi todos los transitorios iniciales o las condiciones fluctuantes se hayan atenuado, y todas las corrientes, voltajes o campos permanezcan, en esencia, constantes, u oscilen de manera uniforme o considerablemente uniforme. Esta frase también incluye las condiciones que casi han alcanzado un estado estacionario. El término "estado-estacionario" se refiere a "estado estacionario".

45 Según se utiliza en la presente memoria, el término "RAC" se refiere a un compuesto activo redox. Estas son sustancias que pueden participar en reacciones de oxidación-reducción. Los ejemplos de RAC incluyen el ferricianuro, el ferrocianuro, el ferroceno, el oxígeno y el peróxido de hidrógeno. Se apreciará que la identificación de una especie como un compuesto activo redox depende de la celda electroquímica y las diferencias de potencial en la celda, de manera que un compuesto dado puede ser un RAC en una utilización y un activo no redox en algún otro entorno.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "NRAC" se refiere a sustancias que no son RAC.

55 El término "mediador en un sistema redox de detección de analitos" se refiere a una fuente de señal electroquímica que no es en sí misma un analito, sino que es un RAC. El "sistema redox de detección de analitos" es un sistema que permite la detección electroquímica de un analito NRAC. A modo de ejemplo, un sistema redox de detección de analitos para la detección de glucosa comprende una enzima tal como la glucosa oxidasa que es capaz de oxidar la

glucosa, y un mediador RAC que es capaz de reoxidar la enzima para restaurarla a la forma activa. La Fig. 1 muestra la reacción involucrada en un sistema redox de detección de analitos para la detección de glucosa.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "forma de onda de estímulo" se refiere a un voltaje o una corriente que se aplica al sistema sensor electroquímico, que puede ser variable con el tiempo, no variable con el tiempo, CA y/o CC.

Según se utiliza en la presente memoria, la frase "evaluar una muestra para detectar la presencia de un analito seleccionado" abarca tanto la detección cualitativa de la presencia del analito, es decir si el analito está presente o no en cantidades detectables en la muestra, la detección semicuantitativa, es decir si el analito está presente o no en una cantidad mayor que un valor umbral predeterminado, y una evaluación cuantitativa, es decir, la determinación de la cantidad numérica real del analito que está presente.

El término "señal dependiente del analito" se refiere a una señal electroquímica observada, que puede ser en forma de una corriente o potencial cambiante cuya magnitud depende de la presencia o cantidad del analito. Una señal dependiente del analito no necesita depender únicamente de la presencia o cantidad de analito, y de hecho la señal no corregida que se describe en esta solicitud generalmente depende de otros factores además de la presencia y/o cantidad de analito.

El término "señal independiente del analito" se refiere a una señal cuyas características en el dominio del tiempo dependen de factores distintos de la cantidad de analito. Se apreciará que la existencia de la señal independiente del analito depende de la presencia de analito, pero que la velocidad de caída de la señal, es decir, las características en el dominio del tiempo, no dependen de la concentración del analito, al menos en el rango de concentraciones encontradas en mediciones ordinarias.

#### Método de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para evaluar una muestra en busca de la presencia de un analito seleccionado. El método incluye la etapa de aplicar al sistema electroquímico un potencial o una corriente suficiente para provocar la oxidación o reducción del analito o de un mediador en un sistema redox de detección de analito. Esta aplicación de potencial o corriente da como resultado la formación de un gradiente de potencial químico del analito o mediador a través del espacio entre los dos electrodos.

Una vez que se establece el gradiente, el potencial o la corriente aplicada se interrumpe, dejando un dispositivo en el cual el analito o mediador en las formas reducida y oxidada se distribuye en gradientes de concentración entre los electrodos. Este gradiente establece una diferencia de potencial entre los electrodos, y en ausencia de un potencial o corriente aplicada, los gradientes y la diferencia de potencial asociada se relajan hasta un estado de equilibrio de distribución uniforme. El curso temporal de esta relajación se puede controlar controlando la diferencia de potencial. El curso temporal de la relajación depende de factores tales como el área eficaz de los electrodos, la temperatura, la separación de los electrodos, el hematocrito, pero es, en esencia, independiente de la concentración del analito.

Una vez que la caída potencial está controlada, opcionalmente se aplica de nuevo al sistema un potencial externo. Una señal no corregida dependiente del analito se obtiene a partir del control del sistema durante tanto la primera aplicación de potencial, la segunda aplicación de potencial o ambas. Se podrían utilizar ciclos adicionales de potencial de activación y desactivación, y las mediciones se podrían realizar con uno cualquiera o con una combinación cualquiera de estos ciclos. La señal dependiente del analito no corregida es generalmente una señal que es capaz de proporcionar, por sí sola, una indicación de la presencia del analito. En formas de realización preferidas de la invención, se aplica el potencial y la señal dependiente del analito es una señal de corriente derivada de la evaluación amperométrica del analito. La señal dependiente del analito también puede ser una diferencia de potencial que resulta de mantener una corriente deseada entre los electrodos. Por lo tanto, la señal dependiente del analito comprende un componente de señal que depende de la presencia/concentración del analito seleccionado, y también puede comprender componentes que dependen de otros factores, incluidos factores de la muestra, factores ambientales y factores del aparato que no dependen de la presencia o concentración del analito seleccionado.

Para proporcionar una evaluación más precisa del analito, es deseable corregir la señal original dependiente del analito para estos factores independientes del analito, y ese es el propósito de la presente invención. Por lo tanto, la etapa final de la invención es la corrección de la señal dependiente del analito no corregida en función de la caída de potencial observada independiente del analito para formar una señal corregida dependiente del analito. Esta señal se convierte preferiblemente a continuación en una salida fácil de utilizar, por ejemplo, en la forma de una pantalla visible que indique la presencia o concentración del analito en la muestra.

El potencial aplicado al sistema para generar el gradiente y en la etapa de aplicación del potencial de relajación opcional postgradiente puede ser un potencial variable con el tiempo o invariante con el tiempo. Las publicaciones PCT WO 03/060154 y WO 03/069304, describen cada una la utilización de potenciales variables en el tiempo para generar una señal dependiente del analito.

La Fig. 2 ilustra una forma de realización de la invención, en la que se realizan correcciones para las variaciones de medición que pueden surgir en un sensor electroquímico de celda de conductancia a partir de fuentes distintas a la concentración del analito. Todas las flechas representan un conjunto de canales de comunicación, a menos que se indique lo contrario, y pueden incluir, entre otros, la transmisión eléctrica por medio de conductores físicos, la transmisión inalámbrica y múltiples canales de comunicación.

Según se muestra en la Fig. 2, un aparato de control del transductor (TCA) 5 aplica una señal de forma de onda de estímulo 10 a una celda electroquímica 50. La celda electroquímica 50 se basa en una celda de conducción y está compuesta por al menos dos electrodos, indicados por el electrodo A 55 y el electrodo B 60. La muestra 70 está en contacto electrolítico con al menos el electrodo A 55 y el electrodo B 60 y está compuesta de compuestos activos redox 65 y compuestos activos no redox 80. El TCA 5 tiene medios de funcionamiento como potenciostato y como galvanostato y puede cambiar entre los dos modos según sea necesario. En el funcionamiento como potenciostato, se aplica un potencial y se genera una corriente. El potencial se determina en función de las propiedades redox del analito o mediador a oxidar/reducir en los electrodos. En el funcionamiento como galvanostato, se aplica una corriente y se genera un potencial.

La señal de forma de onda de estímulo 10 hace que se genere una señal electroquímica 75 en cada uno de los electrodos, indicados por el electrodo A 55 y el electrodo B 60 por al menos uno de los RAC 65 y/o al menos uno de los NRAC 80 en la muestra 70. La señal 10 puede ser una señal de corriente o una señal de potencial. La señal 10 puede ser, en esencia, cero amperios, en esencia, no cero amperios, en esencia, cero voltios y/o, en esencia, no cero voltios. Esta señal de respuesta 75 se detecta y se mide mediante el aparato de control del transductor 5. La señal 75 puede ser una señal de corriente o una señal de potencial.

Para facilitar el procesamiento digital de la señal de forma de onda de estímulo 10 y la señal de respuesta 75, se puede utilizar un convertidor analógico a digital (ADC) 15 para convertir las señales analógicas en una señal digital. Para filtrar se puede utilizar un filtro antiplegramiento junto con el ADC y la señal se filtra antes de digitalizarse. Un experto en la técnica reconocerá la posibilidad de que un filtro de este tipo pueda ser parte del propio ADC.

Un aparato de cálculo 25 recibe la señal digitalizada desde el ADC 15 para su procesamiento. El aparato de cálculo se programa para ejecutar un proceso de corrección 30, e incluye el almacenamiento de datos 35, por ejemplo, en la forma de un disco de almacenamiento de datos, disco óptico o memoria grabable que puede almacenar tanto comandos de programa y datos de referencia como resultados.

El proceso de corrección 30 utiliza funciones y/o ecuaciones almacenadas en el almacenamiento de datos 35 para modificar la señal para corregir las variaciones en la señal que pueden surgir de fuentes distintas a la concentración del analito y calcular las cantidades derivadas útiles. Un ejemplo de una cantidad derivada útil es la concentración del analito deseado en la muestra. El proceso de corrección 30 también puede hacer uso de los datos de calibración que puedan estar contenidos en el almacenamiento de datos 35.

Las cantidades derivadas se envían a continuación a una salida 45 de una manera útil. Ejemplos de una manera útil de salida son tener la concentración del analito mostrada al usuario en una pantalla visual o tener la concentración del analito transmitida y almacenada en medios electrónicos. En el caso de una determinación puramente cualitativa, la salida útil puede ser en la forma de una pantalla binaria, tal como una condición Sí/No, rojo/verde, encendido/apagado en una pantalla iluminada o una señal audible.

En una forma de realización de la invención, se aplica un potencial entre los electrodos de la celda, y se mide la corriente generada como resultado de este potencial aplicado como la señal dependiente del analito. El potencial se puede aplicar hasta que se alcance una corriente de estado estacionario, y a continuación se mide la corriente. Alternativamente, la corriente se puede medir en un transitorio de corriente, antes de que se alcance el estado estacionario.

Cuando se toma la medición en el método de la invención, se sitúa una muestra entre dos electrodos y consta de una especie electroquímicamente activa tanto en las formas oxidada como reducida. Una de estas formas se encuentra en una concentración relacionada con la cantidad de un analito de interés. La otra forma está en exceso. Se aplica una diferencia de potencial entre los electrodos que provoca la oxidación de la forma reducida en un electrodo y la reducción de la forma oxidada en el otro. Esto genera

(i) una diferencia en los potenciales químicos en los entornos de la solución cerca de los dos electrodos; y

(ii) una corriente eléctrica en el circuito que conecta los dos electrodos.

La diferencia en los potenciales químicos crea un gradiente de concentración de ambas formas de la especie electroquímicamente activa que fomenta la difusión. Al mantener una diferencia constante en los potenciales químicos, la difusión puede alcanzar un estado estacionario y la corriente eléctrica puede alcanzar un nivel constante.

Eliminar la comunicación eléctrica entre los dos electrodos evita el mantenimiento de los gradientes de concentración, los cuales comienzan a debilitarse debido a la difusión. El debilitamiento de los gradientes de

concentración da como resultado cambios en los potenciales químicos cerca de cada electrodo. Los cambios se pueden controlar midiendo la diferencia de potencial entre los dos electrodos. La magnitud de la corriente eléctrica medida que fluyó entre los dos electrodos en la aplicación de un potencial constante se encuentra que depende, en esencia, de la concentración del analito y depende, en esencia, de la movilidad de la especie electroquímicamente activa. Los cambios en el potencial entre los electrodos después de aislarlos eléctricamente se encuentra que dependen, en esencia, de la movilidad, pero no dependen, en esencia, de la concentración del analito. Una medida de la concentración del analito que sea, en esencia, independiente de la movilidad se puede obtener de una combinación adecuada de estas dos.

Se puede generar una diferencia de potencial químico adecuada mediante la aplicación de un potencial constante o un potencial que puede variar sin desestabilizar, en esencia, el potencial químico, tanto para mantener una corriente estacionaria (por ejemplo, cronopotenciometría) como para estimular otros aspectos del sistema (por ejemplo, espectroscopia de impedancia de ca).

Se puede generar una perturbación adecuada de los potenciales químicos mediante la aplicación de un potencial eléctrico de manera que el cambio en los potenciales químicos se pueda controlar mediante el aislamiento eléctrico posterior de los electrodos, sin llegar nunca a un estado estacionario de la corriente eléctrica. En este caso, se mide una corriente transitoria que depende, en esencia, de la concentración del analito y de la movilidad de la especie electroquímicamente activa. Los cambios en el potencial entre los electrodos después de aislarlos eléctricamente se encuentra nuevamente que dependen, en esencia, de la movilidad, pero no son, en esencia, dependientes de la concentración del analito. Una medida de la concentración del analito que sea, en esencia, independiente de la movilidad se puede, por lo tanto, obtener nuevamente mediante una combinación adecuada de estas dos. Si bien la forma de la interdependencia puede variar del caso del estado estacionario, se mantiene la capacidad de eliminar la dependencia de la movilidad.

En otra forma de realización de la invención, se aplica una corriente entre los electrodos de la celda, y la diferencia de potencial generada como resultado de este potencial aplicado se mide como la señal dependiente del analito. La corriente se puede aplicar hasta que se alcance un potencial de estado estacionario, y a continuación se mide la diferencia de potencial. Alternativamente, la diferencia de potencial se puede medir en un transitorio de potencial, antes de que se alcance el estado estacionario.

En estas formas de realización de ejemplo, el diseño de la celda electroquímica, las formas de onda de estímulo y los procesos de análisis de señales se diseñan para mejorar la medición realizada por un sistema sensor de celda de conductancia para reducir los errores de las variaciones distintas a la concentración del analito deseado.

La utilización de una celda de conductancia para medir la concentración y las propiedades de transporte de sustancias químicas se había descrito previamente (MacInnes, 1939). En el caso particular de una especie cargada, tal como un ion, hay normalmente cuatro factores que contribuyen a las propiedades de transporte de la especie (Crow, 1998): gradientes de concentración, gradientes de potencial, gradientes de temperatura, convección (por ejemplo, por agitación mecánica). Para el caso de un sistema sensor electroquímico, generalmente se asume que los gradientes de concentración y los gradientes de potencial son los factores que contribuyen significativamente a las propiedades de transporte. Además, Schmidt-Weinmar (1967) indica que los efectos de convección se pueden eliminar de manera eficaz de los sistemas de celdas de conductancia colocando los electrodos separados una distancia menor de 200 micrones, y preferiblemente menor de 150 micrones.

La Fig. 3 ilustra un principio general de una celda de conductancia convencional. La figura hace referencia a un sistema específico que emplea un par redox ferricianuro/ferrocianuro. Se hace referencia a este par como un ejemplo no limitativo, y no pretende ser una indicación de que este par sea el único que se puede emplear. Se colocan dos electrodos 100 y 105 con una configuración, en esencia, paralela en contacto electrolítico con una muestra que contiene la especie de interés. La geometría de la celda de conducción no limita la invención. Los principios de funcionamiento son válidos con muchas otras geometrías, incluyendo las configuraciones orientadas no en paralelo, diferentes áreas para cada electrodo y configuraciones coplanares. En este ejemplo, los compuestos activos redox (RAC) son ferricianuro 125 y ferrocianuro 120, que forman un par redox. Una fuente de potencial 110 impone una diferencia de potencial entre los dos electrodos. En este ejemplo, el electrodo de cátodo 100 actúa como el cátodo, donde se produce una reacción de reducción para convertir el ferricianuro 125 en ferrocianuro 120; y el electrodo de ánodo 105 actúa como el ánodo donde se produce una reacción de oxidación para convertir el ferrocianuro 120 en ferricianuro 125. En este proceso, se transfiere un electrón 115 desde el ánodo 105 al cátodo 100 por cada molécula que reacciona en un electrodo dado. Las flechas 135 y 130 representan un proceso de transporte, tal como la difusión, que contribuye al transporte de especies en la muestra.

En algunas formas de realización de la invención, las especies analíticas medidas se pueden producir, consumir y/o alterar mediante otras reacciones químicas. La Fig. 1 ilustra un ejemplo de esto en un biosensor ligado a enzimas en el que un sustrato, tal como la glucosa 500, reacciona con una enzima, tal como la glucosa oxidasa, para convertir la enzima de un estado oxidado, GODox 510 a un estado reducido, GODred 515. El ferricianuro 525, por ejemplo, puede reaccionar con la enzima reducida GODred 515 para convertirla en su forma oxidada GODox 510, siendo reducido en el proceso a ferrocianuro 520. Por lo tanto, la cantidad de ferricianuro y ferrocianuro, en este ejemplo, se puede modificar por otros procesos que puedan ocurrir en la muestra tanto antes, durante como después de la

medición. La determinación de la concentración de ferrocianuro, en este ejemplo, se puede relacionar con la concentración de glucosa.

Las celdas de conducción, tal como la que se ilustra en la Fig. 3, se pueden utilizar para determinar la concentración y las propiedades de transporte del analito o la especie RAC a través del medio de muestra (MacInnes, 1939). Dichas celdas se pueden utilizar aplicando tanto un potencial de CC como un potencial de CA entre los electrodos. Se han utilizado potenciales de CA para minimizar los productos de reacción electroquímica en cada electrodo; sin embargo, dependiendo de las necesidades de la aplicación, se podría utilizar cualquier método para determinar las propiedades de transporte del analito.

Para determinar las propiedades de transporte de una celda de conductancia, se mide la corriente que fluye a través de la celda en respuesta a un voltaje. La resistencia de la celda se calcula tomando la relación del voltaje aplicado a la corriente resultante. La conductividad,  $\kappa$ , de la muestra se puede calcular mediante:

$$\kappa = \frac{h}{RA}$$

donde  $h$  es la distancia entre los electrodos,  $R$  es la resistencia y  $A$  es el área de cada electrodo, que se supone que es igual. La constante de celda de una celda de conductancia,  $K_{celda}$ , se define por la cantidad:

$$K_{celda} = \frac{h}{A}$$

Por lo tanto, si se conoce la constante de celda para una celda de conductancia, entonces se puede determinar la conductividad de una muestra desconocida midiendo la resistencia a través de la celda de la siguiente manera:

$$\kappa = \frac{K_{celda}}{R}$$

Dado que la conductividad de la muestra es una función de la concentración y las propiedades de transporte del analito, la técnica anterior ha establecido por lo tanto un método para determinar las propiedades de transporte, tales como el coeficiente de difusión y la movilidad de un analito debido a los gradientes de concentración y los gradientes de potencial, respectivamente, que puedan existir en un sensor electroquímico de celda de conductancia. La forma en que la conductividad se relaciona con factores tales como las propiedades de transporte y la concentración depende de la naturaleza específica de la configuración experimental.

Para que este método tenga éxito, la constante de celda debe ser conocida. El método convencional para hacer esto es calibrar la celda utilizando una muestra de conductividad conocida para determinar la constante de celda y a continuación utilizar la misma celda para medir la conductividad de una muestra desconocida (MacInnes, 1939).

También se conocen variaciones de este método. Las mediciones de conductancia se han utilizado de manera rutinaria para determinar tanto las concentraciones como las propiedades de transporte en las muestras. Por ejemplo, en la purificación de agua, la concentración de especies iónicas se ha determinado mediante mediciones de conductancia. En otro ejemplo, las propiedades de difusión de un analito se han utilizado para determinar el nivel de materia particulada en una muestra. En particular, se pueden utilizar mediciones de conductancia para determinar el nivel de hematocrito en muestras de sangre. Un ejemplo de cuándo esto se vuelve particularmente importante es en los sensores electroquímicos de glucosa en sangre; la lectura del sensor se puede ver afectada significativamente por el nivel de hematocrito o la viscosidad de la muestra de sangre, ya que las propiedades de transporte, tales como la difusión y/o la migración, se ven afectadas.

Por ejemplo, la materia particulada como el hematocrito y otros factores, tales como el contenido de proteínas, quilomicrones y plaquetas, pueden afectar a las propiedades de transporte de muchas de las especies químicas involucradas en la realización de mediciones de glucosa en sangre. Por lo tanto, se ha mostrado mucho interés en la cuantificación de los efectos que tienen las propiedades de transporte en la determinación de las concentraciones de analito, tales como la glucosa, que se calculan mediante instrumentos analíticos. Muchos factores pueden afectar el transporte, incluyendo, entre otros, la migración debida a un campo eléctrico, la difusión debida a un gradiente de concentración y la convección debida al movimiento de la muestra o la temperatura; y que se puede utilizar un enfoque análogo para corregir las variaciones de transporte que resultan de estos factores. Los efectos de la convección se pueden minimizar, y eliminar eficazmente, al tener los electrodos en un sistema de celdas de conducción separados menos de 200 micras, y más preferiblemente, menos de 150 micras (Schmidt-Weinmar, 1967).

La Fig. 3 ilustra una forma de realización de ejemplo de una celda que se puede utilizar para la medición. En este caso, el analito objetivo es el ferrocianuro 120, que en este ejemplo se considera una especie minoritaria. El ferricianuro 130 en este ejemplo se considera que está en exceso, siendo de este modo una especie mayoritaria. La

5 aplicación de un potencial eléctrico suficientemente grande entre los electrodos 100 y 105 en contacto con la muestra cambiará el potencial químico de la solución cercana, ya que la concentración de las especies minoritarias en una de ellos cae muy cerca de cero, mientras que su concentración en el otro electrodo aproximadamente se dobla. En un ejemplo, si el electrodo A 105 está a un potencial suficientemente más alto que el electrodo C, entonces ocurre un proceso de oxidación en el electrodo A 105 y ocurre un proceso de reducción en el electrodo C 100. Un experto en la técnica reconocerá que el potencial aplicado también puede afectar la distribución de especies iónicas y que esto se puede expresar de forma más completa mediante el potencial electroquímico, que incluye los efectos de esto. Por lo tanto, el patrón subyacente de comportamiento descrito aquí en términos del potencial químico es por lo tanto solo para fines ilustrativos y no se debe tomar como una convención. Otras expresiones de fuerzas de equilibrio en las especies distintas de las descritas específicamente en la presente memoria están dentro del alcance de la presente invención. Los ejemplos de dichas fuerzas incluyen una fuerza termodinámica tal como la de un gradiente de concentración descrito en Atkins (1999) y la fuerza debida al movimiento del medio como en la convección.

15 En un ejemplo de un método para extraer la constante de celda,  $K_{celda}$ , mediante la aplicación de un voltaje a la celda y a continuación eliminando la comunicación eléctrica, extraído a partir de un modelo de circuito equivalente, la cantidad de carga almacenada en la celda de conducción mediante la creación de gradientes de concentración se puede expresar como:

$$\text{Carga almacenada} = nF * [\text{ferrocianuro}] * (\text{volumen de celda})$$

Por lo tanto, se produce una capacitancia al cargar al voltaje aplicado  $V_{app}$ .

