(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 716 136**

(51) Int. Cl.:

A61B 5/145	(2006.01)
G01N 27/327	(2006.01)
A61B 5/1486	(2006.01)
G01N 33/543	(2006.01)
G01N 27/48	(2006.01)
G01N 33/487	(2006.01)
C12Q 1/00	(2006.01)
A61B 5/00	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.09.2006** **PCT/US2006/035129**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2007** **WO07040913**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2006** **E 06803250 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019** **EP 1934591**

(54) Título: **Voltamperometría controlada**

(30) Prioridad:

30.09.2005 US 722584 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.06.2019

(73) Titular/es:

ASCENSIA DIABETES CARE HOLDINGS AG (100.0%)
Peter-Merian Strasse 90
4052 Basel, CH

(72) Inventor/es:

WU, HUAN-PING

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 716 136 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

Voltamperometría controlada

La presente invención se refiere a un procedimiento voltamperométrico para determinar la concentración de un analito y a un dispositivo de medición de mano adaptado para recibir una tira de sensor para llevar a cabo el procedimiento voltamperométrico. El procedimiento de la invención se define en la reivindicación 1 y el dispositivo de medición de mano de la invención se define en la reivindicación 26.

Antecedentes

La determinación cuantitativa de analitos en fluidos biológicos es útil en el diagnóstico y tratamiento de anomalías fisiológicas. Por ejemplo, la determinación del nivel de glucosa en los fluidos biológicos, tales como la sangre, es importante para las personas diabéticas que deben comprobar con mucha frecuencia su nivel de glucosa en sangre para regular su dieta y/o medicación.

Para este tipo de análisis se han utilizado sistemas electroquímicos. Durante el análisis, el analito se somete a una reacción redox con una enzima o especie similar para generar una corriente eléctrica que puede medirse y correlacionarse con la concentración del analito. Puede proporcionarse un beneficio sustancial al usuario disminuyendo el tiempo requerido para el análisis suministrando al mismo tiempo la exactitud y precisión deseadas.

Un ejemplo de sistema de sensor electroquímico para analizar analitos en fluidos biológicos incluye un dispositivo de medición y una tira de sensor. La tira de sensor incluye reactivos para reaccionar con y transferir electrones desde el analito durante el análisis y electrodos para hacer pasar los electrones a través de conductores hacia el dispositivo. El dispositivo de medición incluye contactos para recibir los electrones desde la tira y la capacidad para aplicar un diferencial de tensión entre los contactos. El dispositivo puede registrar la corriente que pasa a través del sensor y convertir los valores de corriente a una medida del contenido en analitos de la muestra. Estos sistemas de sensor pueden analizar una única gota de sangre total (ST), tal como desde 1-15 microlitros (μL) en volumen.

Los ejemplos de dispositivos de medición de mesa incluyen el analizador BAS 100B comercializado por BAS Instruments en West Lafayette, Indiana; el analizador instrumental CH comercializado por CH Instruments en Austin, Texas; la estación de trabajo electroquímica Cypress comercializado por Cypress Systems en Lawrence, Kansas; y el instrumento electroquímico EG&G comercializado por Princeton Research Instruments en Princeton, New Jersey. Los ejemplos de dispositivos de medición portátiles incluyen los medidores Ascensia Breeze® y Elite® de Bayer Corporation.

La tira de sensor puede incluir un electrodo de trabajo en el que el analito se somete a una reacción electroquímica y un contraelectrodo en el que se produce la reacción electroquímica opuesta, permitiendo así que la corriente fluya entre los electrodos. Por tanto, si se produce oxidación en el electrodo de trabajo, se produce reducción en el contraelectrodo. Véase, por ejemplo, Fundamentals Of Analytical Chemistry, 4ª edición, D.A. Skoog y D.M. West; Filadelfia: Saunders College Publishing (1982), págs. 304-341.

La tira de sensor también puede incluir un electrodo de referencia real para proporcionar un potencial de referencia invariable al dispositivo de medición. Aunque se conocen múltiples materiales de electrodos de referencia, es típica una mezcla de plata (Ag) y cloruro de plata (AgCl) debido a la insolubilidad de la mezcla en el entorno acuoso de la solución de análisis. También puede utilizarse un electrodo de referencia como contraelectrodo. En la patente estadounidense n.º 5.820.551 se describe una tira de sensor que utiliza una combinación de este tipo de electrodo de referencia-contraelectrodo.