20  $\text{Capacitancia} = (\text{carga almacenada}) / V_{app}$

$$\text{Capacitancia} = nF * [\text{ferrocianuro}] * (\text{volumen de celda}) / V_{app}$$

Al eliminar la comunicación eléctrica entre los electrodos se deja que la carga almacenada se descargue solo a través de la resistencia  $R$  de la celda. En este modelo de circuito equivalente, se puede entonces determinar la constante de tiempo de esta descarga mediante métodos estándar a partir de la variación de potencial entre electrodos a lo largo del tiempo, donde:

$$\text{Constante de tiempo} = R * \text{Capacitancia}$$

Puesto que la conductividad,

$$\kappa = K_{celda} / R = \gamma * [\text{ferrocianuro}]$$

donde  $\gamma$  es una constante de proporcionalidad, esto implica

30  $R = K_{celda} / (\gamma * [\text{ferrocianuro}])$

por lo tanto, la

$$\text{Constante de tiempo} = nF * (\text{volumen de celda}) * K_{celda} / (\gamma * V_{app})$$

que es una medida de  $K_{celda}$  independiente de la concentración.

35 Otro ejemplo de forma de realización desde la perspectiva de las movilidades de iones considera un gradiente de potencial a lo largo de la distancia entre los dos electrodos que se crearán mediante la aplicación de un voltaje a la celda. El movimiento de especies a lo largo de este gradiente se ha descrito en la técnica anterior para la corriente en una celda de conducción (MacInnes, 1939). El movimiento de ferrocianuro en un sistema de este tipo se ha descrito en términos de su movilidad,  $U$ , en respuesta a un campo eléctrico,  $\vec{E}$ . Esta ecuación aparece como:

$$I_s = \beta \vec{E} U A \frac{C}{h}$$

40  $K_{celda} = \frac{h}{A}$

$$s = -U \vec{E}$$

$$I_s = -\beta C A \frac{s}{h}$$

donde  $I_s$  es la corriente de estado estacionario,  $\beta$  es una constante de proporcionalidad,  $s$  es la velocidad de deriva y  $\vec{E}$  es el campo eléctrico. La relación de  $h$  a  $A$  se calculó normalmente en una etapa de calibración utilizando una norma conocida para proporcionar la constante de celda,  $K_{celda}$ . (Atkins, 1999). La velocidad de deriva se da como un número negativo en este ejemplo, ya que la corriente se considera transportada por iones negativos; por lo tanto, la velocidad de deriva de los iones cargados negativamente será en la dirección opuesta al campo eléctrico aplicado. Otras ecuaciones son posibles para  $I_s$ , dependiendo de la naturaleza del aparato. En este ejemplo, hay una serie de variables que pueden distorsionar la información de concentración extraída de la corriente electroquímica. En mediciones prácticas, la constante de celda puede variar de celda a celda ya que las variaciones de fabricación pueden alterar los factores geométricos que afectan a la constante de celda. Además, cuando se analizan muestras reales, tales como sangre entera para la determinación de glucosa, las propiedades de transporte de los analitos, tales como la velocidad de deriva, pueden variar mucho entre muestras. Por ejemplo, se sabe que el nivel de hematocrito afecta el movimiento de especies químicas en sangre. Por lo tanto, las variaciones de la señal debidas a factores distintos de la concentración, tales como las variaciones de la constante de celda y la velocidad de deriva, pueden alterar significativamente la concentración de glucosa estimada a partir de un sistema sensor electroquímico.

La dificultad, por lo tanto, es ser capaz de cuantificar el error introducido por variaciones distintas de la concentración del analito, tales como las variaciones en la geometría de la celda y en las propiedades de transporte, para corregir las estimaciones de la concentración del analito. Un método y un aparato para realizar una autocorrección de este tipo serían útiles. Las formas de realización de esta invención describen un aparato y un método innovadores para determinar y corregir las fuentes ambientales de variación de la medición, es decir, fuentes distintas de la concentración, sin un conocimiento a priori del área del electrodo, la separación de los electrodos, la velocidad de deriva o la movilidad.

Un método y un aparato análogos se pueden utilizar para el movimiento de especies provocado por un gradiente de concentración. En esta forma de realización de ejemplo, un gradiente de concentración a lo largo de la distancia entre los dos electrodos se creará por las reacciones electroquímicas y el movimiento de especies a lo largo de este gradiente que se puede describir por la ley de difusión de Fick:

$$\text{Flujo} = -D \frac{dc}{dx}$$

donde  $D$  es un coeficiente de difusión,  $dc/dx$  es el gradiente de concentración a lo largo de un eje particular y Flujo es la cantidad de sustancia que se mueve a través de un área unidad perpendicular a este eje en un tiempo unidad. En un ejemplo donde el flujo alcanza un estado estacionario y donde los electrodos son paralelos, las estructuras planas con la muestra entre ellas dan un área mojada,  $A$ , en cada electrodo y donde los electrodos se separan por una distancia,  $h$ , entonces el flujo para una concentración inicial de portadores minoritarios,  $C$ , será:

$$\text{Flujo} = -D \frac{2C}{h}$$

Si  $n$  electrones son intercambiados por molécula de portador minoritario consumido electroquímicamente en un electrodo o generado electroquímicamente en el otro entonces la corriente, de estado estacionario,  $I_s$ , generada por el movimiento del portador minoritario se puede proporcionar mediante:

$$I_s = nFDA \frac{2C}{h}$$

donde  $F$  es la constante de Faraday. Por lo tanto, el movimiento de un ion en términos de su movilidad  $U$  bajo la fuerza de un campo eléctrico  $\vec{E}$  es equivalente a su movimiento en términos de su coeficiente de difusión (con un ajuste adecuado de unidades) y, por lo tanto, el término  $nFD$  se puede expresar como  $\beta \vec{E} U$  (Atkins, 1999). Por lo tanto, la invención también se puede aplicar a un sistema en términos de su difusión.

De acuerdo con una forma de realización de la invención, la estimación de la concentración del analito se puede mejorar mediante la determinación y corrección de los errores introducidos por variaciones desconocidas en los factores del aparato, tales como la geometría de la celda, y factores de la muestra, tales como la composición de la muestra. Un reto importante en los sensores químicos es determinar la concentración del analito objetivo con precisión, ya que las variaciones en el entorno de medición, tales como la separación de los electrodos o la viscosidad, pueden afectar la estimación de la concentración del analito. Un aparato y un método que sea sensible a los efectos de dichas variaciones pero que sea, en esencia, independiente de la concentración del analito se podría utilizar para estimar y corregir estas fuentes de variación.

De acuerdo con una forma de realización, el error en la estimación de la concentración del analito que surge de diferentes áreas eficaces de los electrodos se puede reducir utilizando un aparato y un método que sean sensibles a los efectos de variar las áreas de los electrodos, pero que sean independientes de, o menos dependientes de, la

concentración del analito. Esto se podría utilizar para determinar el área del electrodo y, por lo tanto, permitir que se aplique una corrección a la estimación de la concentración que explique esta variación.

De acuerdo con una forma de realización, el error en la estimación de la concentración del analito que surge a partir de diferentes propiedades de transporte de analitos en muestras se puede reducir utilizando un aparato y un método que sean sensibles a estas propiedades, pero sean independientes de, o menos dependientes de, la concentración del analito. Esto se podría utilizar para determinar las movilidades de los analitos en las muestras y por lo tanto permitir que se aplique una corrección a la estimación de la concentración del analito que corrige estas.

Las formas de realización de la invención se refieren a la determinación de determinados parámetros del sistema de medición que pueden afectar a la señal medida y, por lo tanto, a la concentración estimada. En una forma de realización, los parámetros geométricos de la celda y las propiedades de transporte de la muestra se consideran como factores de la muestra y factores del aparato representativos, distintos de la propia concentración del analito, que pueden afectar a la señal medida. Los efectos de un componente de la constante de celda,  $h$ , y la velocidad de deriva,  $s$ , se pueden combinar en un parámetro de transporte eficaz ( $P_T$ ) y se puede considerar por separado del término del área del electrodo. En particular,  $P_T$  puede proporcionar mediante:

$$P_T = -\frac{h}{s}$$

$$C = -\frac{\kappa_{celda} I_s}{\beta s} = -\frac{I_s h}{\beta s A} = \frac{I_s P_T}{\beta A}$$

Un experto en la técnica reconocerá que se puede proporcionar una expresión análoga para un sistema bajo la influencia de un gradiente de concentración que se describe mejor en términos de un coeficiente de difusión. En este caso,  $P_T$  se puede proporcionar de la siguiente manera:

$$P_T = \frac{h}{D}$$

$$C = \frac{\alpha \kappa_{celda} I_s}{D} = \frac{I_s h}{2nFDA} = \frac{I_s P_T}{2nFA} = \frac{\alpha I_s P_T}{A}$$

$$\alpha = \frac{1}{2nF}$$

El área eficaz de electrodo,  $A$ , se puede encontrar mediante un método según se describe en la solicitud de patente WO 03/069304. Por lo tanto, un método para determinar  $P_T$  permite una caracterización completa de las condiciones de medición y permite una estimación más precisa de la concentración. En una forma de realización preferida,  $P_T$  se determina, en esencia, independientemente del área del electrodo y, en esencia, independientemente de la concentración del analito. Sin embargo, esto no es un requisito y no limita el alcance de la invención. Una forma de realización de la invención describe un método y un aparato que permiten tanto que los factores del aparato, tales como las propiedades geométricas de la celda, como los factores de la muestra, tales como las propiedades de transporte de la muestra, se encuentren simultáneamente, lo que permite una autocorrección más completa de las variaciones en la señal medida que surgen de factores ambientales, factores de la muestra y factores del aparato. La técnica anterior en la utilización de celdas de conducción normalmente ha requerido que cada celda de conducción sea calibrada en una etapa separada de este tipo y no proporciona un medio para la autocorrección de las variaciones en la señal medida que surgen de factores ambientales, factores de la muestra y factores del aparato.

La Fig. 4 ilustra un método para realizar la autocorrección de dichas variaciones para aumentar la precisión de la concentración del analito estimada. Este diagrama es una forma de realización ilustrativa y no limita la invención. Un experto en la técnica reconocerá la posibilidad de que estas etapas no tengan necesariamente que ejecutarse en el orden establecido. Se aplica una muestra a la celda (etapa 200), a continuación, se aplica una señal de potencial a la celda (etapa 205). Esta señal de potencial debe ser de tal manera que se produzca un proceso de reducción y/u oxidación en al menos uno de los electrodos en la celda. Un experto en la técnica reconocerá que la señal de potencial no se necesita aplicar necesariamente después de que la muestra se aplique a la celda, sino que la muestra se puede aplicar a la celda después de que se aplique la señal. Se determina una corriente de estado estacionario a partir de la celda (etapa 210). Esta corriente no necesariamente tiene que ser una corriente invariable con el tiempo, ya que las corrientes variables con el tiempo también se pueden clasificar como de estado estacionario si las características que describen la señal se aproximan a un valor estacionario.

Una vez que se ha determinado esta corriente de estado estacionario, entonces se abre el circuito de la celda (etapa 215) y se determina el potencial transitorio entre los dos electrodos (etapa 220). Un experto en la técnica reconocerá

la posibilidad de que otros métodos mantengan una corriente electrónica, en esencia, cero entre los electrodos que no estén en circuito abierto en la celda. Un ejemplo de otro método incluye la utilización de un interruptor de alta impedancia, tal como un transistor. La forma de realización de ejemplo de abrir el circuito de la celda (etapa 215) es un ejemplo y no limita la invención. Los factores de corrección para las variaciones ambientales, por ejemplo, las que surgen de las variaciones en la velocidad de deriva, la movilidad, el coeficiente de difusión y/o de la constante de celda, se puede determinar (etapa 225) en función de la información de la corriente de estado estacionario antes de que se haya abierto el circuito de la celda y del potencial transitorio después de que se haya abierto el circuito de la celda. Los factores de corrección se pueden utilizar a continuación para corregir la señal de estado estacionario medida para las variaciones provocadas por las fuentes ambientales (etapa 230) y la estimación de la concentración corregida se puede calcular y producir de forma útil (etapa 235). Un experto en la técnica reconocerá la posibilidad de que la corrección de las fuentes de variaciones ambientales no tenga que ser una etapa distinta separada, sino que se puede integrar con el cálculo de la concentración. Un experto en la técnica también reconocerá que la información de otros parámetros de la muestra que no sean la concentración del analito también se puede obtener a partir de los factores de corrección como información valiosa e independiente. Ejemplos de dichos parámetros incluyen el hematocrito, la temperatura y la viscosidad.

En una forma de realización, después de que se determina  $I_s$ , se abre el circuito, y se determina el potencial transitorio entre los electrodos. Una forma de realización de realizar esto es hacer que el aparato de medición y control cambie desde un modo de funcionamiento potencioestático, donde se aplica un potencial y se determina una corriente, a un modo de funcionamiento galvanostático, donde se mantiene una corriente establecida (en este caso, casi 0 amperios) y se determina un potencial. Un experto en la técnica reconocerá que son posibles otras formas de realización, distintas de la de abrir el circuito de la celda, para lograr, en esencia, cero amperios. Un ejemplo es utilizar un interruptor de alta impedancia, tal como un transistor, para restringir la corriente que fluye en el circuito a, en esencia, cero amperios. El ejemplo de abrir el circuito de la celda es una forma de realización de ejemplo y no limita la invención.

Una vez que se ha establecido una corriente de estado estacionario, habrá un gradiente de concentración entre los dos electrodos. Un factor que está relacionado con  $P_T$  se puede determinar midiendo la velocidad de relajación de los potenciales de electrodo después de eliminar un voltaje impuesto entre los electrodos. En ausencia de un voltaje impuesto, la distribución de especies en estado estacionario, por ejemplo, tal como un gradiente de concentración, será inestable y la especie electroactiva se moverá en un intento de restaurar un perfil de concentración de moléculas más estacionario en toda la muestra. Las diferentes concentraciones relativas de iones ferrocianuro y iones ferricianuro en cada electrodo darán diferentes potenciales químicos, y estos potenciales químicos cambiarán con el tiempo a medida que estas concentraciones se equilibren. Por lo tanto, esta información se puede controlar utilizando métodos potenciométricos, y el cambio medido en el potencial con el tiempo se puede relacionar con  $P_T$ . Ejemplos de métodos para determinar una medida de  $P_T$  incluyen:

1. El tiempo desde el punto de eliminación del voltaje impuesto para que el potencial alcance un valor particular
2. El potencial en un punto particular en el tiempo después de la eliminación del voltaje impuesto
3. Una medida de la velocidad de caída del potencial después de la eliminación del voltaje impuesto, tal como:
  - La pendiente de la gráfica del potencial en función del tiempo durante un período de tiempo particular
  - La pendiente de la gráfica del logaritmo del potencial en función del tiempo durante un período de tiempo particular
  - La pendiente de la gráfica de  $1/V^2$  en función del tiempo durante un período de tiempo particular, donde  $V$  es el potencial

Se pueden utilizar otras cantidades para determinar una medida de  $P_T$  a partir del control del cambio de potencial con el tiempo.

En el ejemplo de un sensor de celda de conductancia, la relajación del perfil de concentración después de la eliminación de la diferencia de potencial impuesto se puede describir mediante las siguientes relaciones (Atkins, 1999):

$$J = -D \frac{dc}{dx}$$

$$J = sc$$

Si el sensor de celda de conductancia se cambia de funcionamiento amperométrico en el que se aplica un potencial a funcionamiento potencioestático en el que el potencial impuesto se elimina - y, en este ejemplo, se mantiene una corriente, en esencia, cero - y se mide el potencial en el tiempo  $t = 0$ , entonces en la etapa de relajación inicial (es decir, en  $t = 0 +$ ) el gradiente de concentración se puede proporcionar de la siguiente manera, y  $P_T$  se puede calcular:

$$\frac{dc}{dx} = \frac{2c}{h}$$

$$sc = -D \frac{dc}{dx} = -D \frac{2c}{h}$$

$$s = -\frac{2D}{h}$$

$$P_T = \frac{-h}{s} = \frac{h^2}{2D}$$

- 5 En contraste a controlar corrientes (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU.: US5942102, US6179979, US6284125), controlar los potenciales químicos en el electrodo permitirá, por lo tanto, una medición que es independiente del área del electrodo. Cuando el gradiente de concentración en estado estacionario se relaja bajo condiciones potenciométricas (es decir, no hay transferencia electroquímica de carga de un electrodo a otro por medio de una corriente electrónica), el perfil de concentración cambia, y en la Fig. 5 se muestra un modelo de esto simulado por ordenador.

Los resultados de simulación mostrados en la Fig. 5 modelan la celda ilustrada en la Fig. 5, donde el electrodo de ánodo 105 se sitúa en  $x = 0$  en la Fig. 5 y el electrodo de cátodo 100 se sitúa en  $x = 1$  en la Fig. 5. La distancia entre los electrodos se ha normalizado a 1 unidad. Se puede observar que el perfil de concentración de ferrocianuro evoluciona con el tiempo. Existe un perfil de concentración de estado estacionario cuando se alcanza una corriente de estado estacionario y antes de que se abra el circuito, dado por 300. El circuito se abre en  $t = 0$  segundos y el perfil de concentración se muestra en los siguientes tiempos:  $t = 0,2$  s 305,  $t = 0,4$  s 310,  $t = 0,6$  s 315,  $t = 0,8$  s 320 y  $t = 1,0$  s 325. La diferencia de potencial químico entre las especies en lo que era el ánodo (electrodo de ánodo 105) y el cátodo (electrodo de cátodo 100) se puede describir mediante:

$$V = \mu_{\text{ánodo}} - \mu_{\text{cátodo}} = \frac{nF}{RT} \left( \ln \left( \frac{a(\text{ferrocianuro})_{\text{ánodo}}}{a(\text{ferricianuro})_{\text{ánodo}}} \right) - \ln \left( \frac{a(\text{ferrocianuro})_{\text{cátodo}}}{a(\text{ferricianuro})_{\text{cátodo}}} \right) \right)$$

- 20 dónde  $\mu$  es el potencial químico del par ferrocianuro/ferricianuro,  $a$  (especie) es la actividad de esa especie, y los subíndices se refieren a la posición en la celda. La actividad de la especie está relacionada con la concentración, pero es una forma más ideal que explica las desviaciones en cantidades termodinámicas de aquellas predichas puramente por concentración; sin embargo, utilizando concentraciones, la diferencia de potencial en los electrodos se puede aproximar mediante:

$$V = \frac{nF}{RT} \ln \frac{[\text{ferrocianuro}]_{\text{ánodo}}}{[\text{ferrocianuro}]_{\text{cátodo}}}$$

25 donde  $[\text{ferrocianuro}]_{\text{electrodo}}$  es la concentración de ferrocianuro en el electrodo apropiado, y se supone que la  $[\text{ferricianuro}]$  está en un gran exceso en toda la muestra y, por lo tanto, se puede estimar que permanece, en esencia, constante en toda la muestra y en los diversos momentos de interés. La evolución de este voltaje con el tiempo se ha modelado y se presenta en la Fig. 6 para varios valores de  $P_T$ . En esta figura, el potencial se determina a medida que se relaja después de que el circuito se haya abierto en el tiempo  $t = 0$  para los siguientes valores de  $P_T$ :  $P_T = 28,7$  s 420;  $P_T = 19,2$  s 415;  $P_T = 11,6$  s 410;  $P_T = 5,9$  s 405;  $P_T = 3,8$  s 400. Hay un efecto claro de  $P_T$  en la constante de tiempo de la relajación; un experto en la técnica tendrá claro que pueden existir otras relaciones dependiendo de los factores del aparato, los factores de la muestra y/o los factores ambientales, tales como la configuración de la celda y el método de medición.

- 35 Las mediciones de potencimetría por lo tanto se pueden utilizar para determinar  $P_T$  a partir de la variación entre el potencial y el tiempo medidos; la evolución de la relajación del potencial es, en esencia, independiente de la concentración del analito y del área del electrodo, pero es una función de  $P_T$ , proporcionando de este modo un método necesario para determinar un factor de corrección para la variación de  $P_T$ . Quedará claro para un experto en la técnica que hay una variedad de métodos para utilizar esta variación de potencial para cuantificar el efecto de  $P_T$ .
- 40 Los ejemplos de dichos métodos incluyen determinar una pendiente de la relajación del potencial durante un intervalo de tiempo, determinar el tiempo que lleva alcanzar un valor de potencial particular y/o determinar una constante de tiempo para la velocidad de caída para la relajación de potencial.

La Fig. 6 ilustra una forma de realización de ejemplo para la determinación de una medida de  $P_T$ . En este ejemplo, el tiempo necesario para alcanzar una diferencia de potencial de 0,06 V después de cambiar a funcionamiento potenciométrico se mide para diferentes valores de  $P_T$ . Está claro que el tiempo necesario para alcanzar una diferencia de potencial dada después de la relajación potenciométrica de la celda de conducción puede ser una medida de  $P_T$  y por lo tanto, las formas de realización de la invención proporcionan un medio para determinar una medida de  $P_T$ . Cuando se determina un valor para el área eficaz de los electrodos, entonces las variaciones en los factores de la muestra, los factores del aparato y los factores ambientales (que incluyen factores tales como los efectos de la geometría de celda y del transporte de analito) los cuales pueden contribuir a variaciones en el área eficaz de los electrodos y/o variaciones en  $P_T$  se pueden corregir para determinar una estimación más precisa de la concentración del analito. Por ejemplo, en el documento WO 03/069304 se ha descrito un método para determinar un área eficaz de electrodo y también se describió anteriormente. Este método implica la aplicación de una onda sinusoidal de pequeña amplitud a los electrodos y relacionar la corriente sinusoidal resultante con el área del electrodo por medio de un conjunto de ecuaciones construidas apropiadamente. Cuando una muestra se mide con un sensor electroquímico de celda de conductancia,  $I_S$  se puede medir y determinar directamente,  $P_T$  se puede determinar mediante el método y el aparato de las formas de realización de la invención, A se puede determinar mediante los métodos descritos anteriormente, y otras constantes se pueden calcular a priori, dando de este modo una estimación más precisa de la concentración.

Las Fig. 7A-C ilustran una forma de realización de la celda electroquímica de un sensor electroquímico de celda de conducción. La Fig. 7A muestra un dibujo esquemático tridimensional compuesto para un aparato de este tipo; La Fig. 7B muestra un dibujo esquemático de una vista lateral; y la Fig. 7C muestra un dibujo esquemático de algunos de los componentes que constituyen el aparato separado de una construcción compuesta. Esta forma de realización de ejemplo comprende una celda de conducción con electrodos, en esencia, paralelos (1320 y 1325) separados por un volumen 1340 que puede contener una muestra y define, en esencia, una cámara de muestras. Este volumen 1340 se denomina en la presente memoria "cámara de muestras". Cada uno de los electrodos (1320 y 1325) se soporta por un material, en esencia, no conductor (1300 y 1305). Cada uno de los electrodos (1320 y 1325) tiene conexiones eléctricas proporcionadas por trayectorias, en esencia, conductoras (1335 y 1330) que también se soportan por un material, en esencia, no conductor (1300 y 1305). El grosor de los electrodos (1320 y 1325) puede ser, en esencia, igual, en esencia, menor o, en esencia, mayor que el grosor de los cables (1330 y 1335). Los dos electrodos se mantienen separados por material, en esencia, no conductor (1325 y 1310). El volumen donde se coloca la muestra (1340) se puede definir parcialmente por los electrodos (1320 y 1325) y/o definir parcialmente por el material, en esencia, no conductor (1320 y 1315).

En una forma de realización de ejemplo, dos lados enfrentados y, en esencia, paralelos, de la cámara de muestras 1340 se definen, en esencia, mediante el área abarcada por dos electrodos (1320 y 1325), según se ilustra en el esquema de las Fig. 7A-C. El aparato de las Fig. 7A-C ilustra una forma de realización de ejemplo de la celda electroquímica 50 ilustrada en la Fig. 2. Un experto en la técnica reconocerá que son posibles otras formas de realización. Por ejemplo, los electrodos no tienen que ser, en esencia, paralelos entre sí. En otro ejemplo, los electrodos pueden estar en el mismo plano, y se ilustra en la Fig. 8. En esta forma de realización de ejemplo, los electrodos 2005 y 2020 se encuentran en el mismo plano en un sustrato, en esencia, no conductor 2000. Los conectores electrónicos 2010 y 2015 proporcionan un medio de acoplamiento electrónico entre los electrodos (2005 y 2020) y el TCA. Por lo tanto, existen muchas configuraciones geométricas diferentes que se pueden utilizar para un sensor de celda de conductancia. El ejemplo descrito en este documento es una forma de realización de ejemplo y no limita la invención.

En el aparato de las Fig. 7A-C, los dos electrodos (1320 y 1325) pueden funcionar, tanto como electrodo A 55 como electrodo B 60. La muestra 70 se sitúa, en esencia, en la cámara de muestras 1340. El contacto eléctrico con el aparato de control del transductor 5 se logra por medio de las trayectorias, en esencia, conductoras (1335 y 1330) que se pueden acoplar electrónicamente al aparato de control del transductor 5 para proporcionar una trayectoria electrónica, en esencia, conductora desde el aparato de control del transductor 5 a los electrodos (1320 y 1325). Una forma de realización de ejemplo del acoplamiento electrónico de la celda electroquímica de la Fig. 13 al aparato de control del transductor 5 es proporcionar un medio para contactar, en esencia, una región de cada uno de los cables, en esencia, conductores (1330 y 1335) a una parte del TCA 5. Un ejemplo de ejemplo de un medio de este tipo es para hacer contactar, en esencia, esa región de cada uno de los cables, en esencia, conductores que está más alejada de la región en contacto con los electrodos (1320 y 1325). En la ilustración esquemática de ejemplo en la Fig. 7A-C, esto se ilustra por esa parte de los cables, en esencia, conductores (1330 y 1335) que se extiende más allá del material, en esencia, no conductor 1310. Un experto en la técnica reconocerá la posibilidad de otros medios para acoplar electrónicamente la celda electroquímica 50 ilustrada en las Fig. 7A-C al aparato de control del transductor 5.

En un ejemplo de una forma de realización de ejemplo, el aparato de las Fig. 7A-C se puede utilizar de acuerdo con el proceso ilustrado en la Fig. 3. En una forma de realización, uno de los electrodos 1320 en la celda es el electrodo de cátodo 100 y el otro electrodo 1325 es el electrodo de ánodo 105. En otra forma de realización, uno de los electrodos 1325 en la celda es el electrodo de cátodo 100 y el otro electrodo 1320 es el electrodo de ánodo 105. El ferricianuro 125 y el ferrocianuro 120 se sitúan, en esencia, en la cámara de muestras 1340. La fuente de voltaje 110 la proporciona el aparato de control del transductor 5 y la corriente 115 se desplaza a lo largo de una trayectoria, en

esencia, conductora que en parte está compuesta por cables, en esencia, conductores (1330 y 1335). Los procesos de transporte (130 y 135) ocurren, en esencia, dentro de la cámara de muestras 1340.

#### Aparato de la Invención

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un aparato para utilizar en la práctica del método de la invención. Por lo tanto, la invención proporciona un aparato para determinar la presencia de un analito en una muestra dispuesta en una celda electroquímica, comprendiendo dicha celda electroquímica dos electrodos entre los cuales se coloca la muestra para su análisis, comprendiendo dicho aparato:

(a) una carcasa que tiene un espacio para recibir la celda electroquímica;

(b) medios para aplicar un potencial o una corriente entre los dos electrodos de la celda electroquímica cuando se recibe dentro de la carcasa (por ejemplo, un potencióstato o un galvanostato);

(c) medios para medir la oxidación o reducción de un analito o un mediador en un sistema de detección de analitos que se produce dentro de la celda electroquímica cuando se aplica el potencial o la corriente (por ejemplo, un circuito para medir/observar una corriente o una diferencia de potencial entre los electrodos);

(d) medios para desconectar el potencial o la corriente después de un período de tiempo durante el cual se establece un gradiente de potencial químico entre los dos electrodos (por ejemplo, un interruptor que abra el circuito en la celda, o un interruptor de alta impedancia);

(e) medios para controlar la caída del gradiente de potencial químico después de que se desconecte el potencial o la corriente (por ejemplo, un circuito para observar la diferencia de potencial entre los electrodos);

(f) medios de procesamiento de datos programados para combinar la oxidación o reducción medida con la caída controlada para producir una indicación de la presencia del analito en la muestra (por ejemplo, un procesador de datos con programación adjunta que realice las etapas descritas en esta solicitud); y

(g) medios de salida para transmitir la indicación de la presencia del analito en la muestra a un usuario.

El aparato se puede suministrar por separado, pero generalmente se utiliza en combinación con una celda electroquímica en forma de una tira reactiva de una sola utilización. El aparato tiene una ranura para recibir la tira reactiva, y los elementos apropiados de generación y procesamiento de señales para aplicar el potencial y la corriente y para controlar la corriente o potencial resultantes y la caída del gradiente de potencial químico, y para convertir la información resultante en una indicación de los resultados de la evaluación. La tira reactiva puede ser cualquier tira reactiva apropiada para la detección del analito seleccionado en particular. En formas de realización preferidas, la tira tiene electrodos enfrentados y una separación entre los electrodos que es lo suficientemente corta como para que el gradiente de especies oxidadas y reducidas se extienda a lo largo de al menos el 10%, más preferiblemente más del 80 %, hasta el 100% de la distancia entre los electrodos. En general, esta será una distancia de 20 a 400 micrones. Se puede incorporar una pantalla como parte del medidor, por ejemplo, en forma de una pantalla LCD, una pantalla LED o un medidor de bobina móvil. La pantalla también puede estar separada del medidor y conectada con un enlace de comunicaciones alámbrico o inalámbrico al medidor.

La Fig. 22 muestra una vista externa de una forma de realización del aparato de la invención. La carcasa 3000 se puede fabricar de cualquier material adecuado, pero lo más común es que se fabrique de un plástico resistente al impacto. La carcasa 3000 tiene una abertura 3005 para recibir una tira reactiva que comprende electrodos y conectores para hacer contacto eléctrico entre la tira reactiva y el aparato. Una pantalla 3010 proporciona salida en una forma legible por el usuario. Opcionalmente, el aparato puede incluir un botón de inicio 3015, aunque también se puede utilizar la detección de una tira reactiva insertada para iniciar el aparato para que procese una prueba de analito.

Los siguientes ejemplos ilustran formas de realización de ejemplo del método y del aparato de la invención.

Ejemplo 1: corrección de las variaciones en  $P_T$ : se describe un ejemplo de la utilización de  $P_T$  para aumentar la precisión de las mediciones del sensor electroquímico. La Fig. 9 muestra una relación de ejemplo que puede existir entre  $P_T$  y la corriente medida para diferentes concentraciones de analito. Los datos en la Fig. 9 se simularon de acuerdo con un sensor electroquímico de celda de conducción según se ilustra mediante los dibujos de ejemplo en la Fig. 3 y en las Fig. 7A-C. La Fig. 9 ilustra la variación en la corriente (dada en amperios) para diferentes valores de  $P_T$  para un sensor compuesto por cada electrodo que tiene un área superficial efectiva de  $1 \text{ cm}^2$ . Los puntos de datos se muestran en la Fig. 9 para la corriente de estado estacionario que se genera con la aplicación de una diferencia de voltaje de 0,4 V entre los dos electrodos para una muestra compuesta de 2 mM de ferrocianuro 1400 y 1 mM de ferrocianuro 1405. Es evidente que la corriente medida depende tanto de la concentración del analito como del valor de  $P_T$ . Por lo tanto, las variaciones en el valor de  $P_T$  pueden provocar variaciones en la señal que pueden introducir errores en la medición de la concentración del analito.

La Fig. 10 ilustra este problema mejor mostrando curvas de calibración representativas para diferentes valores de  $P_T$ . En esta figura, la concentración se da en el eje x en mM, y la corriente de estado estacionario medida se da en el eje y en amperios. Los puntos de datos 1500 corresponden a un valor  $P_T$  de 44,3 s; los puntos de datos 1505 corresponden a un valor  $P_T$  de 20,6 s; los puntos de datos 1510 corresponden a un valor  $P_T$  de 6,58 s. De nuevo, se ilustra el error en la estimación del analito que puede surgir de las variaciones en  $P_T$ . Si una curva de calibración particular se toma como la curva de calibración de referencia, entonces esto asume implícitamente que un valor particular de  $P_T$  se asocia con la medición. Sin embargo, si el valor de  $P_T$  varía cuando se mide una muestra desconocida, entonces la estimación resultante en la concentración del analito puede ser errónea.

La Fig. 11 ilustra un ejemplo del tipo de error que puede surgir si el valor de  $P_T$  varía. En este ejemplo, la curva de calibración comprende los puntos de datos 1505 de la Fig. 10; esta curva de calibración se determinó para un sistema con un valor de  $P_T$  igual a 20,6 s. Una ecuación para describir esta curva de calibración es:

$$I = (4,673E -6)[\text{ferrocianuro}]$$

$$[\text{ferrocianuro}] = \frac{I}{4,673E -6}$$

donde I es la corriente medida, y [ferrocianuro] es la concentración de ferrocianuro en la muestra. Por lo tanto, se puede utilizar una medición de la corriente para estimar la concentración del analito, en este ejemplo, el ferrocianuro, en una muestra utilizando la ecuación anterior.

La Fig. 11 ilustra el error que puede ocurrir al estimar la concentración del analito si el valor de  $P_T$  para la medición fuera diferente del valor de  $P_T$  que se utilizó al determinar la curva de calibración. Las mediciones de corriente se determinan a partir de un sistema con una concentración de ferrocianuro de 2 mM para diferentes valores de  $P_T$ . Como el valor de  $P_T$  varió, la corriente medida varió. Dado que la ecuación de estimación se determina a partir de una curva de calibración que se determinó a partir de un sistema que tiene un valor particular de  $P_T$ , si las mediciones se realizan con un sistema que tiene un valor diferente de  $P_T$ , la ecuación de estimación resultante producirá una estimación inexacta. La Fig. 11 ilustra el error en la estimación del analito que puede ocurrir para diferentes valores de  $P_T$ . El eje y del gráfico en la Fig. 11 es el porcentaje de error en la estimación de la concentración de ferrocianuro según lo determinado de la siguiente manera:

$$\%Error = 100 \times \frac{[\text{ferrocianuro}]_{\text{estimado}}}{[\text{ferrocianuro}]_{\text{real}}}$$

$$[\text{ferrocianuro}]_{\text{estimado}} = \frac{I_{\text{medida}}}{(4,673E -6)}$$

$$[\text{ferrocianuro}]_{\text{real}} = 2mM$$

$I_{\text{medida}}$  es la corriente medida;  $[\text{ferrocianuro}]_{\text{real}}$  es la concentración real de ferrocianuro en la muestra (2 mM, según se indicó anteriormente);  $[\text{ferrocianuro}]_{\text{estimado}}$  es la concentración estimada de ferrocianuro según se determina mediante una ecuación que describe los datos de calibración 1505. La Fig. 16 ilustra un ejemplo del error en la estimación de la concentración del analito que puede ocurrir si el valor de  $P_T$  cambia del valor que se utilizó al determinar los datos de calibración. Los puntos de datos representan el error en porcentaje en la estimación de la concentración del analito para diferentes valores de  $P_T$ . Para referencia, se debe observar que se utilizó un valor de  $P_T$  igual a 20,6 s al determinar los datos de calibración 1505. Por lo tanto, hay un error en porcentaje, en esencia, cero en los datos de la Fig. 11 cuando  $P_T$  es igual a 20,6 s.

También es destacable observar que como  $P_T$  aumenta, la velocidad de cambio del error disminuye. Del mismo modo, cuando  $P_T$  disminuye, la velocidad de cambio del error aumenta. Un ejemplo de una situación que puede dar lugar a valores pequeños de  $P_T$  es cuando la distancia entre los dos electrodos en un sensor de celda de conducción disminuye. Por ejemplo, la distancia entre los electrodos 1320 y 1325 en las Fig. 7A-C se puede reducir disminuyendo el grosor del material, en esencia, no conductor 1310 y 1315. Al disminuir esta distancia, el volumen de la cámara de muestras 1340 también disminuye. Por lo tanto, la influencia de  $P_T$  en una estimación de analito aumenta a medida que disminuye el volumen de la cámara de muestras, destacando aún más la utilidad e importancia de poder corregir con precisión las variaciones en  $P_T$  en pequeños volúmenes de muestra.

Un ejemplo de la utilización de  $P_T$  para corregir una estimación de analito para los errores provocados por las variaciones a  $P_T$  incluye determinar una relación entre  $P_T$  y el tiempo t necesario para la relajación potenciométrica para alcanzar una diferencia de potencial particular. En este ejemplo, se aplicó una diferencia de potencial de CC de 400 mV a los electrodos para el sistema simulado de la Fig. 3. Una vez que se estableció una corriente de estado estacionario, la diferencia de potencial se eliminó abriendo el circuito del sistema, garantizando de este modo que,

en esencia, la corriente electrónica no fluyó en el circuito, y el potencial entre los electrodos se controló a lo largo del tiempo.

5 La simulación se ejecutó para diferentes valores de  $P_T$ , y se determinó la relajación de la diferencia de potencial a lo largo del tiempo para cada uno de estos diferentes valores de  $P_T$ . La evolución de este potencial a lo largo del tiempo se ha modelado y se presenta en la Fig. 5 para varios valores de  $P_T$ . En esta figura, el potencial se determina a medida que se relaja después de que el circuito se haya abierto en el tiempo  $t = 0$  para los siguientes valores de  $P_T = 28,7$  s 420;  $P_T = 19,2$  s 415;  $P_T = 11,6$  s 410;  $P_T = 5,9$  s 405;  $P_T = 3,8$  s 400.

10 La velocidad de relajación del potencial entre los dos electrodos es, en esencia, independiente de la concentración del analito. Por lo tanto, la utilidad de esta técnica es que se puede utilizar para controlar las propiedades del sistema que dan lugar al valor de  $P_T$  mientras que no es influido, en esencia, por la concentración del analito. Esto está en marcado contraste con los métodos de la técnica anterior que se basan en el control de las corrientes de relajación, que están, en esencia, influenciadas por la concentración del analito (patentes de EE. UU.: US5942102, US6179979, US6284125).

15 Además, controlar la diferencia de potencial entre los electrodos es una medida que es, en esencia, independiente del área de los electrodos. Esto tiene el beneficio útil de eliminar otra fuente de variación de la medición de potencial. Esto contrasta con los métodos que se basan en el control de las corrientes de relajación, ya que el valor de la corriente medida depende del área eficaz de los electrodos.

20 Un ejemplo de forma de realización para la extracción de una medida de  $P_T$  es determinar el tiempo transcurrido desde el inicio de la relajación potenciométrica hasta que se alcanza un valor particular del potencial. Esto representa una métrica para cuantificar una medida de la velocidad de relajación, o la constante de tiempo para la velocidad de caída, del potencial después de abrir el circuito del sistema electroquímico. Un experto en la técnica reconocerá que se pueden utilizar otras métricas, tales como el potencial en un punto particular en el tiempo, la pendiente de la gráfica del potencial en función del tiempo durante un período particular de tiempo, la pendiente de la gráfica del logaritmo de potencial en función del tiempo durante un período de tiempo particular, y la pendiente de la gráfica de  $1/V^2$  en función del tiempo durante un período de tiempo particular, donde  $V$  es el potencial. La Fig. 12 ilustra una relación entre  $P_T$  y el tiempo  $t$  transcurrido para alcanzar una diferencia de potencial de 0,06 V, donde  $t = 0$  es el tiempo en el que el sistema está en circuito abierto. En este ejemplo, los datos mostrados en la Fig. 6 se analizaron determinando el tiempo en que el potencial de relajación alcanzó un valor, en esencia, igual a 0,06 V. Por lo tanto, cada valor de  $P_T$  da como resultado un potencial de caída diferente y corresponde a un momento diferente en el que el potencial alcanzó un valor que es, en esencia, igual a 0,06 V. La Fig. 12, por lo tanto, ilustra la relación que existe entre  $P_T$  y una medida de  $P_T$  - en este ejemplo, el tiempo que se tarda en alcanzar 0,06 V y, por lo tanto, permite que se establezca una relación matemática para determinar  $P_T$  a partir de una cantidad medible de los datos de relajación potenciométrica. En este ejemplo, se observa la siguiente relación entre  $P_T$  y el tiempo para alcanzar el potencial designado:

35  $P_T = mt$   
 $m = 56,057$

Pueden existir otras relaciones y dichas relaciones pueden depender de la configuración de medición, que incluye la geometría de la celda electroquímica.

40 Puesto que esta medición de relajación potenciométrica es, en esencia, independiente de la concentración del analito, se puede utilizar para estimar una medida de  $P_T$  que no esté, en esencia, afectada por la concentración del analito. Esta medida de  $P_T$  se puede utilizar a continuación para ajustar los errores en la estimación del analito que pueden surgir de las variaciones en el valor de  $P_T$ . En este ejemplo, se determinó una curva de calibración para un sistema con  $P_T = 20,6$  s. Según se describió anteriormente, una ecuación para estimar la concentración de un analito se puede proporcionar mediante:

45 
$$P_T = -\frac{h}{s}$$

$$C = -\frac{\kappa_{\text{catodo}} I_s}{\beta s} = -\frac{I_s h}{\beta s A} = \frac{I_s P_T}{\beta A}$$

En términos de la movilidad de la especie de analito. Un experto en la técnica reconocerá que son posibles otras formas, dependiendo de la naturaleza del sistema. En un ejemplo descrito anteriormente, la concentración de un analito se puede dar en términos de sus propiedades de difusión de la siguiente manera:

$$P_T = \frac{h}{D}$$

$$C = \frac{\alpha K_{\text{celda}} I_s}{D} = \frac{I_s h}{2nFDA} = \frac{I_s P_T}{2nFA} = \frac{\alpha I_s P_T}{A}$$

$$\alpha = \frac{1}{2nF}$$

5 En la práctica, una curva de calibración se determina empíricamente ya que a menudo es más conveniente determinar una constante de proporcionalidad por experimentación que determinar todos los componentes relevantes de forma independiente. Por ejemplo, tomando el sistema descrito en términos de movilidad del analito según se describió anteriormente, una ecuación para describir los datos de calibración 1505 en la Fig. 10 es:

$$I = \frac{1}{\lambda} [\text{ferrocianuro}]$$

$$[\text{ferrocianuro}] = \lambda I$$

$$\lambda = 2.14 \text{ E } 5 \text{ mM} / \text{A}$$

$$[\text{ferrocianuro}] = \lambda I = \frac{IP_T}{\beta A_e}$$

$$\lambda = \frac{P_T}{\beta A_e}$$

$$A = 1 \text{ cm}^2$$

$$P_T = 20,6 \text{ s}$$

$$10 \Rightarrow \beta = 9,63 \text{ E} - 5$$

$$\Rightarrow \lambda = \frac{P_T}{9,63 \text{ E} - 5} = (1,03 \text{ E } 4) P_T$$

15 La constante de proporcionalidad  $\lambda$  incorpora los efectos de los parámetros relevantes en la estimación de la concentración. Dado que estos datos 1505 se adquirieron en un sistema con un valor de  $P_T$  igual a 20,6 s, la constante  $\lambda$  se puede expresar para incorporar de forma explícita el valor de  $P_T$ , según se indicó anteriormente. Esto permite que se realice a continuación un ajuste útil para las variaciones en  $P_T$  que pueden introducir errores en la estimación del analito.

20 Un ejemplo de corrección de errores en las estimaciones de la concentración del analito que pueden surgir de las variaciones en  $P_T$  es ajustar la descripción de la curva de calibración para tener en cuenta las variaciones en  $P_T$ . De manera más general, la constante de proporcionalidad de una curva de calibración  $\lambda$  se puede dar en relación con el valor de  $P_T$  que estaba asociado con los datos de calibración, indicados por  $P_{T\text{calibración}}$ . En este ejemplo, el valor de  $\lambda$  se puede ajustar mediante la cantidad  $\left(\frac{P_{T\text{calibración}}}{P_{T\text{medido}}}\right)$  tal que:

$$\lambda = 2.14 \times 10^5 \left( \frac{P_{T\text{calibración}}}{P_{T\text{medido}}} \right)$$

25 donde  $P_{T\text{medido}}$  es el valor de  $P_T$  asociado con la señal de corriente medida  $I_{\text{medida}}$ . Esto permite entonces ajustar un parámetro  $\lambda$ , que, en parte, define una curva de calibración, en respuesta a las variaciones en  $P_T$  cuando se mide una muestra. Por lo tanto, obteniendo una medida de  $P_T$  que sea, en esencia, independiente de  $I_{\text{medida}}$  y la concentración del analito, la curva de calibración que se utiliza para estimar la concentración del analito se puede ajustar para reducir un error en la estimación de la concentración del analito. Las formas de realización de la invención proporcionan un método para determinar  $P_T$  que es, en esencia, independiente de la concentración del analito y la corriente medida. Una forma de realización del método para ajustar una variación en  $P_T$  es utilizar formas de realización de esta invención para determinar una medida de  $P_T$  y ajustar un parámetro que defina en parte una  
30 curva de calibración. Una forma de realización de ejemplo de este método es multiplicar el factor de calibración  $\lambda$  por

el factor de corrección  $\left(\frac{P_{T\text{calibración}}}{P_{T\text{medido}}}\right)$  y a continuación utilizar este valor ajustado de  $\lambda$  en la estimación de la concentración del analito. Las siguientes ecuaciones ilustran esta forma de realización de ejemplo. A partir de los datos de calibración 1505 en la Fig. 10, se determina una ecuación que modela, en esencia, estos datos. Una forma de realización de ejemplo para determinar una ecuación de este tipo es utilizar técnicas de regresión lineal bien conocidas para encontrar una ecuación lineal que describa mejor estos datos 1505. Un ejemplo de una ecuación de este tipo se proporciona de la siguiente manera:

5

$$C_{\text{calibración}} = (\lambda_{\text{calibración}})(I_{S_{\text{calibración}}})$$

$$C_{\text{estimada}} = (\lambda_{\text{calibración}})(I_{S_{\text{medida}}})$$

$$\lambda_{\text{calibración}} = (1.03 \text{ E } 4) P_{T_{\text{calibración}}}$$

$$P_{T_{\text{calibración}}} = 20,6$$

$$\Rightarrow \lambda_{\text{calibración}} = 2,14 \times 10^5$$

Otras relaciones son posibles y pueden depender de la naturaleza del sistema sensor electroquímico, de los factores ambientales, los factores del aparato y/o los factores de la muestra.