La tira de sensor puede formarse imprimiendo electrodos sobre un sustrato aislante utilizando múltiples técnicas, tales como las descritas en las patentes estadounidenses n.os 6.531.040; 5.798.031; y 5.120.420. Pueden formarse una o varias capas de reactivo recubriendo uno o varios de los electrodos, tales como los electrodos de trabajo y/o los contraelectrodos. En un aspecto, puede recubrirse más de uno de los electrodos mediante la misma capa de reactivo, tal como cuando los electrodos de trabajo y los contraelectrodos se recubren mediante la misma composición. En otro aspecto, pueden imprimirse capas de reactivo que tienen diferentes composiciones o microdepositarse sobre los electrodos de trabajo y los contraelectrodos utilizando el procedimiento descrito en la solicitud de patente provisional estadounidense presentada el 24 de octubre de 2003, con n.º de serie 60/513.817. Por tanto, la capa de reactivo sobre el electrodo de trabajo puede contener la enzima, el mediador y un aglutinante mientras que la capa de reactivo sobre el contraelectrodo contiene una especie redox soluble, que podría ser la misma que el mediador o diferente, y un aglutinante.

La capa de reactivo puede incluir un agente ionizante para facilitar la oxidación o reducción del analito, así como cualquier mediador u otra sustancia que ayuden en la transferencia de electrones entre el analito y el conductor. El agente ionizante puede ser una enzima específica del analito, tal como glucosa oxidasa o glucosa deshidrogenasa, para catalizar la oxidación de glucosa en una muestra de ST. La capa de reactivo también puede incluir un

aglutinante que mantiene la enzima y el mediador unidos. La tabla I, a continuación, proporciona combinaciones convencionales de enzimas y mediadores para su uso con analitos específicos.

Tabla I

Analito	Enzima	Mediador
Glucosa	Glucosa oxidasa	Ferricianuro
Glucosa	Glucosa deshidrogenasa	Ferricianuro
Colesterol	Colesterol oxidasa	Ferricianuro
Lactato	Lactato oxidasa	Ferricianuro
Ácido úrico	Uricasa	Ferricianuro
Alcohol	Alcohol oxidasa	Fenilendiamina

El aglutinante puede incluir varios tipos y pesos moleculares de polímeros, tales como CMC (carboxilmetilcelulosa) y/o PEO (poli(óxido de etileno)). Además de unir los reactivos entre sí, el aglutinante debe ayudar a filtrar los glóbulos rojos, evitando que se depositen sobre la superficie del electrodo.

Los ejemplos de sistemas de sensor electroquímicos convencionales para analizar analitos en fluidos biológicos incluyen los biosensores Precisión® disponibles de Abbott en Abbott Park, Illinois; los biosensores Accucheck® disponibles de Roche en Indianápolis, Indiana; y los biosensores OneTouch Ultra® disponibles de Lifescan en Milpitas, California.

Un procedimiento electroquímico, que se ha utilizado para cuantificar analitos en fluidos biológicos es la culombimetría. Por ejemplo, Heller *et al*. describieron el procedimiento culombimétrico para mediciones de glucosa en ST en la patente estadounidense n.º 6.120.676. En la culombimetría, se cuantifica la concentración de analito mediante la oxidación exhaustiva del analito en un volumen pequeño e integrando la corriente con respecto al tiempo de oxidación para producir la carga eléctrica que representa la concentración de analito. Por tanto, la culombimetría capta la cantidad total de analito presente dentro de la tira de sensor.

Un aspecto importante de la culombimetría es que hacia el final de la curva de integración de carga frente a tiempo, la velocidad a la que cambia la corriente con respecto al tiempo se vuelve sustancialmente constante para dar lugar a una condición de estado estacionario. Esta parte de estado estacionario de la curva culombimétrica forma una región de meseta relativamente plana, permitiendo así la determinación de la corriente correspondiente. Sin embargo, el procedimiento culombimétrico requiere la conversión completa de todo el volumen de analito para alcanzar la condición de estado estacionario. Como resultado, este procedimiento requiere mucho tiempo y no proporciona los resultados rápidos que demandan los usuarios de dispositivos electroquímicos, tales como productos de monitorización de glucosa. Otro problema con la culombimetría es que hay que controlar el pequeño volumen de la célula de sensor para proporcionar resultados exactos, lo que puede ser difícil con un dispositivo producido en masa.