10 Otro ejemplo de corrección de errores en la estimación de la concentración del analito que pueden surgir de las variaciones en  $P_T$  es ajustar la corriente medida para tener en cuenta las variaciones en  $P_T$ . Un análisis similar de la ecuación de la curva de calibración muestra que la corriente medida  $I_{S_{\text{medida}}}$  se puede ajustar mediante un factor de  $\left(\frac{P_{T\text{calibración}}}{P_{T\text{medido}}}\right)$  de la siguiente manera:

$$C_{\text{estimada}} = (\lambda_{\text{calibración}})(I_{S_{\text{medida}}})$$

$$I_{S_{\text{corregida}}} = I_{S_{\text{medida}}} \left( \frac{P_{T_{\text{calibración}}}}{P_{T_{\text{medida}}}} \right)$$

$$C_{\text{corregida}} = (\lambda_{\text{calibración}})(I_{S_{\text{corregida}}}) = (\lambda_{\text{calibración}}) I_{S_{\text{medida}}} \left( \frac{P_{T_{\text{calibración}}}}{P_{T_{\text{medida}}}} \right)$$

15 Otro ejemplo de corrección de errores en la estimación de la concentración del analito que pueden surgir de las variaciones en  $P_T$  es ajustar la concentración estimada de analito para tener en cuenta las variaciones en  $P_T$ . Un análisis similar de la ecuación de la curva de calibración muestra que la concentración estimada  $C_{\text{estimada}}$  se puede ajustar mediante un factor de  $\left(\frac{P_{T\text{calibración}}}{P_{T\text{medido}}}\right)$  de la siguiente manera:

$$C_{\text{estimada}} = (\lambda_{\text{calibración}})(I_{S_{\text{medida}}})$$

$$C_{\text{corregida}} = (\lambda_{\text{calibración}}) I_{S_{\text{medida}}} \left( \frac{P_{T_{\text{calibración}}}}{P_{T_{\text{medida}}}} \right) = C_{\text{estimada}} \left( \frac{P_{T_{\text{calibración}}}}{P_{T_{\text{medida}}}} \right)$$

20

Se pueden hacer otros ajustes para corregir las variaciones en  $P_T$  y que la forma del ajuste dependa de los factores del aparato, los factores ambientales y/o los factores de la muestra que son relevantes para el sistema de medición.

La Fig. 10 ilustra una diferencia en las curvas de calibración que pueden resultar de diferentes valores de  $P_T$ . Los puntos de datos 1510 fueron de un sistema con  $P_T = 6,58$  s; los puntos de datos 1505 fueron de un sistema con  $P_T = 20,6$ ; los puntos de datos 1500 fueron de un sistema con  $P_T = 44,3$  s. Está claro que a medida que cambia el valor de  $P_T$ , cambia la respuesta del sensor, según se refleja por las diferentes curvas de calibración. Por lo tanto, si un sistema sensor se desarrolló y calibró con un valor particular de  $P_T$ , el valor de  $P_T$  cuando se utilizó el sensor debería ser, en esencia, el mismo para mantener, en esencia, la misma lectura del sensor. Sin embargo, si el valor de  $P_T$  fue diferente cuando se utilizó el sensor, entonces la medición puede ser imprecisa. Los ejemplos de por qué el valor de  $P_T$  puede ser diferente en el momento de utilizar un sensor incluyen las variaciones de fabricación en la distancia entre los electrodos de la celda de conducción y las variaciones en la movilidad efectiva de la especie en la muestra.

La Fig. 11 ilustra un ejemplo del tipo de error que puede surgir de las variaciones en  $P_T$ . En este ejemplo, el sistema de la Fig. 2 implementado con los procesos de la Fig. 3 se simula con  $P_T = 20,6$  s. El error en la estimación de la concentración del analito se expresa como un porcentaje del valor obtenido con  $P_T = 20,6$  s. Por lo tanto, a medida que  $P_T$  disminuye por debajo de 20,6 s, la concentración estimada del analito aumenta a una velocidad rápida, lo que da como resultado una estimación falsamente alta; a medida que  $P_T$  aumenta por encima de 20,6 s, la concentración estimada disminuye, lo que da como resultado una estimación falsamente baja. Es importante tener en cuenta que, con pequeños valores de  $P_T$ , la estimación de la concentración del analito es mucho más sensible a las variaciones en  $P_T$  que con valores mayores de  $P_T$ . En volúmenes pequeños, donde la separación entre los electrodos es pequeña, la capacidad de corregir las variaciones en  $P_T$  es, por lo tanto, de mayor valor y utilidad incluso. Del mismo modo, en los sistemas que comprenden especies con altas movilidades y/o alta difusión, esto también puede dar como resultado pequeños valores de  $P_T$ , que ilustran de nuevo la utilidad y el valor de la invención en la corrección de las variaciones en  $P_T$ .

Las Fig. 13A-C ilustran escenarios para la corrección de una estimación debido a variaciones en  $P_T$ . En estos ejemplos, se utiliza una concentración del analito de 3 mM con un sistema calibrado con  $P_T = 20,6$  s. En las Fig. 13A, 13B, y 13C, los puntos de datos 1700 muestran cómo la concentración estimada de analito puede variar cuando las mediciones se realizan con sensores con diferentes valores de  $P_T$ . Según se esperaba, cuando el valor del sensor es, en esencia, de 20,6 s, entonces la concentración estimada es, en esencia, cercana al valor correcto de 3 mM. La Fig. 13A ilustra el efecto de corregir la concentración estimada final del analito teniendo en cuenta la variación en  $P_T$ . Los puntos de datos 1705 son la concentración estimada del analito después de que se utilizó un proceso de corrección que ajusta los valores de concentración estimados en los puntos de datos 1700 en función del valor de  $P_T$  para esa medición del sensor. La Fig. 13B ilustra el efecto de la corrección de la concentración del analito final estimada mediante el ajuste de la curva de calibración para tener en cuenta la variación en  $P_T$ . Los puntos de datos 1710 son la concentración del analito estimada después de que se utilizó un proceso de corrección que ajusta la curva de calibración que se utiliza para estimar los valores de concentración en los puntos de datos 1700 en función del valor de  $P_T$  para esa medida del sensor. La Fig. 13C ilustra el efecto de la corrección de la concentración del analito final estimada mediante el ajuste de la señal de corriente medida para tener en cuenta la variación en  $P_T$ . Los puntos de datos 1715 son la concentración del analito estimada después de que se utilizó un proceso de corrección que ajusta la señal amperométrica medida que se utiliza para estimar los valores de concentración en los puntos de datos 1700 en función del valor de  $P_T$  para esa medición del sensor. Por lo tanto, es evidente que las formas de realización de la invención son útiles en la reducción de errores en la estimación de la concentración del analito que pueden surgir de las variaciones en  $P_T$ .

Las Fig. 14A-C ilustran en forma de diagrama de flujo formas de realización de ejemplo de la invención. Según se describió en este documento, existen diferentes formas de realización que se pueden utilizar para el método de la invención. Las Fig. 14A-C proporcionan detalles adicionales a las etapas de la Fig. 4 ilustrando formas de realización de ejemplo de la etapa 225, la etapa 230 y la etapa 235 de la Fig. 4.

La Fig. 14A ilustra una forma de realización de ejemplo en la que se realiza un ajuste a la estimación final del analito, según se ilustró con el ejemplo de la Fig. 13A. En esta forma de realización, se determina el potencial transitorio (etapa 220). A continuación, se cuantifica una medida de  $P_T$  (etapa 1805). La medida de  $P_T$  se compara con los datos de calibración para determinar un valor eficaz de  $P_T$  (etapa 1810). El valor eficaz de  $P_T$  se utiliza para ajustar la estimación del analito para tener en cuenta las variaciones en  $P_T$  (etapa 1815). La concentración del analito ajustada se produce de una forma útil (etapa 1820).

La Fig. 14B ilustra una forma de realización de ejemplo en la que se realiza un ajuste a una medida del componente de señal faradaica, según se ilustró en el ejemplo de la Fig. 13B. En esta forma de realización, se determina el potencial transitorio (etapa 220). A continuación, se cuantifica una medida de  $P_T$  (etapa 1805). La medida de  $P_T$  se compara con los datos de calibración para determinar un valor eficaz de  $P_T$  (etapa 1810). El valor eficaz de  $P_T$  se utiliza para ajustar la medida del componente de señal faradaica para tener en cuenta las variaciones en  $P_T$  (etapa 1825). La medida ajustada del componente de señal faradaica se utiliza con los datos de calibración faradaica para estimar la concentración del analito (etapa 1830). La estimación de la concentración del analito se produce de una forma útil (etapa 1820).

La Fig. 14C ilustra una forma de realización de ejemplo en la que se realiza un ajuste a los datos de calibración, según se ilustró en el ejemplo de la Fig. 13C. En esta forma de realización, se determina el potencial transitorio (etapa 220). A continuación, se cuantifica una medida de  $P_T$  (etapa 1805). La medida de  $P_T$  se compara con los

datos de calibración para determinar un valor eficaz de  $P_T$  (etapa 1810). El valor eficaz de  $P_T$  se utiliza para ajustar los datos de calibración faradaica para tener en cuenta las variaciones en  $P_T$  (etapa 1835). Los datos de calibración faradaica ajustados se utilizan con la medida del componente de señal faradaica para estimar la concentración del analito (etapa 1840). La estimación de la concentración del analito se produce de forma útil (etapa 1820).

5 Ejemplo 2: Ejemplo de biosensor enzimático

En otra forma de realización de ejemplo, el sensor electroquímico de celda de conducción funciona como un biosensor. En este caso, un conjunto de reacciones químicas produce un analito para ser detectado por el sensor electroquímico de celda de conducción. Una forma de realización de esto se ilustra en la Fig. 1 en la que una enzima glucosa oxidasa cataliza una reacción con glucosa. En este ejemplo, la glucosa 500 reacciona con la forma oxidada de la glucosa oxidasa, GODox 510, convirtiéndose de este modo la enzima en su forma reducida GODred 515 y produciendo gluconolactona 505. La GODred 515 puede reaccionar con ferricianuro,  $Fe(CN)_6^{3-}$  para ser devuelta a su estado oxidado GODox 510 y producir ferrocianuro,  $Fe(CN)_6^{4-}$ . Por lo tanto, la concentración de glucosa se puede estimar determinando la concentración de ferrocianuro mediante el método y el aparato de las formas de realización de la invención.

15 La corriente medida se puede relacionar con la concentración de glucosa mediante una ecuación de la curva de calibración. Un ejemplo de una ecuación de este tipo es:

$$C_{\text{estimada}}^{\text{glucosa}} = (\lambda_{\text{calibración}}^{\text{glucosa}}) (I_{S_{\text{medida}}})$$

20 dónde  $C_{\text{estimada}}^{\text{glucosa}}$  es la concentración de glucosa estimada,  $\lambda_{\text{calibración}}^{\text{glucosa}}$  es una constante de proporcionalidad, e  $I_{S_{\text{medida}}}$  es la corriente medida. Un ejemplo de un factor de corrección que se puede utilizar para corregir variaciones en  $P_T$  es seguir el proceso descrito anteriormente para un sensor electroquímico de celda de conducción y desarrollar una ecuación de corrección análoga con la cual el valor medido de  $P_T$  se utilice para ajustar la curva de calibración, la corriente medida o la estimación de la concentración de la siguiente manera:

$$C_{\text{estimada}}^{\text{glucosa}} = (\lambda_{\text{calibración}}^{\text{glucosa}}) (I_{S_{\text{medida}}})$$

$$C_{\text{corregida}}^{\text{glucosa}} = (\lambda_{\text{calibración}}^{\text{glucosa}}) I_{S_{\text{medida}}} \left( \frac{P_{T_{\text{calibración}}}^{\text{glucosa}}}{P_{T_{\text{medida}}}^{\text{glucosa}}} \right) = C_{\text{estimada}}^{\text{glucosa}} \left( \frac{P_{T_{\text{calibración}}}^{\text{glucosa}}}{P_{T_{\text{medida}}}^{\text{glucosa}}} \right)$$

25 Dónde  $P_{T_{\text{calibración}}}^{\text{glucosa}}$  es el valor de  $P_T$  obtenido al determinar una curva de calibración para un biosensor de celda de conducción utilizado para estimar las concentraciones de glucosa,  $P_{T_{\text{medida}}}^{\text{glucosa}}$  es el valor de  $P_T$  obtenido al medir la glucosa en un biosensor de celda de conducción, y  $C_{\text{corregida}}^{\text{glucosa}}$  es la concentración de glucosa corregida.

Ejemplo 3: Ejemplo de formas de realización de un aparato de control del transductor

30 Se describe una forma de realización de ejemplo del aparato de control del transductor 5 en la Fig. 2. La Fig. 15 ilustra un esquema para una forma de realización de ejemplo del aparato de control del transductor 5. Dos electrodos 2100 y 2105 se acoplan al TCS 5 mediante trayectorias 2110 y 2115, en esencia, conductoras. Una unidad de aplicación de estímulos 2150 puede aplicar una diferencia de potencial entre las trayectorias 2110 y 2130, en esencia, conductoras. La unidad de aplicación de estímulos 2150 puede variar la diferencia de potencial en el tiempo. Una unidad de cuantificación de corriente 2120 controla la corriente que fluye a lo largo del cable 2110. Un experto en la técnica reconocerá que la corriente que fluye a lo largo del cable 2110 es, en esencia, la misma que la corriente que fluye a lo largo de los cables 2115 y 2130. La unidad de cuantificación de corriente 2120 se puede conectar al cable 2115 o 2130 en lugar de al cable 2110. Esta forma de realización no limita la invención. Una unidad de interruptor 2135 permite la capacidad de conectar o desconectar eléctricamente el cable 2130 al cable 2115. Esta unidad de interruptor permite al TCA 5 forzar que el flujo de corriente sea, en esencia, cero amperios. Un experto en la técnica reconocerá que son posibles otros métodos para forzar que el flujo de corriente sea, en esencia, cero amperios, tales como cambiar a un elemento de circuito de alta impedancia. Los ejemplos de una unidad de interruptor 2135 incluyen un interruptor de estado sólido tal como un interruptor MOSFET (por ejemplo, el chip AD417 de Analog Devices); un interruptor electromecánico; y un interruptor mecánico.

45 La unidad de conmutación 2135 se puede conectar de una manera que permita poner en cortocircuito y/o en circuito abierto el cable 2110 en su lugar. Un experto en la técnica reconocerá que existen diferentes opciones de colocación y de funcionamiento para cambiar entre un modo de funcionamiento donde el flujo de corriente no esté impedido, en esencia, a otro modo de funcionamiento donde el flujo de corriente esté, en esencia, impedido. Una unidad de cuantificación de potencial 2125 controla la diferencia de potencial entre el cable 2115 y el cable 2110. Esta

diferencia de potencial está relacionada con la diferencia de potencial entre los electrodos 2105 y 2100. En una forma de realización preferida, el potencial en el cable 2115 es, en esencia, igual al potencial en el electrodo 2105 y el potencial en el cable 2110 es, en esencia, igual al potencial en el electrodo 2100.

5 Cuando el TCA 5 funciona en modo amperométrico, el interruptor 2135 está en modo de funcionamiento en circuito cerrado, la unidad de aplicación de estímulos 2150 aplica una diferencia de potencial y la corriente resultante se controla mediante la unidad de cuantificación de corriente 2120 y el potencial se controla mediante la unidad de cuantificación de potencial 2125. Cuando el sistema cambia a un modo de funcionamiento potenciométrico, el interruptor 2135 cambia a un modo de funcionamiento de circuito abierto o alta impedancia, la unidad de cuantificación de corriente 2120 controla el flujo de corriente, que se espera que sea, en esencia, cero amperios, y la  
10 unidad de cuantificación de potencial controla la diferencia de potencial, que se espera que siga una caída de relajación con el tiempo.

Una forma de realización de ejemplo más específica para el TCA 5 se ilustra en la Fig. 16. El elemento del circuito 2220 representa una trayectoria, en esencia, conductora hacia un potencial de referencia, tal como la masa. Todas las líneas sólidas gruesas representan, en esencia, trayectorias eléctricas ("conductores"). El potencial de estímulo se aplica entre el cable 2215 y el cable de masa 2220. Cuando la unidad de conmutación 2230 se encuentra en modo de circuito cerrado, el cable 2225 y el cable 2250 tienen, en esencia, el mismo potencial y el amplificador 2200 mantiene, en esencia, el mismo potencial en el cable 2250 que el presente en el cable 2215. Un ejemplo de un amplificador 2200 de este tipo es un amplificador operacional ("amplificador op"). El cable 2250 se conecta al electrodo 2240. Un segundo amplificador 2205 mantiene una conexión al cable de masa 2220 y otra conexión por medio del cable 2265 al electrodo 2245. Una resistencia de retroalimentación 2255 conecta el cable 2265 al cable 2260. La diferencia de potencial que existe entre el cable 2260 y el cable de masa 2220 se relaciona con la corriente que fluye a través de la celda electroquímica. Otro amplificador controla la diferencia entre el cable 2250 y el cable 2265 y, por lo tanto, controla, en esencia, el mismo potencial que existe entre el electrodo 2240 y el electrodo 2245. Un ejemplo de un amplificador 2210 de este tipo es un amplificador diferencial. Otro ejemplo es un amplificador de instrumentación. La diferencia de potencial entre el cable 2270 y el cable de masa 2220 está relacionada con la diferencia de potencial entre el cable 2250 y el cable 2265. Cuando la unidad de conmutación 2230 funciona en circuito abierto, el amplificador 2200 asegura que, en esencia, fluye corriente cero a lo largo del cable 2250 y el electrodo 2240. Por lo tanto, el potencial en el cable 2260 es, en esencia, el mismo que el potencial en el cable de masa 2220. El potencial entre los electrodos 2240 y 2245 se controla mediante el amplificador 2210 y se manifiesta por una diferencia de potencial entre el cable 2270 y el cable de masa 2220.

#### Ejemplo 4 Otra métrica para cuantificar $P_T$

Según se mencionó anteriormente, otra forma de realización de ejemplo para la extracción de una medida de  $P_T$  es determinar una medida de la velocidad de relajación de la señal potenciométrica mediante la determinación de una pendiente de  $1/V^2$  en función del tiempo durante un período particular de tiempo, según se ilustra mediante un esquema en la Fig. 17. La Fig. 17 ilustra una representación esquemática de la señal de relajación potenciométrica como una función del tiempo para diferentes valores de  $P_T$ . En este ejemplo, la relajación potenciométrica se inició en un tiempo  $t = 0$  mediante, por ejemplo en esencia, un circuito abierto de la celda electroquímica. El eje y representa la función de  $1/V^2$ , donde  $V$  es el potencial medido, durante un período de tiempo desde  $t_1$  hasta  $t_2$ . Las trazas de datos 2400, 2405, 2410, y 2415 representan las señales de relajación a partir de mediciones con diferentes valores de  $P_T$ . En este ejemplo, el valor de  $P_T$  asociado con los datos 2400 es menor que el valor de  $P_T$  asociado con los datos 2405, que a su vez es menor que el valor de  $P_T$  asociado con los datos 2410, que a su vez es menor que el valor de  $P_T$  asociado con los datos 2415. En este ejemplo, está claro que hay una relación, en esencia, lineal entre  $1/V^2$  y el tiempo. Por lo tanto, se puede obtener una medida de la velocidad de relajación determinando una pendiente de estos datos en un período de tiempo, por ejemplo, entre el instante  $t_1$  y el instante  $t_2$ . Una pendiente se puede calcular mediante medios bien establecidos en álgebra lineal, incluyendo, entre otros, un método de mínimos cuadrados.

La Fig. 18 ilustra en forma esquemática un ejemplo de cuantificación de una medida de  $P_T$  a partir de los datos medidos. Se puede construir una curva de calibración que relacione  $P_T$  con una medida de  $P_T$ . El ejemplo ilustrado por el esquema de la Fig. 18 muestra que una cierta función de la pendiente de  $1/V^2$  en función del tiempo - representada como  $f(\text{pendiente})$  en el eje y - se puede utilizar como una medida de  $P_T$ . Una forma de realización de ejemplo de una función de este tipo es:

$$f(\text{pendiente}) = \frac{1}{\sqrt{\text{pendiente}}}$$

donde pendiente es la pendiente de la gráfica de  $1/V^2$  en función del tiempo durante una parte de tiempo. En la Fig. 18, el punto 2500 corresponde a la traza de datos 2400 en la Fig. 17; el punto 2505 corresponde a la traza de datos 2405 en la Fig. 17; el punto 2510 corresponde a la traza de datos 2410 en la Fig. 17; el punto 2515 corresponde a la traza de datos 2415 en la Fig. 17. Por lo tanto, se puede calcular una medida de  $P_T$  a partir de los datos potenciométricos medidos. Una vez que la medida de  $P_T$  se determina, este valor se puede utilizar según se

describió anteriormente para ajustar diversas cantidades para obtener una estimación más precisa de la concentración del analito.

Ejemplo 5: Realización de corrección con sistema transitorio.

5 La invención también se puede utilizar en situaciones donde el sistema no ha alcanzado el estado estacionario; un estado de este tipo también se conoce comúnmente como un estado transitorio. Los ejemplos de un sistema en estado transitorio incluyen, entre otros, una señal de respuesta cuyas características varían con el tiempo, un perfil de concentración en una muestra que varía, en esencia, con el tiempo y una reacción química que no ha alcanzado el equilibrio.

10 Una diferencia entre un sistema en estado estacionario y un sistema transitorio es que se espera que las señales generadas por un sistema en estado estacionario contengan información significativa acerca de un término de distancia relacionado con la distancia de separación entre los electrodos y/o información sobre un término de transporte relacionado con las propiedades de transporte de la muestra (por ejemplo, un coeficiente de difusión efectivo o un término de movilidad). Por ejemplo, según se describió anteriormente  $P_T$  se puede describir en parte mediante un término de separación de electrodos efectivo  $h$ , así como otros términos relacionados con las propiedades de transporte de la muestra, tales como un término de difusión  $D$ , una velocidad de deriva  $s$  y/o un término de movilidad  $U$ . No se espera que las señales generadas por un sistema transitorio contengan información significativa sobre un término de distancia relacionado con una distancia de separación entre electrodos, pero se espera que contengan información relacionada con las propiedades de transporte de la muestra. Sin embargo, incluso en sistemas transitorios, puede haber información significativa relacionada con un término de distancia eficaz, aunque ese término de distancia puede no estar directamente relacionado con una distancia de separación geométrica entre dos electrodos.

20 En un sistema de estado estacionario, hay una transferencia considerable de información química desde un electrodo a otro a través de la muestra mediante los gradientes de concentración de especies químicas en la vecindad de un electrodo perturbado por los procesos que ocurren en otro electrodo. Un ejemplo de esto es cuando los productos de reacción de un electrodo alcanzan el otro electrodo. En un sistema transitorio, no existe transferencia considerable de información química a través de la muestra de un electrodo a otro. Por ejemplo, los productos de reacción de un electrodo pueden no haber alcanzado, en esencia, el otro electrodo, por lo que se espera que haya poca información en la señal acerca de una medida de la distancia entre los electrodos. Sin embargo, se espera que haya información sobre el transporte de analito en la muestra, por ejemplo, un término de transporte relacionado con un término de difusión, un término de movilidad o un término de longitud de la trayectoria eficaz. Un ejemplo de un término de longitud de trayectoria de este tipo es un término de distancia eficaz relacionado con el transporte de analito en una muestra que comprende sustancias tales como glóbulos rojos u otros cuerpos. Los cuerpos en una muestra pueden afectar el transporte del analito en una muestra, y por lo tanto, una capacidad de corregir dichas variaciones relacionadas con el transporte en sistemas transitorios sería útil y beneficiosa para aumentar la exactitud y/o la precisión de un sistema sensor.

25 La Fig. 19 ilustra de forma esquemática ejemplos de señales amperométricas para un sistema transitorio. En este ejemplo, se muestran tres trazas de corriente que corresponden a diferentes concentraciones de glucosa. La traza 2900 es la concentración más baja, la traza 2905 es la concentración intermedia y la traza 2910 es la concentración más alta. Las señales se dividen en seis regiones en el tiempo según se muestra. En este ejemplo, la muestra se introdujo dentro de la cámara de muestras en  $t = 0$ , momento en el cual el potencial se incrementó a un nivel suficiente para generar una corriente, en esencia, limitada por difusión. El aumento en la corriente desde  $t = 0$  a  $t = t_1$  se puede atribuir predominantemente a la carga de doble capa capacitiva. La disminución de la corriente desde  $t_1$  a  $t_2$  se puede atribuir predominantemente a la estabilización de la doble capa. El aumento en la corriente entre  $t_2$  y  $t_3$  se puede atribuir predominantemente al aumento del mediador reducido, ferrocianuro en este ejemplo, a partir del progreso de la reacción química con un analito en la muestra (en este ejemplo, la reacción química es la reacción enzimática con glucosa). La corriente alcanza un máximo local aproximadamente en el tiempo  $t_3$ , momento en el cual el progreso de la reacción enzimática se equilibra mediante la difusión que gobierna el transporte de la especie electroactiva procesada, el mediador en este ejemplo, a los electrodos, dando como resultado una caída en la corriente después del tiempo  $t_3$ . La corriente descendente en algunos casos continúa disminuyendo si hay un perfil de difusión semi-infinito claro durante el curso de la medición.

30 Dado que la señal de corriente continúa cayendo, se puede decir que este sistema se encuentra en un estado transitorio. La señal transitoria se puede analizar y cuantificar para determinar una medida de la concentración del analito, y no es necesaria una corriente de estado estacionario para utilizar la invención. Un ejemplo del tipo de análisis que se puede realizar con una corriente transitoria está relacionado con la ecuación de Cottrell. Por supuesto, la ecuación de Cottrell se aplica a un conjunto particular de condiciones de medición y se pueden utilizar otras ecuaciones para describir un sistema dependiendo de las condiciones de medición. Una ecuación de ejemplo que se puede utilizar es calcular una raíz cuadrada de una pendiente de  $1/I^2$  durante una parte de tiempo como una medida de la concentración de glucosa. En el ejemplo esquemático de la Fig. 19, una parte de tiempo después de la corriente es, en esencia, independiente de la reacción enzimática (por ejemplo, después de un pico en la corriente aproximadamente en el instante  $t_3$ ), tal como el tiempo entre  $t_4$  y  $t_5$  se puede utilizar para dicha cuantificación. En

este ejemplo, se puede utilizar una ecuación basada en la ecuación de Cottrell para describir la corriente de un sistema transitorio de la siguiente manera:

$$I = nFAC \sqrt{\frac{D}{\pi(t-t_0)}}$$

$$5 \quad \frac{1}{I^2} = \left( \frac{\pi}{(nFA)^2} \right) \frac{1}{DC^2} (t-t_0)$$

$$\frac{1}{I^2} = \alpha + \beta$$

$$10 \quad \alpha = \frac{\pi}{(nFA)^2 DC^2}$$

$$\beta = - \left( \frac{\pi}{(nFA)^2} \right) \frac{1}{DC^2} t_0$$

15 donde  $t_0$  es un tiempo de referencia, y los otros símbolos conservan sus significados habituales. La pendiente, dada por  $\alpha$ , y  $D$  se puede utilizar para determinar una medida de concentración,  $C$ . Por lo tanto, es posible cuantificar la concentración para un sistema que tenga un valor conocido para  $D$ , determinando la pendiente  $\alpha$ , por ejemplo, mediante una ecuación de estimación tal como:

$$C = \sqrt{\frac{\pi}{(nFA)^2 D \alpha}}$$

Surge un problema si la muestra, el aparato y/o los factores ambientales varían y provocan un cambio desconocido en el valor aparente de  $D$ . En un caso de este tipo, la estimación de la concentración,  $C$ , variaría posteriormente de manera desconocida, dando como resultado una menor exactitud y/o precisión.

20 Con un sistema transitorio de este tipo, el aparato se puede conmutar al modo potenciométrico para controlar una relajación potenciométrica para determinar una medida de las variaciones en el transporte y/o la longitud de la trayectoria relacionadas con propiedades del sistema. En este ejemplo, se utilizaría una relajación potenciométrica para determinar una medida efectiva de  $D$ , que se utilizaría para estimar la concentración. Por lo tanto, el método y el aparato de la invención no requieren un sistema de estado estacionario o estado casi estacionario; en cambio, el método y el aparato de la invención se pueden utilizar con un sistema transitorio.

25 Un factor que puede influir en la naturaleza transitoria o de estado estacionario del sistema es la geometría de la celda electroquímica. Un ejemplo de un factor geométrico de este tipo es la distancia efectiva entre los electrodos. Cuanto menor sea la distancia efectiva, menor será el tiempo que tarda el sistema en alcanzar un estado estacionario. En este ejemplo, el estado estacionario se puede definir como cuando la señal amperométrica alcanza un valor casi estacionario. Cuanto mayor sea la distancia efectiva entre los electrodos, más tiempo generalmente se tarda en alcanzar un estado estacionario. Por lo tanto, si el sistema está en modo de estado estacionario o transitorio cuando se cambia el funcionamiento desde amperométrico a potenciométrico puede depender tanto de la distancia efectiva entre los electrodos como del momento en que cambia el modo de funcionamiento. Por ejemplo, si la separación efectiva es lo suficientemente grande para que el estado estacionario no se logre, en esencia, dentro de un período de tiempo dado, entonces el modo de funcionamiento se puede cambiar al modo potenciométrico mientras está en el estado transitorio. Un beneficio útil de utilizar el método y el aparato de la invención con un sistema transitorio es que se puede realizar una medición en menos tiempo. Al igual que en la medición de estado estacionario en el Ejemplo 4, para las mediciones transitorias hay, en esencia, una relación lineal entre  $1/V^2$  y el tiempo. Por lo tanto, se puede obtener una medida de la velocidad de relajación determinando una pendiente de estos datos en un período de tiempo, por ejemplo, entre el instante  $t_1$  y el instante  $t_2$ . Una pendiente se puede calcular por medios bien establecidos en álgebra lineal, incluyendo, entre otros, un método de mínimos cuadrados. Pueden existir otras relaciones para diferentes geometrías de electrodos.

35 Las Fig. 20A-C ilustran en forma esquemática varios ejemplos de señales amperométricas que se pueden generar mediante sistemas de biosensores basados en celdas de conducción. La Fig. 20A ilustra un escenario de ejemplo donde la distancia de separación eficaz entre los electrodos es lo suficientemente grande como para permitir que al menos una parte de la señal de respuesta siga una forma transitoria que se puede describir por una relajación relacionada con la ecuación de Cottrell. Esta figura es similar al ejemplo ilustrado en la Fig. 19, excepto que se

muestra que la señal se desvía de una relajación, en esencia, semi-infinita que se puede relacionar, en esencia, con una relajación de tipo Cottrell (entre  $t_4$  y  $t_5$ ), pasa por una región de transición (entre  $t_5$  y  $t_6$ ) y, finalmente, alcanza un valor, en esencia, de estado estacionario (después de  $t_6$ ). Por lo tanto, se pueden utilizar varias ecuaciones y/o expresiones para describir la respuesta de señal durante estas diferentes regiones. La Fig. 20B ilustra un escenario de ejemplo donde la distancia de separación eficaz entre los electrodos es lo suficientemente grande para permitir una relajación del gradiente de difusión (entre  $t_3$  y  $t_4$ ) pero lo suficientemente pequeña para alcanzar un valor de corriente, en esencia, de estado estacionario (después de  $t_4$ ) sin experimentar significativamente una relajación, en esencia, semi-infinita (por ejemplo, de tipo Cottrell). La Fig. 20C ilustra un escenario de ejemplo donde la distancia de separación eficaz entre los electrodos es lo suficientemente pequeña de manera para que se alcance una corriente, en esencia, de estado estacionario (después de  $t_4$ ) sin experimentar una relajación de la difusión significativa. Estas figuras son formas de realización de ejemplo de señales que se pueden generar por biosensores basados en enzimas y no limitan la invención. Un experto en la técnica reconocerá que son posibles otras respuestas de señal y que la forma de la señal depende de muchos factores, que incluyen, entre otros, factores del aparato, factores de la muestra y factores ambientales.

Otro factor geométrico que puede influir en la naturaleza transitoria o de estado estacionario del sistema es la orientación de los electrodos. Una orientación tradicional para celdas de conducción ha sido para celdas compuestas de dos electrodos, en esencia, paralelos enfrentados entre sí, generalmente con aproximadamente la misma área, según se ilustra mediante el ejemplo de las Fig. 7A-C. La razón principal de una geometría de este tipo ha sido que esta es una orientación conveniente del electrodo para determinar la constante de celda  $K_{celda}$ . Sin embargo, el método y el aparato de la invención permiten que se utilicen otras geometrías en un funcionamiento de celda de conducción. Los ejemplos incluyen celdas compuestas de, en esencia, electrodos coplanares y/o electrodos, en esencia, concéntricos (cuyos ejemplos se muestran en las Fig. 21A-D).

Las Fig. 21A-D ilustran de forma esquemática varias disposiciones de ejemplo de electrodos, en esencia, coplanares. En estas ilustraciones de ejemplo, las disposiciones se componen de un sustrato, en esencia, no conductor 2000, al menos dos electrodos de 2005 y 2020, y al menos dos conductores, en esencia, conductores 2010 y 2015. Los conductores, en esencia, conductores (2010 y 2015) no tienen que ser de material diferente de los electrodos (2005 y 2020). Estas ilustraciones se proporcionan como formas de realización de ejemplo y no limitan la invención. Un experto en la técnica reconocerá que son posibles otras formas de realización, incluyendo, entre otras, diferentes formas, diferentes orientaciones y/o diferentes alineaciones de electrodos.

Otros factores que pueden influir en la naturaleza transitoria o de estado estacionario del sistema son propiedades de la muestra, por ejemplo, la difusión, la movilidad, la longitud de la trayectoria y/o el nivel de hematocrito. Las propiedades de la muestra en sí pueden alterar la velocidad de transporte de las especies, alterando de este modo el tiempo necesario para lograr, en esencia, un sistema de estado estacionario.

Por lo tanto, la invención proporciona un método y un aparato para determinar una medida de  $P_T$  que no requiere que el sistema esté, en esencia, en estado estacionario, sino que se puede implementar en un sistema transitorio. Esto tiene el beneficio útil de reducir, en esencia, el tiempo de medición, ya que un usuario no tiene que esperar hasta que se haya alcanzado, en esencia, un estado estacionario. Otro beneficio útil es que se pueden utilizar diferentes geometrías de celda, que incluyen, por ejemplo, disposiciones de electrodos orientados en paralelo, coplanares y/o concéntricos, ya que dichas geometrías pueden no alcanzar rápida y fácilmente, en esencia, un estado estacionario. Además, dado que la invención también se puede utilizar con sistemas transitorios, no existe ningún requisito de que los electrodos deban estar lo suficientemente cerca entre sí para lograr un funcionamiento, en esencia, de estado estacionario. Se sabe que las celdas electroquímicas fabricadas en estas escalas más grandes son más fáciles y, por lo tanto, menos costosas de fabricar.

#### Referencias citadas

Schmidt-Weinmar, von HG "Ueber die Polarization einer symmetrischen Redoxzelle mit kleinem Elektrodenabstand: Eine Methode zur Bestimmung der Ionenbeweglichkeit". Berichte der Bunsengesellschaft. Vol. 71, No. 1. 1967.

Brett, CMA y AMO Brett. "Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications", 1ª ed. Oxford University Press, 1993.

MacInnes, DA "The Principles of Electrochemistry". Reinhold Publishing Corp. Nueva York. 1939.

Crow, DR "Principles and Applications of Electrochemistry". 4ª ed. Stanley Thornes Publishers. Cheltenham, Reino Unido. 1998.

Atkins, P. "Physical Chemistry". 6ª ed. Freeman. Nueva York. 1999.

Lathi, BP "Linear Systems and Signals", Berkeley-Cambridge Press, Carmichael, CA 1992.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para evaluar una muestra para la presencia de un analito seleccionado que comprende las etapas de:
  - (a) introducir la muestra (70) dentro de un espacio entre dos electrodos (55, 60) de una celda de conducción (50);
  - (b) aplicar un potencial o corriente entre los dos electrodos suficiente para provocar la oxidación o reducción del analito o de un mediador en un sistema redox de detección de analito, formando de este modo un gradiente de potencial químico del analito o mediador entre los dos electrodos;
  - (c) después de establecer el gradiente, interrumpir el potencial o la corriente aplicados y obtener una señal independiente del analito que refleje la relajación del gradiente de potencial químico;
  - (d) aplicar opcionalmente un potencial o una corriente entre los electrodos después de obtener la señal independiente del analito;
  - (e) obtener una señal dependiente del analito durante la aplicación del potencial o la corriente en la etapa (b) o la etapa (d) o ambas, y
  - (f) corregir la señal dependiente del analito obtenida en la etapa (e) utilizando la señal independiente del analito obtenida en la etapa (c) para obtener una señal corregida dependiente del analito indicativa de la presencia del analito seleccionado en la muestra.
2. El método de la reivindicación 1, en donde se aplica un potencial entre los electrodos en la etapa (b), y la corriente generada como resultado de este potencial aplicado se mide como la señal dependiente del analito.
3. El método de la reivindicación 2, en donde el potencial se aplica hasta que se alcanza una condición de estado estacionario, y a continuación se mide la corriente.
4. El método de la reivindicación 2, en donde la corriente se mide antes de que se alcance una condición de estado estacionario.
5. El método de la reivindicación 1, en donde se mantiene una corriente entre los electrodos en la etapa (b), y el potencial generado como resultado de esta corriente se mide como la señal dependiente del analito.
6. El método de la reivindicación 5, en donde la corriente se mantiene hasta que se alcanza una condición de estado estacionario, y a continuación se mide el potencial.
7. El método de la reivindicación 5, en donde el potencial se mide antes de que se alcance una condición de estado estacionario.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el gradiente de potencial químico antes de la relajación se extiende a través de al menos el 10% de la distancia entre los electrodos.
9. El método de la reivindicación 8, en donde el gradiente de potencial químico antes de la relajación se extiende a través de al menos el 80% de la distancia entre los electrodos.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la muestra es una muestra de sangre y el analito seleccionado es glucosa.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde los electrodos son parte de una tira reactiva desechable de un solo uso.
12. Un aparato para determinar la presencia de un analito en una muestra dispuesta en una celda electroquímica (50), comprendiendo dicha celda electroquímica dos electrodos (55, 60) entre los cuales se coloca la muestra (70) para su análisis, comprendiendo dicho aparato:
  - (a) una carcasa (3000) que tiene un espacio (3005) para recibir la celda electroquímica;
  - (b) medios para aplicar un potencial o una corriente entre los dos electrodos de la celda electroquímica cuando se recibe dentro de la carcasa;
  - (c) medios para medir la oxidación o reducción de un analito o un mediador en un sistema de detección de analitos que ocurre dentro de la celda electroquímica cuando se aplica el potencial o la corriente;
  - (d) medios para desconectar el potencial o la corriente después de un período de tiempo durante el cual se establece un gradiente de potencial químico entre los dos electrodos;
  - (e) medios para controlar un cambio independiente del analito en el gradiente de potencial químico después de que se desconecte el potencial o la corriente;

(f) medios de procesamiento de datos programados para combinar la oxidación o reducción medida con el cambio independiente del analito controlado para producir una indicación de la presencia del analito en la muestra; y

(g) medios de salida (3010) para transmitir la indicación de la presencia del analito en la muestra a un usuario.

5 13. El aparato de la reivindicación 12, que comprende además una celda electroquímica dispuesta dentro de la carcasa.

14. El aparato de la reivindicación 13, en donde la celda electroquímica es una tira reactiva desechable de un solo uso.

15. El aparato de la reivindicación 14, en donde la tira reactiva desechable contiene un sistema redox de detección de analito que comprende una enzima que es capaz de oxidar el analito y un mediador activo redox.

10 16. El aparato de la reivindicación 15, en donde el analito es glucosa y la enzima es glucosa oxidasa.

17. El aparato de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, en donde la carcasa es de un tamaño que se puede sostener en una mano humana.