Otro procedimiento electroquímico que se ha utilizado para cuantificar analitos en fluidos biológicos es la amperometría. En la amperometría, la corriente se mide durante un pulso de lectura a medida que se aplica un potencial (tensión) constante a través de los electrodos de trabajo y los contraelectrodos de la tira de sensor. La corriente medida se utiliza para cuantificar el analito en la muestra. La amperometría mide la velocidad a la cual se oxida o reduce la especie electroquímicamente activa, tal como el analito, cerca del electrodo de trabajo. Se han descrito muchas variaciones del procedimiento amperométrico para biosensores, por ejemplo en las patentes estadounidenses n.ºs 5.620.579; 5.653.863.; 6.153.069; y 6.413.411.

Una desventaja de los procedimientos amperométricos convencionales es la naturaleza de estado no estacionario de la corriente después de la aplicación de un potencial. La velocidad de cambio de corriente con respecto al tiempo es muy rápida inicialmente y se hace más lenta a medida que avanza el análisis debido a la naturaleza cambiante del proceso de difusión subyacente. Hasta que la velocidad de consumo del mediador reducido en la superficie del electrodo no sea igual a la velocidad de difusión, no podrá obtenerse una corriente de estado estacionario. Por tanto, para los procedimientos de amperometría convencionales, la medición de la corriente durante el periodo transitorio antes de que se alcance una condición de estado estacionario puede estar asociada a una mayor inexactitud que una medición tomada durante un periodo de tiempo de estado estacionario.

El “efecto del hematocrito” proporciona un impedimento para analizar con exactitud la concentración de glucosa en muestras de ST. Las muestras de ST contienen glóbulos rojos (GR) y plasma. El plasma es en su mayor parte agua, aunque contiene algunas proteínas y glucosa. El hematocrito es el volumen del componente de glóbulo rojo en relación con el volumen total de la muestra de ST y a menudo se expresa como porcentaje. Las muestras de sangre total tienen en general porcentajes de hematocrito que oscilan entre el 20% y el 60%, siendo ~40% el promedio.

En las tiras de sensores convencionales, la glucosa puede oxidarse mediante una enzima, que a continuación transfiere el electrón a un mediador. Entonces este mediador reducido se desplaza al electrodo de trabajo en el que

se oxida de manera electroquímica. La cantidad de mediador que se oxida puede correlacionarse con la corriente que fluye entre los electrodos de trabajo y los contraelectrodos de la tira de sensor. Cuantitativamente, la corriente medida en el electrodo de trabajo es directamente proporcional al coeficiente de difusión del mediador. El efecto del hematocrito interfiere con este proceso porque los glóbulos rojos bloquean la difusión del mediador al electrodo de trabajo. Posteriormente, el efecto del hematocrito influye en la cantidad de corriente medida en el electrodo de trabajo sin ninguna conexión con la cantidad de glucosa en la muestra.

Las muestras de ST que tienen concentraciones variables de glóbulos rojos pueden dar lugar a inexactitudes en la medición porque puede ser que el sensor no distinga entre una concentración de mediador menor y una concentración de mediador mayor cuando los glóbulos rojos bloquean la difusión al electrodo de trabajo. Por ejemplo, cuando se analizan muestras de ST que contienen niveles de glucosa idénticos, pero que tienen hematocritos del 20, 40 y 60%, se notificarán tres lecturas de glucosa diferentes por un sistema de sensor convencional basándose en un conjunto de constantes de calibración (pendiente e intercepción, por ejemplo). Aunque las concentraciones de glucosa sean las mismas, el sistema notificará que la muestra con el 20% de hematocrito contiene más glucosa que la muestra con el 60% de hematocrito debido a que los glóbulos rojos interfieren con la difusión del mediador al electrodo de trabajo.

El intervalo de hematocrito normal (concentración de GR) para los seres humanos es del 20% al 60% y se centra alrededor del 40%. El sesgo del hematocrito se refiere a la diferencia entre la concentración de glucosa de referencia obtenida con un instrumento de referencia, tal como YSI 2300 STAT PLUS™ comercializado por YSI Inc., Yellow Springs, Ohio, y una lectura de glucosa experimental obtenida a partir de un sistema de sensor portátil para muestras que contienen niveles de hematocrito diferentes. La diferencia entre las lecturas de referencia y experimentales resulta de los niveles de hematocrito variables entre muestras de ST específicas.

Además del efecto del hematocrito, las inexactitudes de medición también pueden surgir cuando la concentración de especies medibles no se correlaciona con la concentración de analito. Por ejemplo, cuando un sistema de sensor determina la concentración de un mediador reducido generado en respuesta a la oxidación de un analito, cualquier mediador reducido no generado por oxidación del analito llevará a que el sistema de sensor indique que está presente más analito en la muestra de lo correcto debido al fondo del mediador.