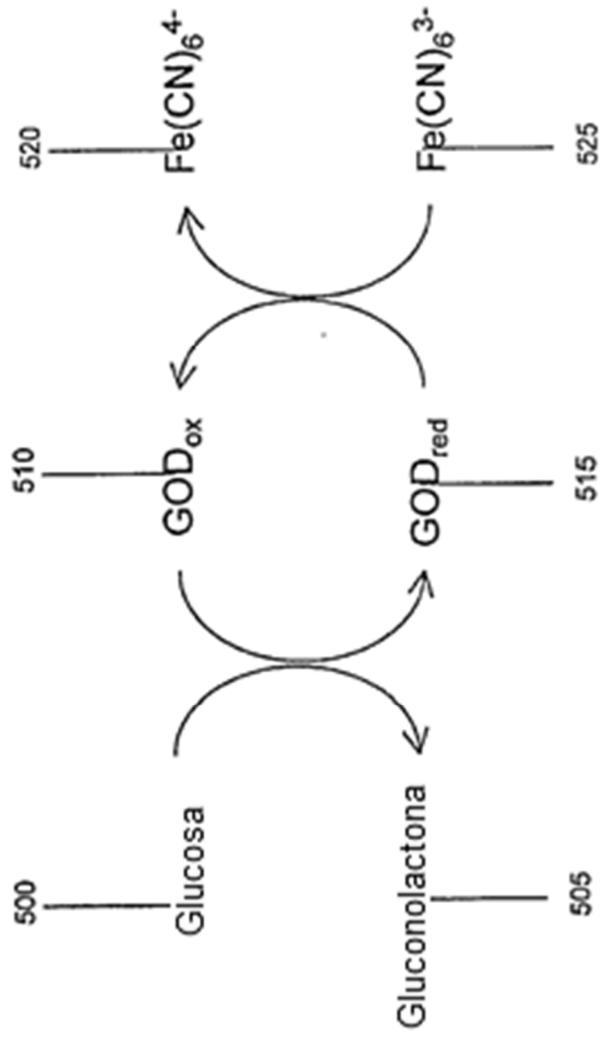


Fig. 1

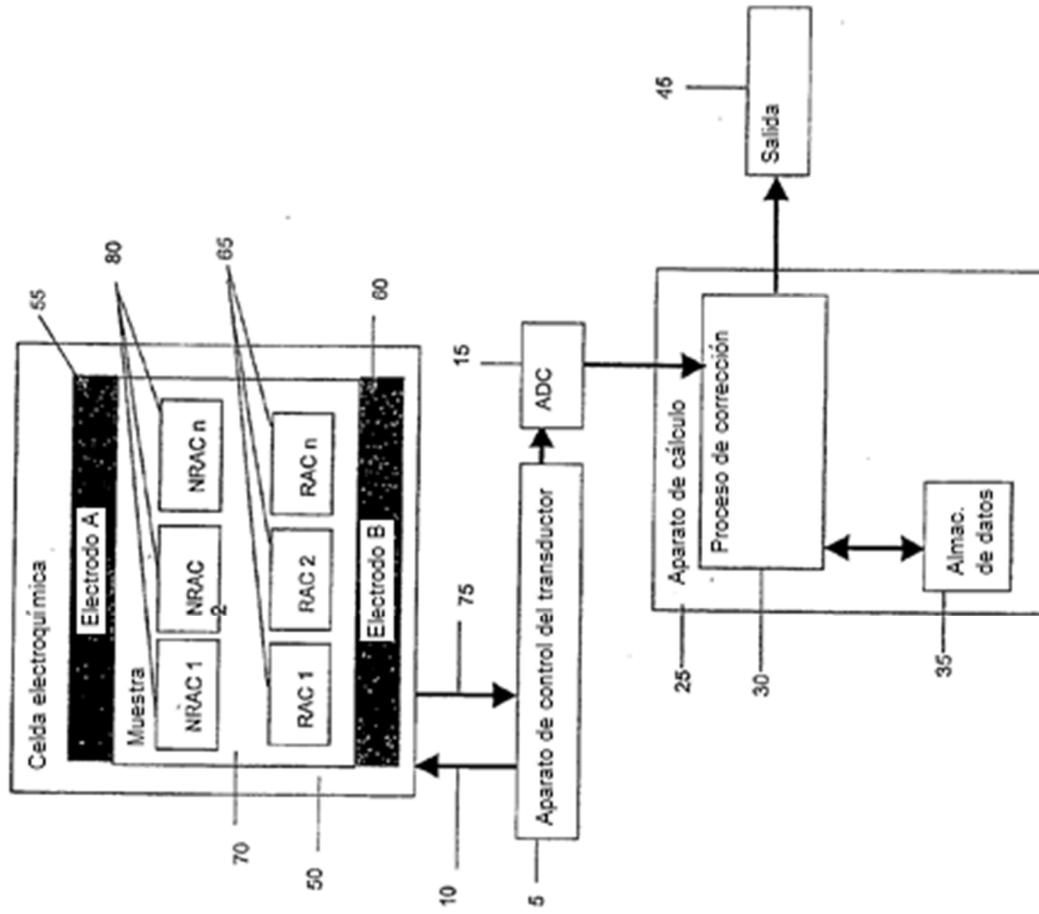


Fig. 2

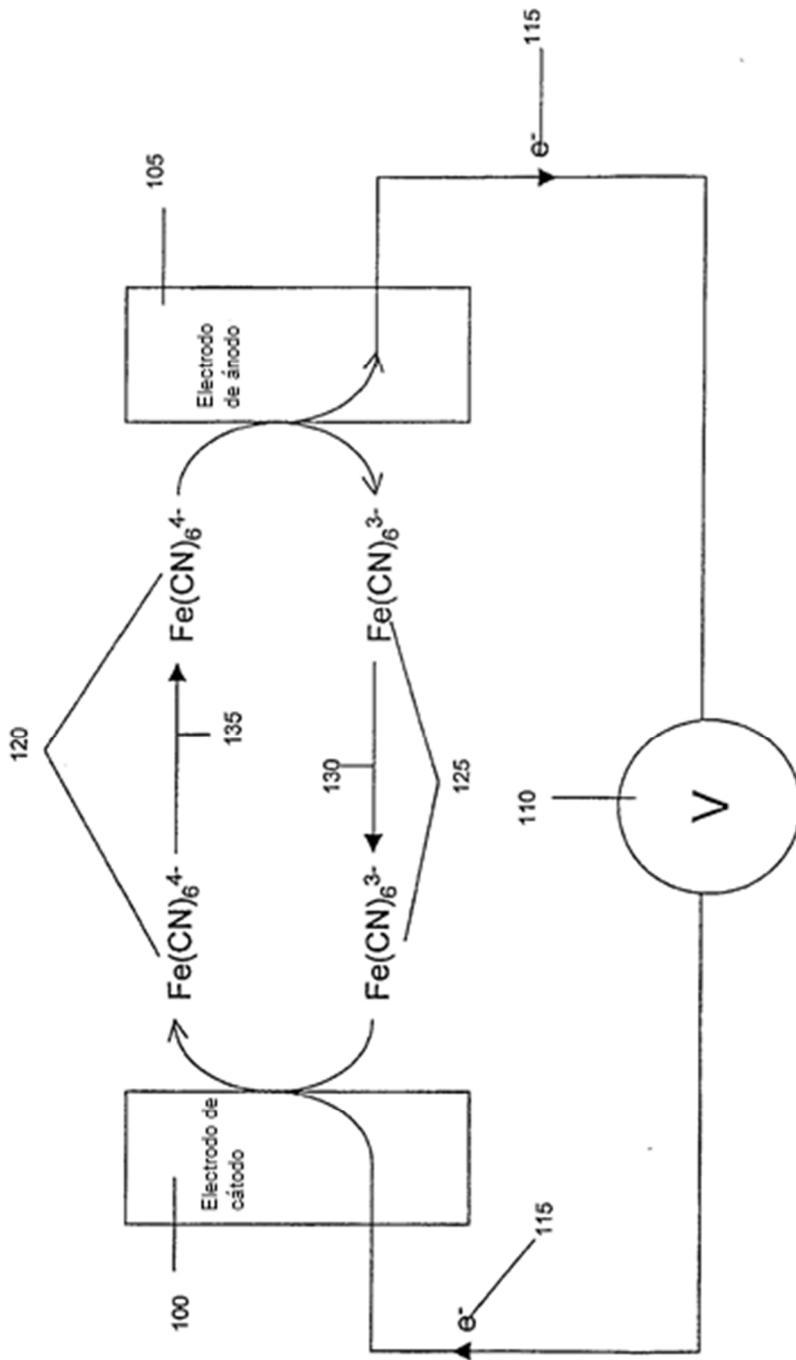


Fig. 3

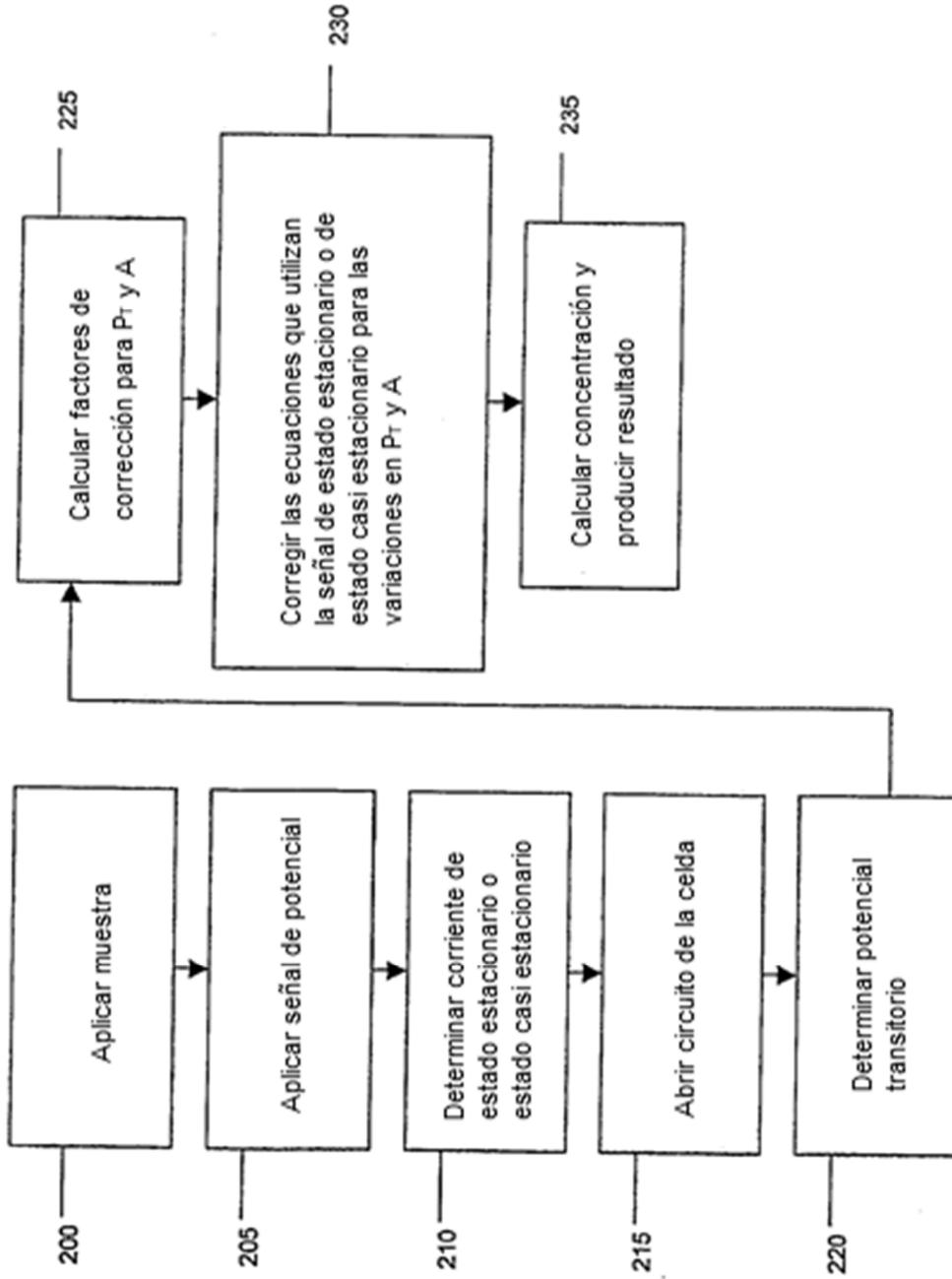


Fig. 4

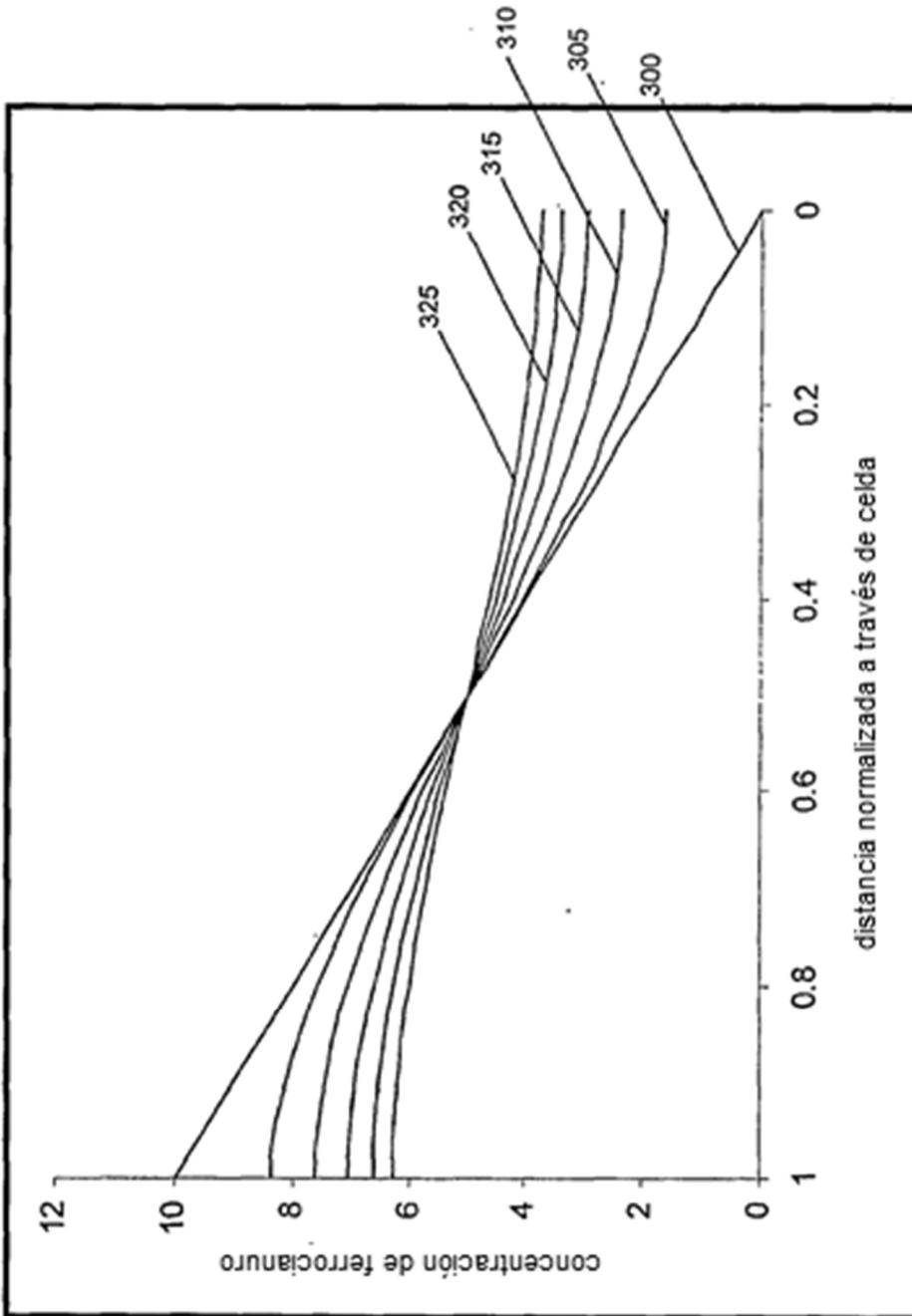


Fig. 5

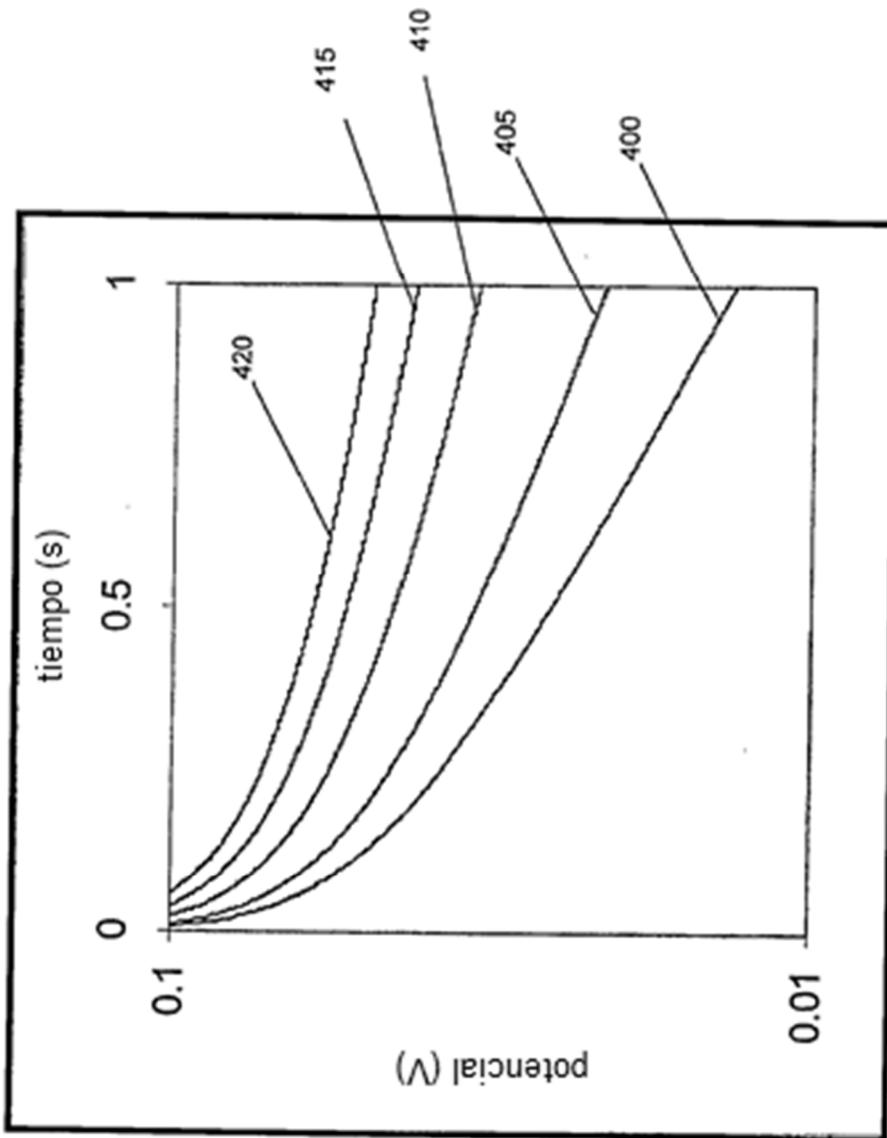


Fig. 6

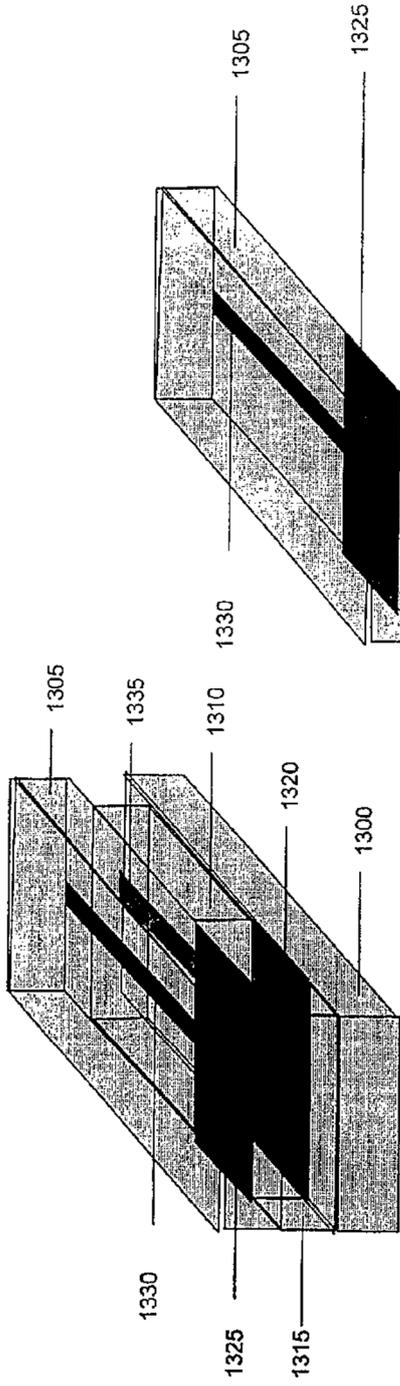


Fig. 7a

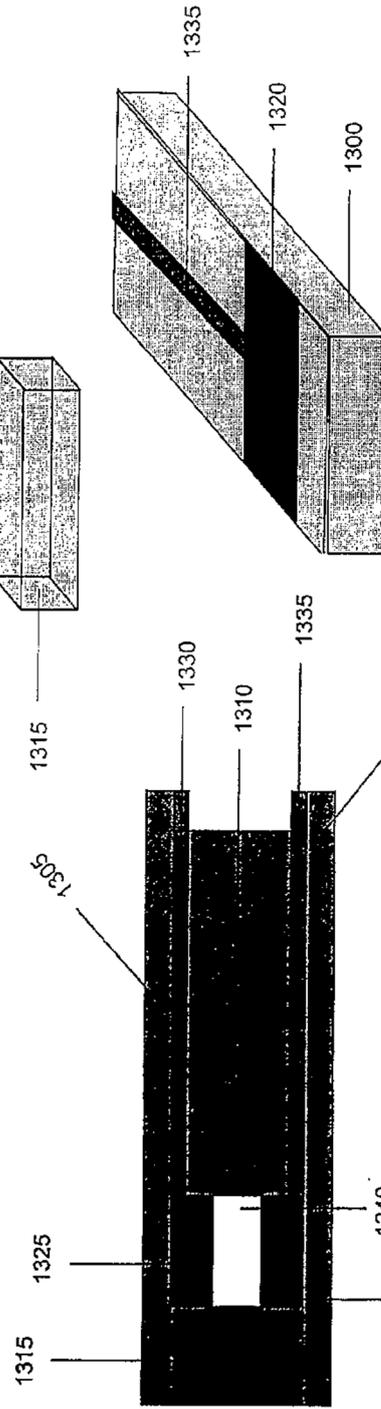


Fig. 7b

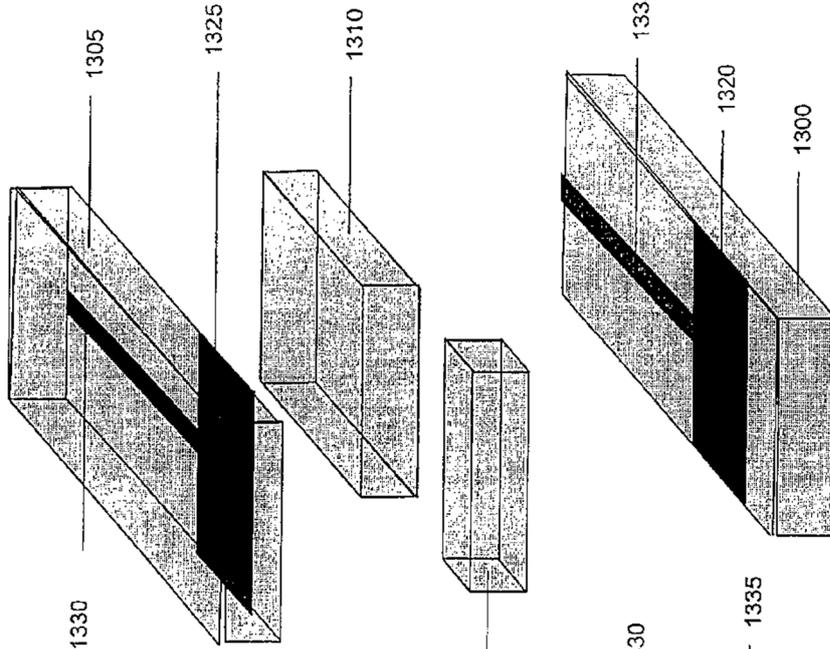


Fig. 7c

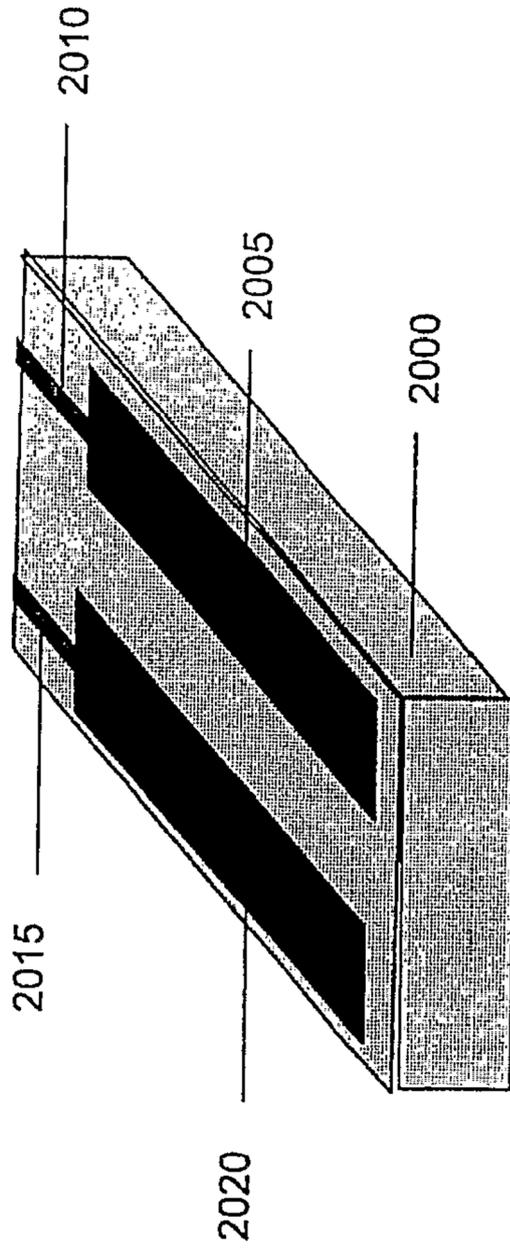


Fig. 8

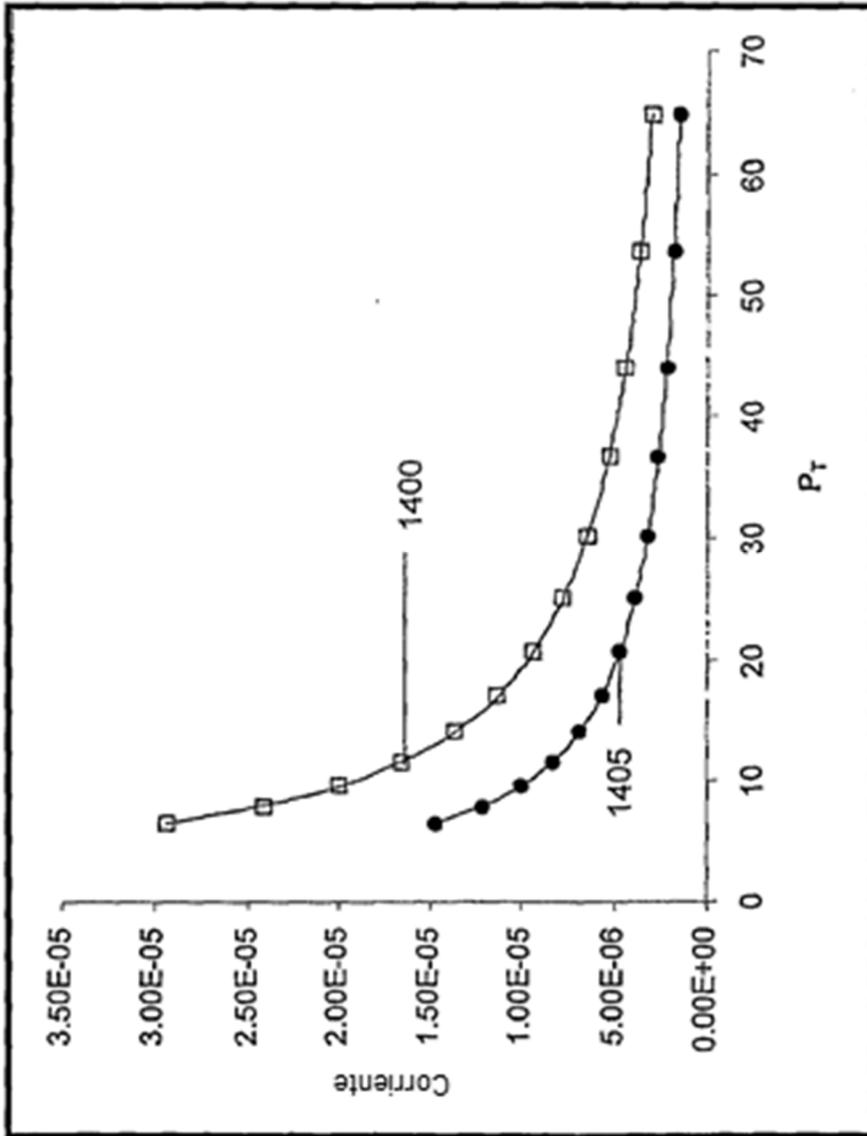


Fig. 9

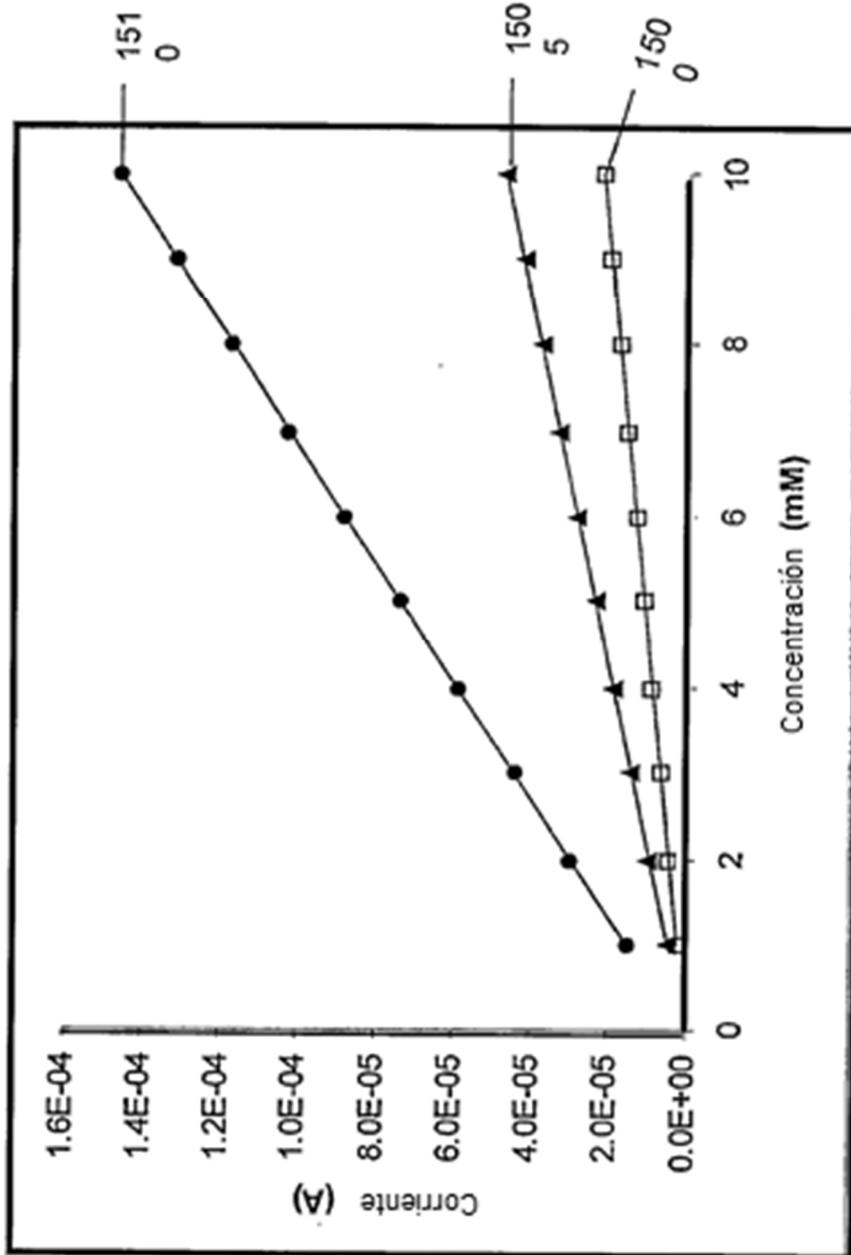


Fig. 10

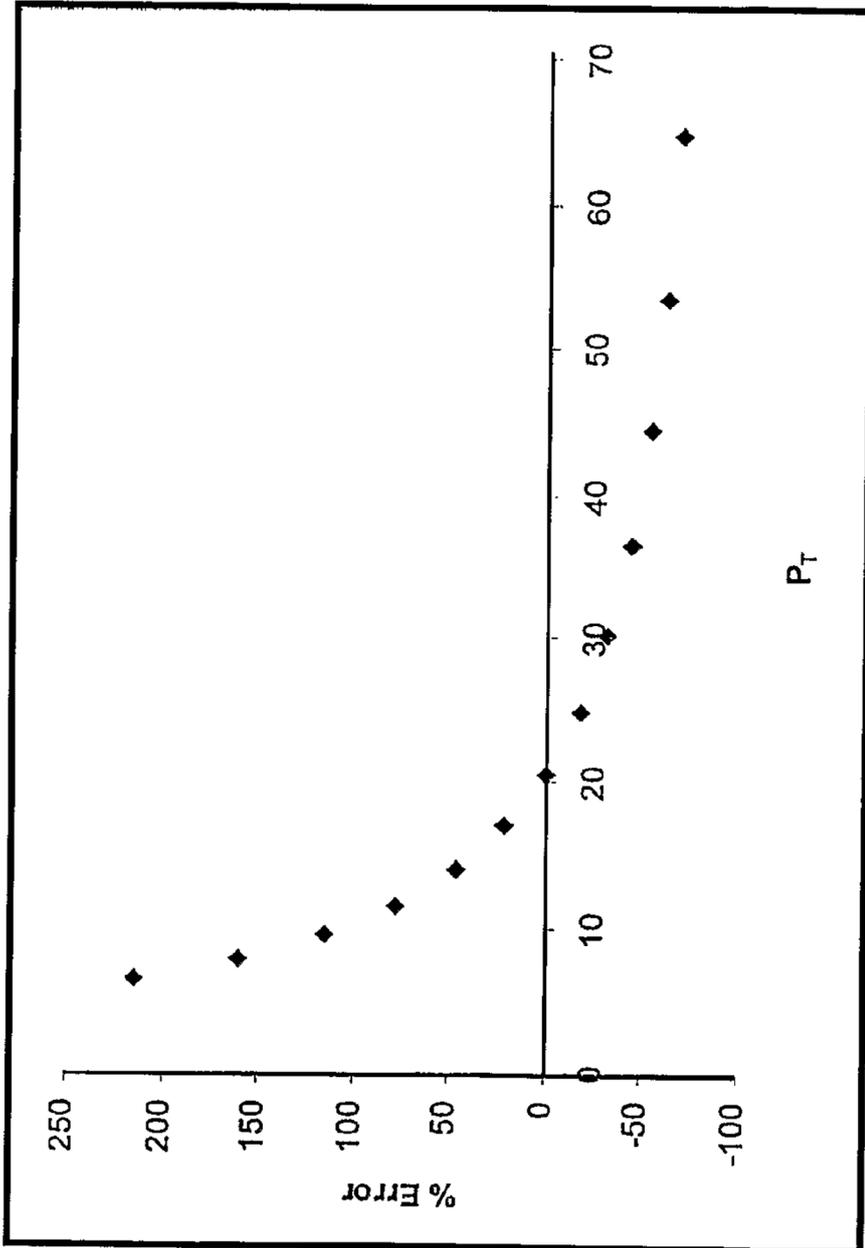


Fig. 11

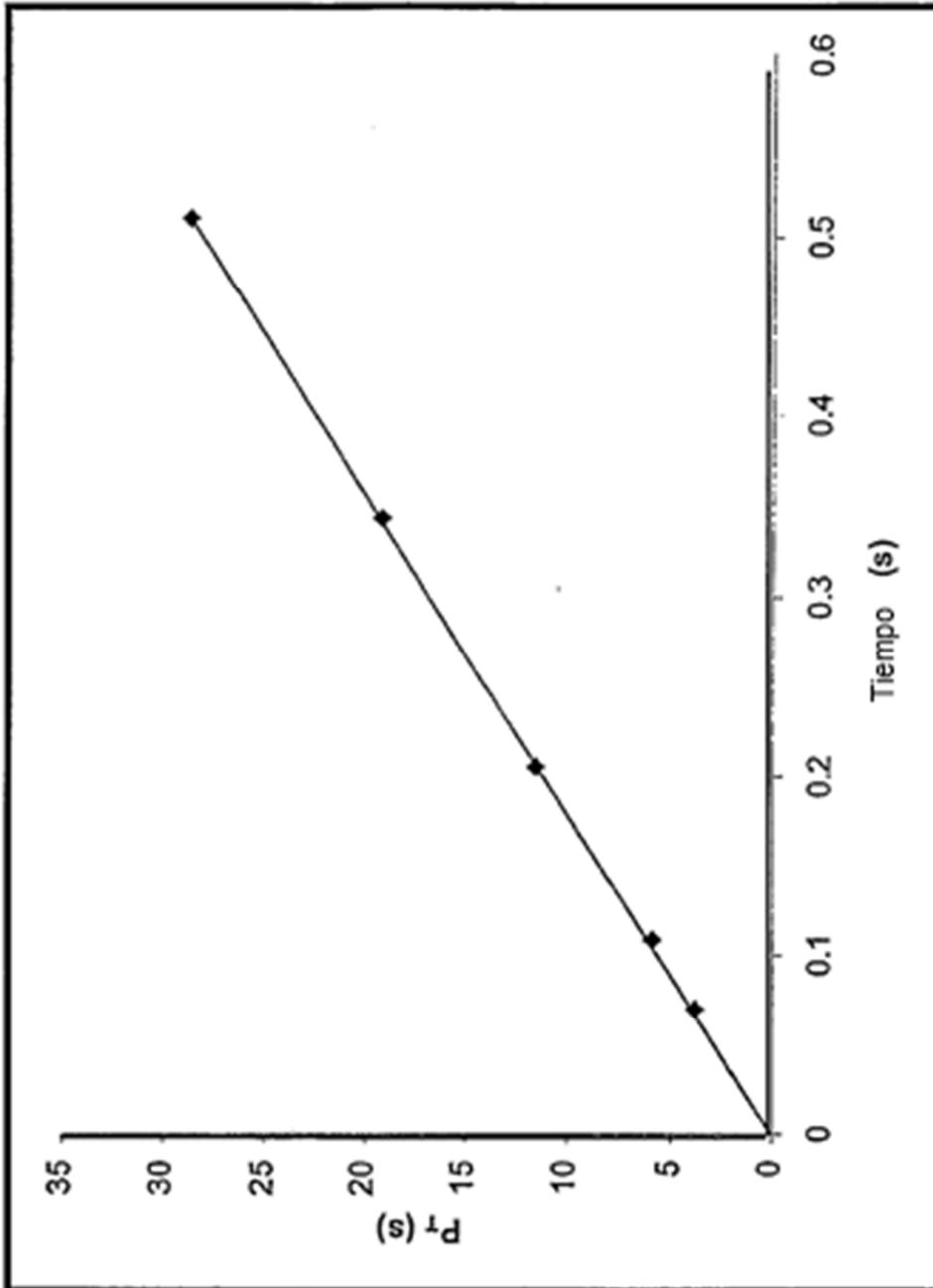


Fig. 12

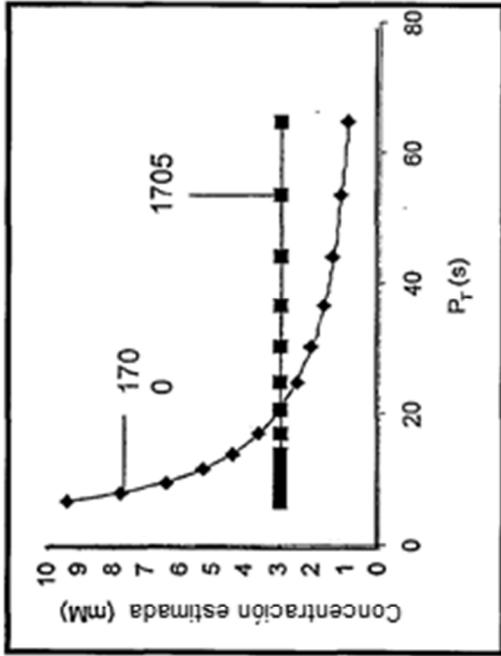


Fig. 13a

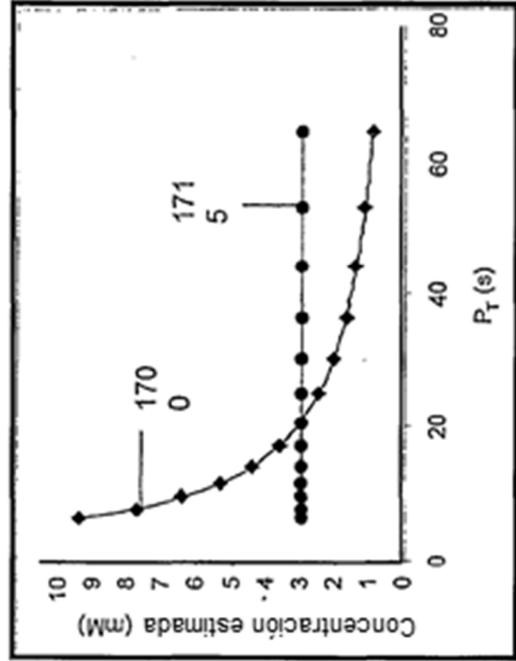


Fig. 13c

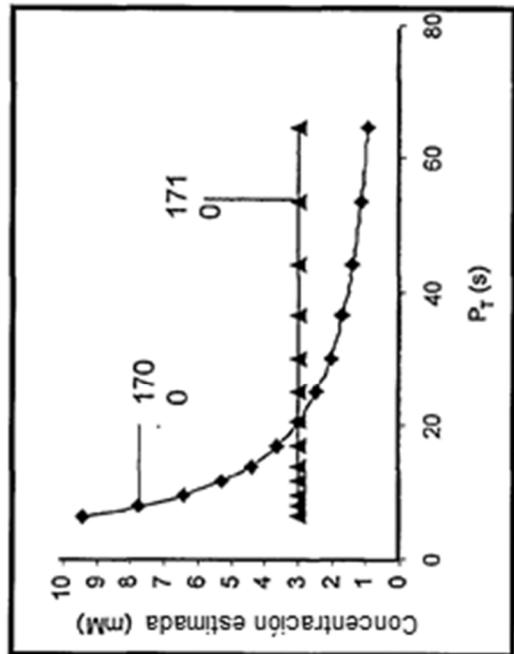


Fig. 13b

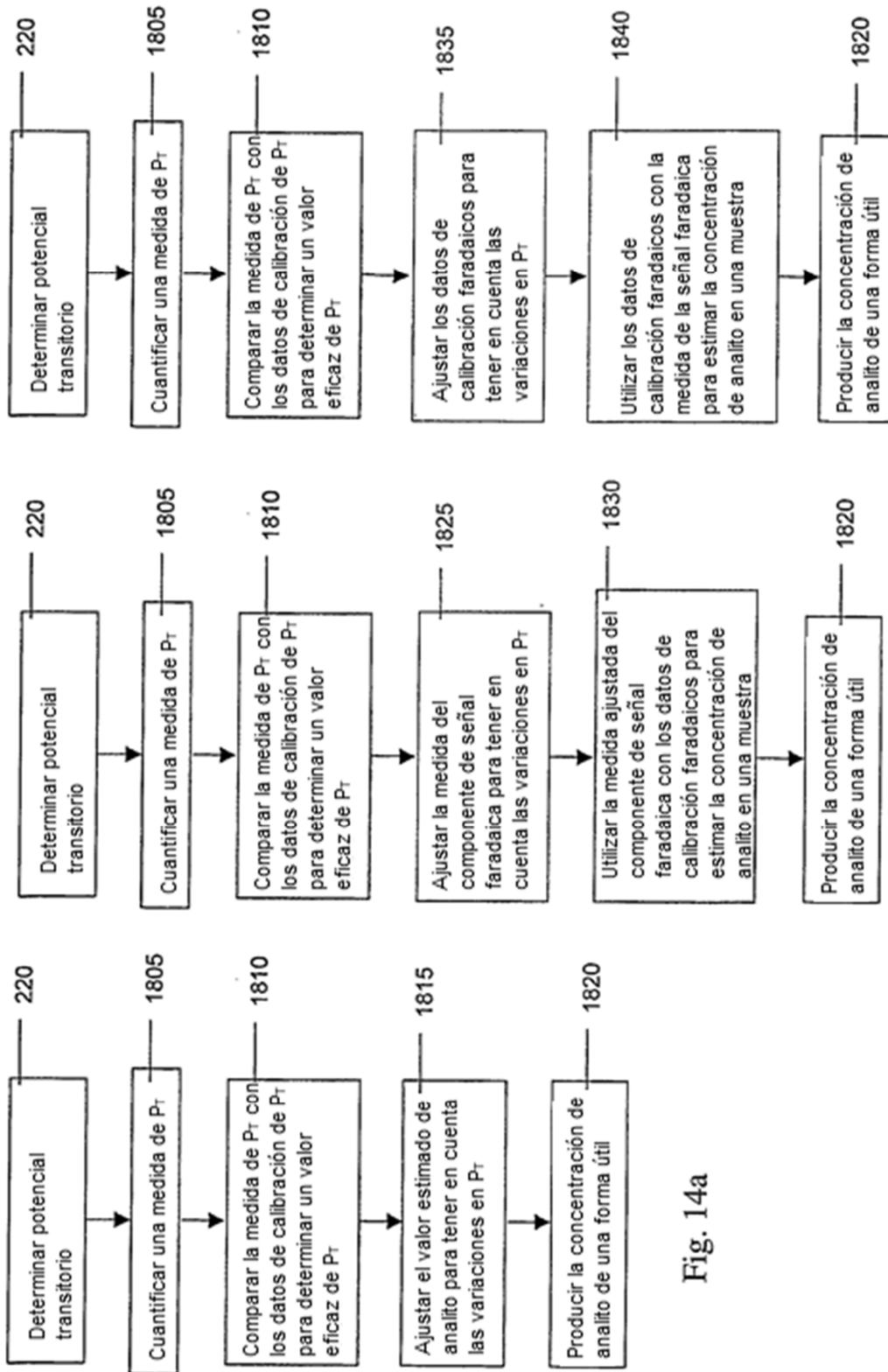


Fig. 14a

Fig. 14b

Fig. 14c

Fig. 15

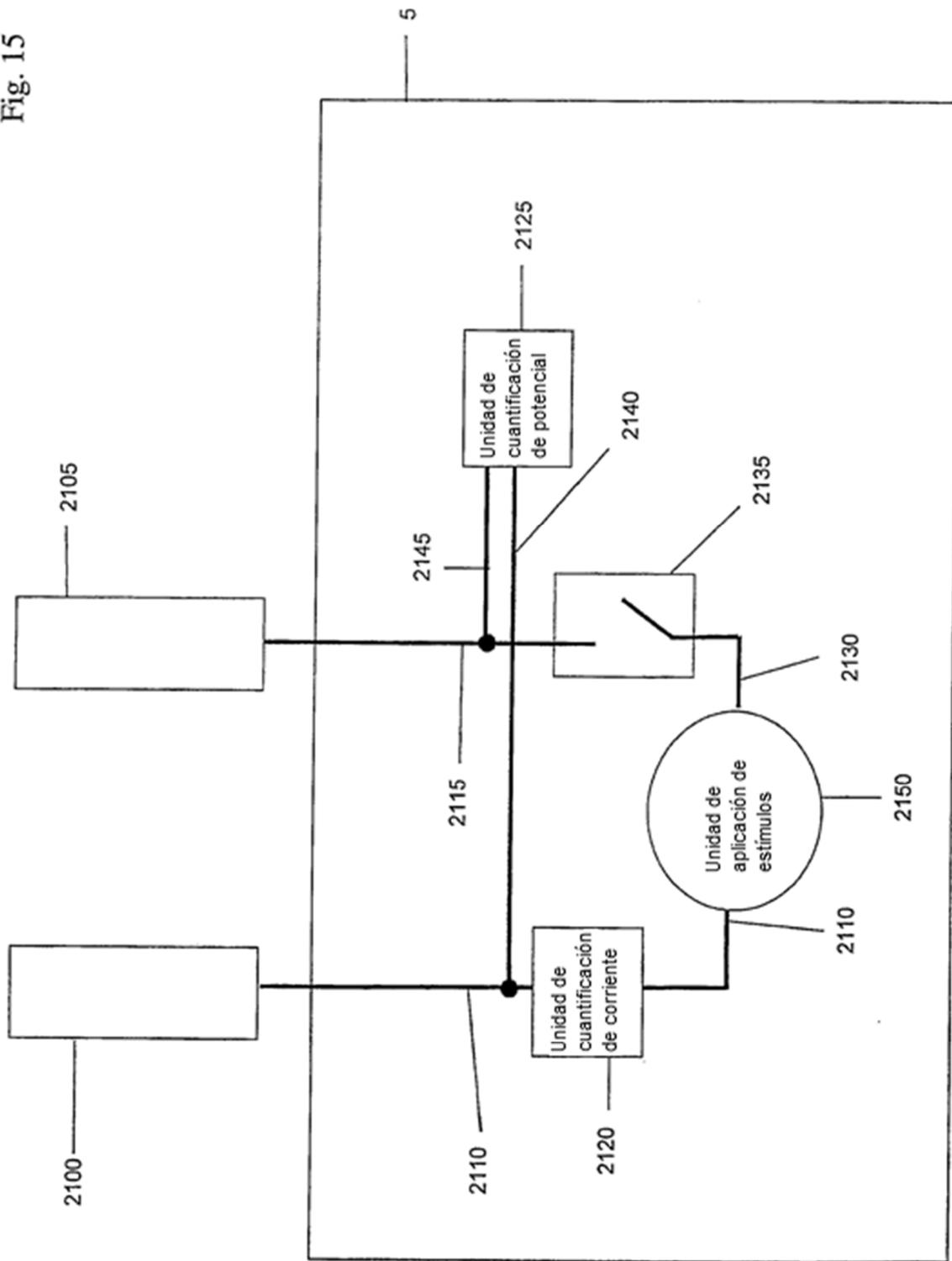
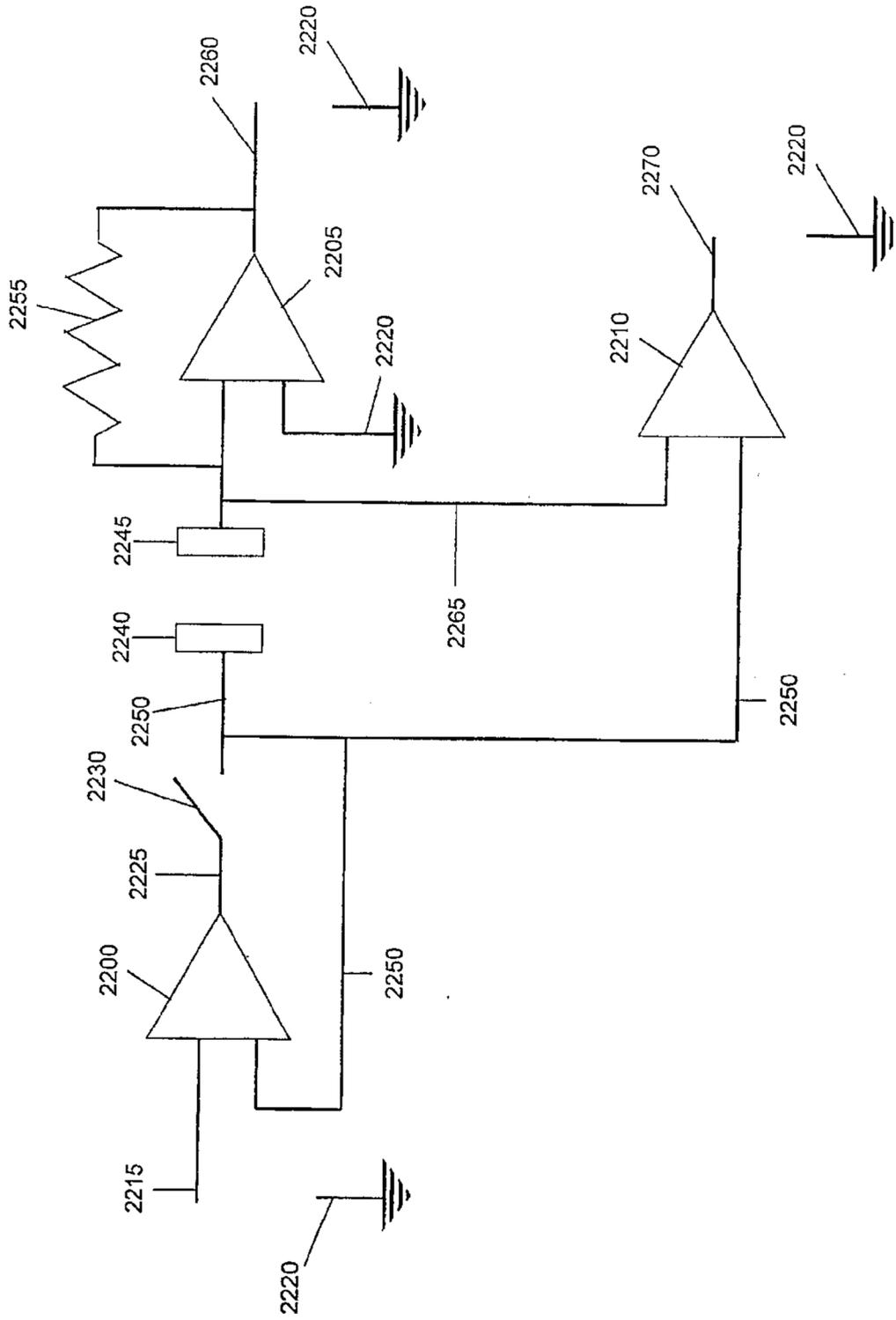


Fig. 16



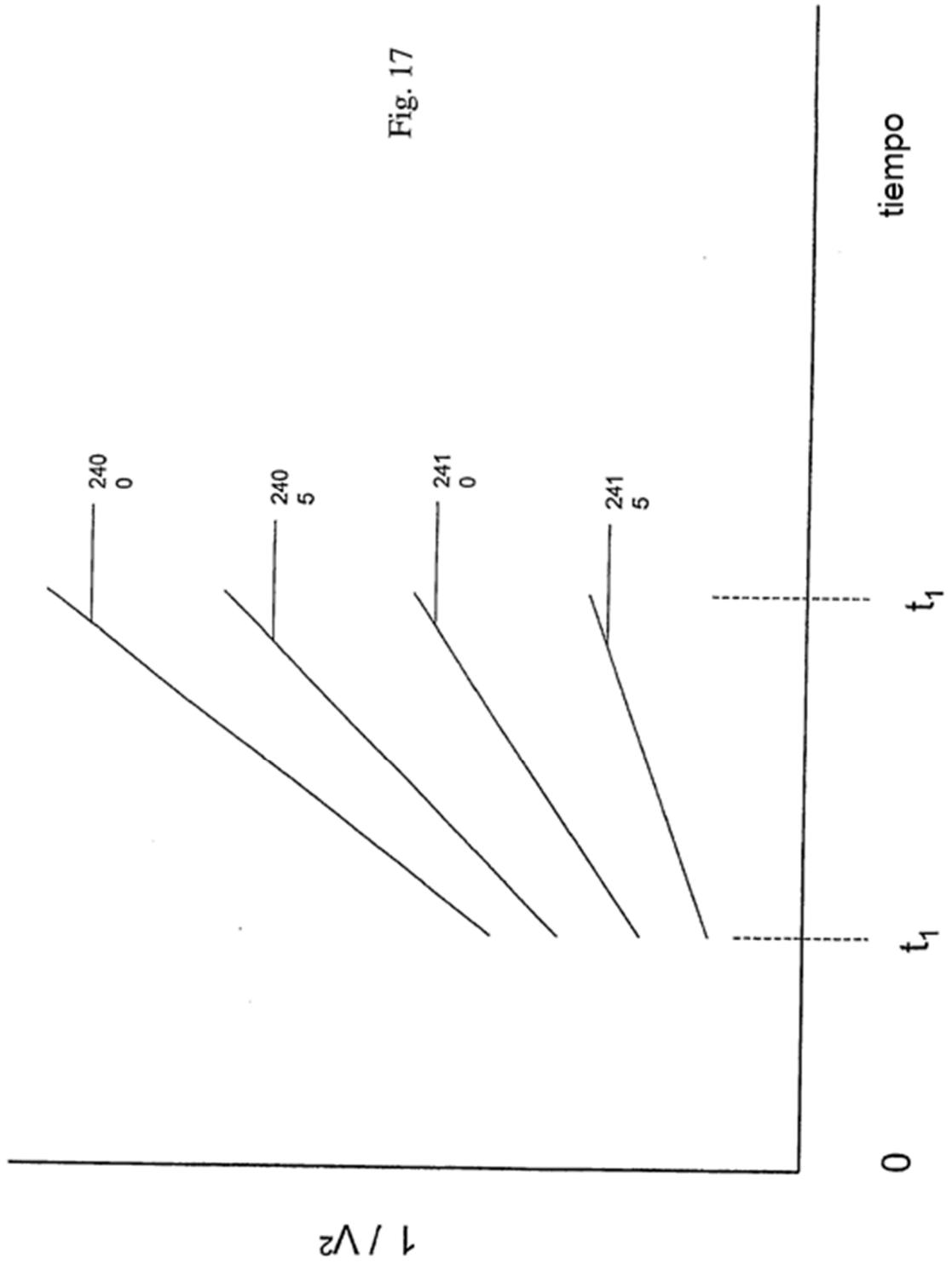


Fig. 17

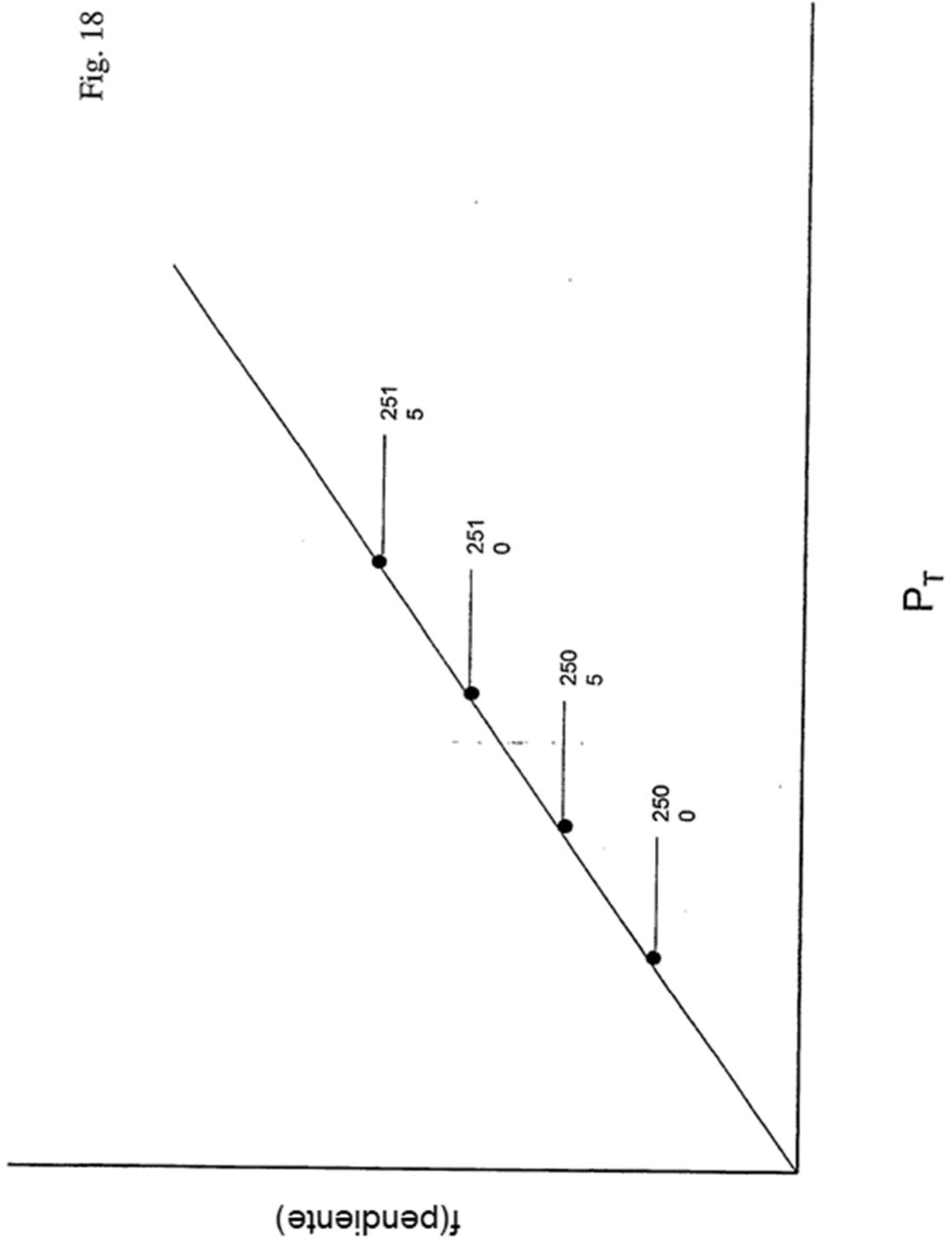


Fig. 18

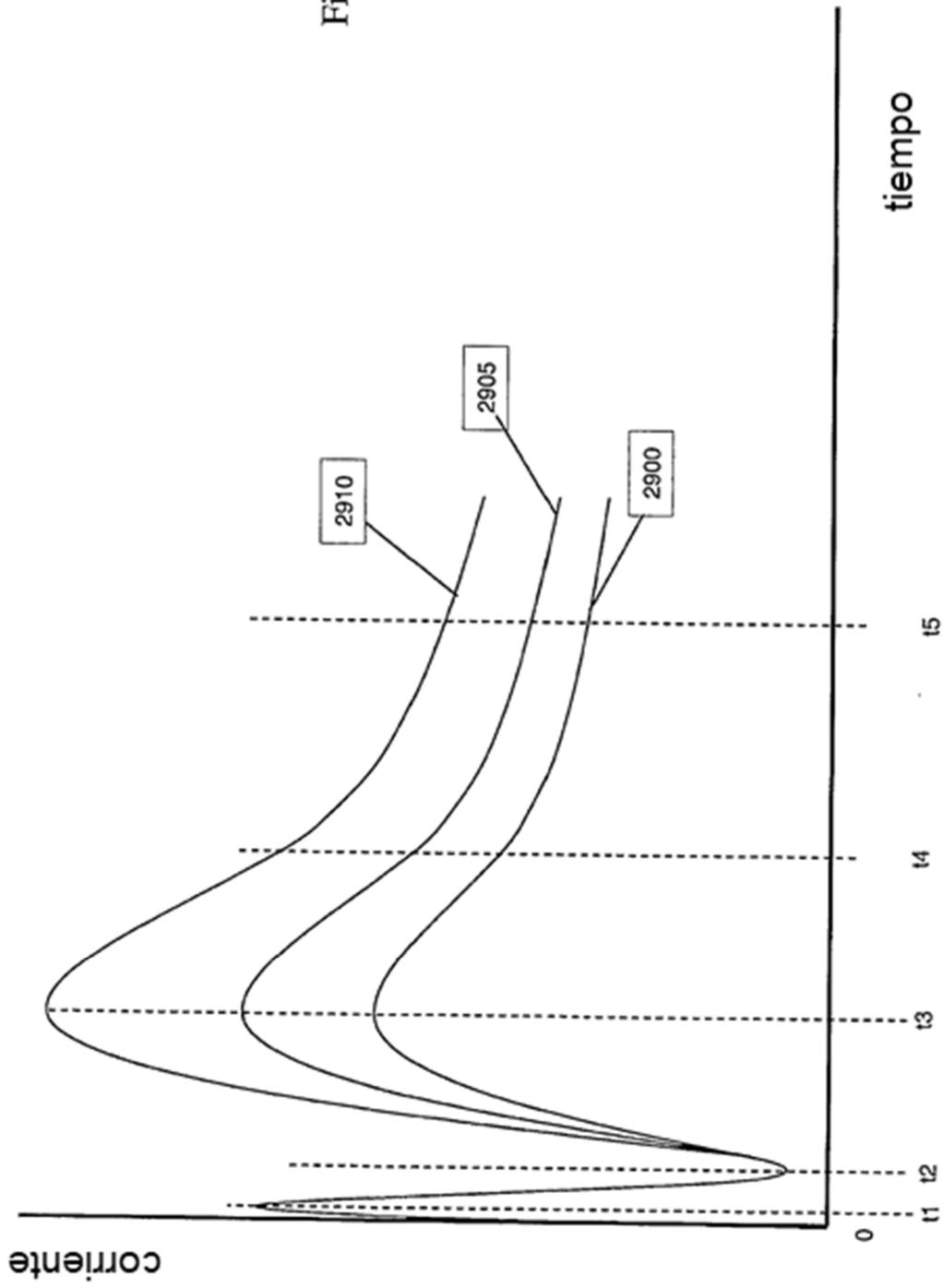


Fig. 19

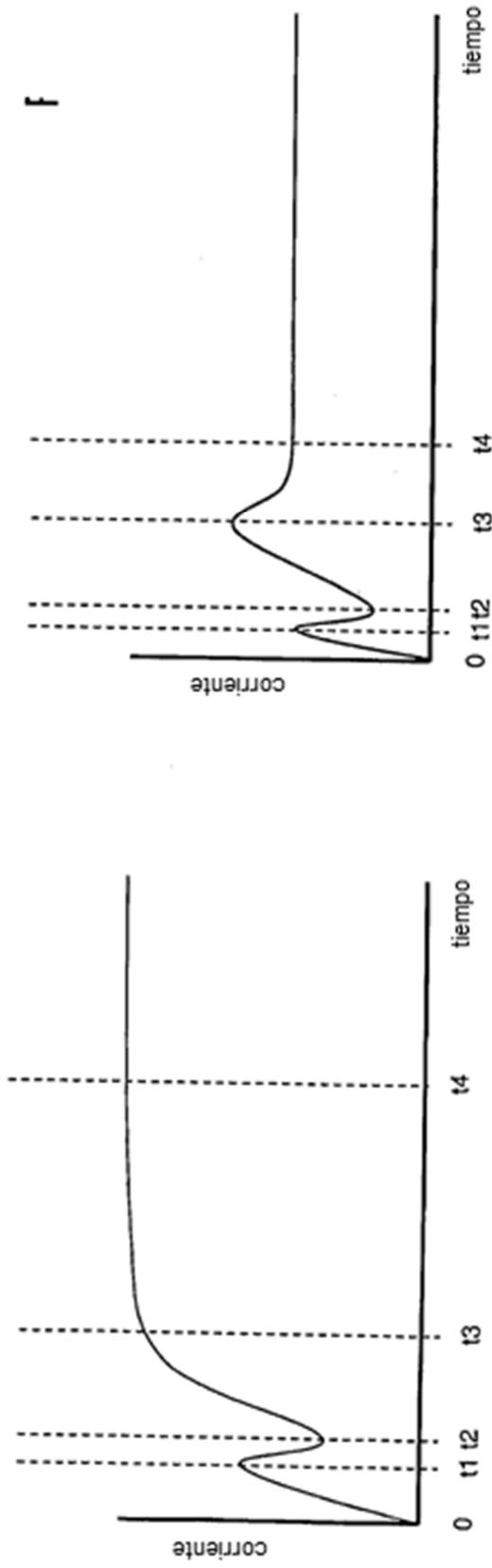


Fig. 20a

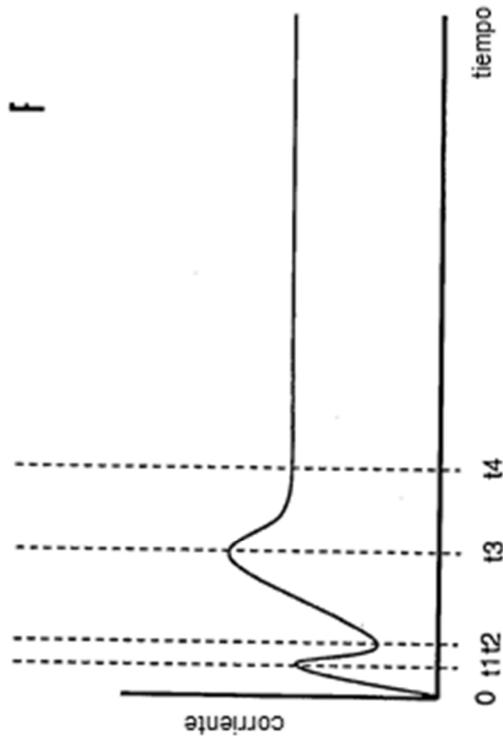


Fig. 20b

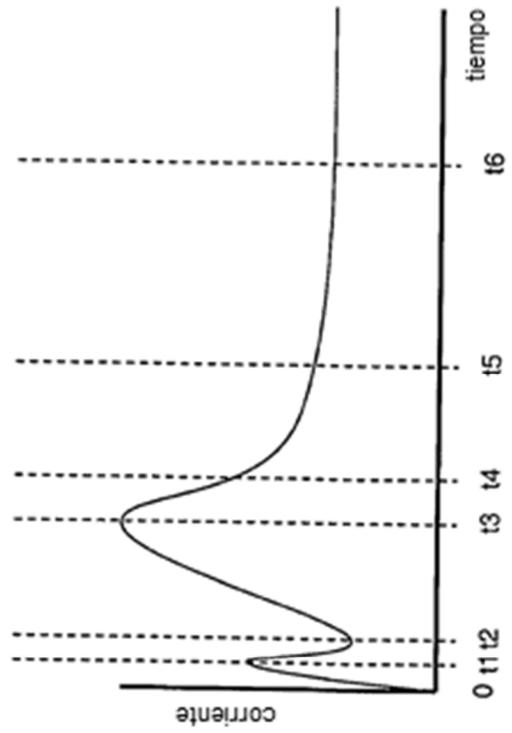


Fig. 20c

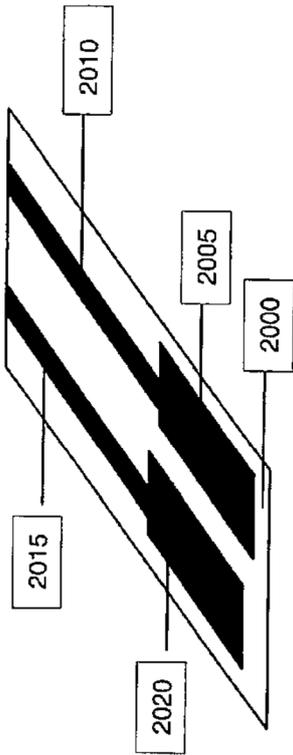


Fig. 21a

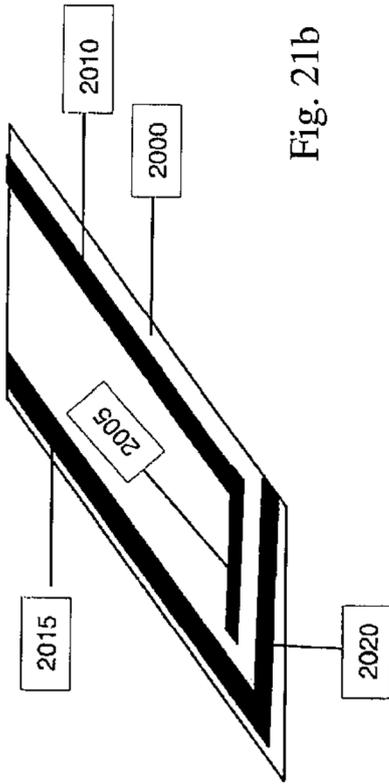


Fig. 21b

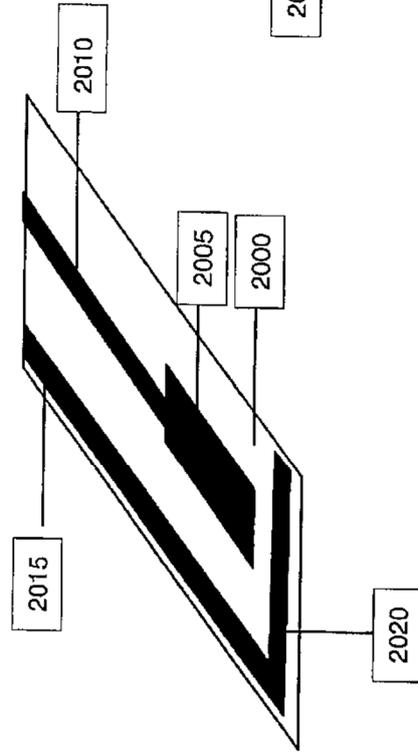


Fig. 21c

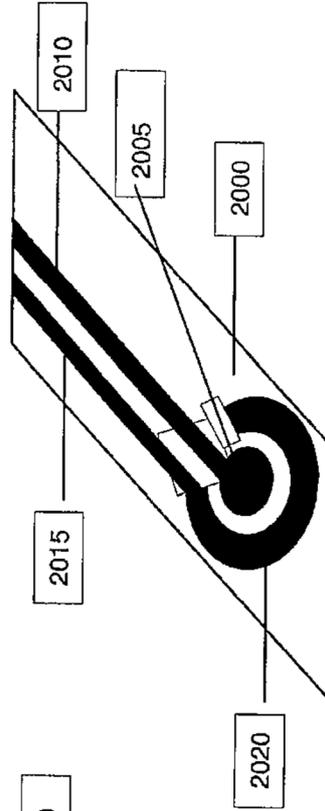


Fig. 21d