Además de los efectos del hematocrito y del fondo del mediador, otros factores también pueden llevar a inexactitudes en la capacidad de un sistema de sensor electroquímico convencional para determinar la concentración de un analito en una muestra. En un aspecto, estas inexactitudes pueden introducirse porque la parte de la tira de sensor que contiene la muestra puede variar en volumen de una tira a otra. También pueden introducirse inexactitudes cuando no se proporciona una muestra suficiente para llenar por completo el volumen del espacio capilar (*cap-gap*), una condición denominada llenado insuficiente. En otros aspectos, pueden introducirse inexactitudes en la medición por “ruido” aleatorio y cuando el sistema de sensor no tiene la capacidad de determinar con exactitud los cambios de temperatura en la muestra.

En un intento por superar una o varias de estas desventajas, los sistemas de sensor convencionales han intentado múltiples técnicas, no sólo con respecto al diseño mecánico de la tira de sensor y la selección del reactivo, sino también con respecto a la manera en la que el dispositivo de medición aplica el potencial eléctrico a la tira. Por ejemplo, los procedimientos convencionales para reducir el efecto del hematocrito para sensores amperométricos incluyen el uso de filtros, como se da a conocer en las patentes estadounidenses n.ºs 5.708.247 y 5.951.836; invertir la polaridad de la corriente aplicada, como se da a conocer en el documento WO 01/57510; y mediante procedimientos que maximizan la resistencia inherente de la muestra, como se da a conocer en la patente estadounidense n.º 5.628.890.

Se han utilizado múltiples procedimientos para aplicar el potencial eléctrico a la tira, denominados comúnmente procedimientos, secuencias o ciclos de pulsos, para tratar las inexactitudes en la concentración de analito determinada. Por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 4.897.162 el procedimiento de pulsos incluye una aplicación continua de potenciales de tensión de subida y bajada que se mezclan para proporcionar una onda de forma triangular. Además, los documentos WO 2004/053476 y las patentes estadounidenses 2003/0178322 y 2003/0113933 describen procedimientos de pulsos que incluyen la aplicación continua potenciales de tensión de subida y bajada que también cambian la polaridad.

Otros procedimientos convencionales combinan una configuración de electrodos específica con una secuencia de pulsos adaptada a esa configuración. Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.942.102 combina la configuración de electrodos específica proporcionada por una célula de capa delgada con un pulso continuo de modo que los productos de reacción del contraelectrodo lleguen al electrodo de trabajo. Esta combinación se utiliza para producir la reacción hasta que el cambio de corriente frente al tiempo se vuelva constante, alcanzando así una condición de estado estacionario real para el mediador que se mueve entre los electrodos de trabajo y los contraelectrodos durante la etapa de potencial. Aunque cada uno de estos procedimientos compensa diversas ventajas y desventajas, ninguno es ideal.

El documento US 4.304.853 da a conocer un procedimiento para la determinación de proteasas y antiproteasas, según el cual se determina de manera electroquímica un fragmento liberado de un sustrato mediante hidrólisis enzimática. En el procedimiento del documento US 4.304.853 la señal de entrada eléctrica utilizada para seguir la reacción incluye picos voltamperométricos separados por partes planas amperométricas de 60 segundos. La señal inicial, rápidamente cambiante se utiliza para preacondicionar el electrodo, mientras que la parte posterior de la señal es analítica y utiliza una corriente de pico registrada durante los picos voltamperométricos para determinar el progreso de la reacción. La señal de entrada es continua, sin interrupción en la aplicación de tensión a la muestra. Por tanto, siempre se aplica tensión durante el barrido y se genera corriente de manera continua. El documento US 4.304.853 no describe el efecto de este cambio de tensión sobre el flujo de corriente de las muestras. En el procedimiento del documento US 4.304.853 tampoco se describe el grado y la duración de la reducción de corriente.

El documento US 6.413.398 B1 da a conocer un procedimiento para la detección electroquímica (ECD). Las formas de realización ilustradas están particularmente adaptadas para su uso en la detección de analitos separados por electroforesis capilar. El procedimiento es una ECD voltamperométrica, que incluye un pulso de potencial positivo preparatorio, un pulso estabilizante opcional a un potencial negativo y un pulso analítico a potenciales negativos extremos (por ejemplo, -300 mV a -1.500 mV) y un pulso de potencial de limpieza positivo. Se ha demostrado que los procedimientos detectan analitos considerados previamente inactivos de manera electroquímica utilizando procedimientos electroquímicos más tradicionales. Los ejemplos de tales analitos incluyen diversos fármacos, antibióticos y péptidos. El pulso analítico comprende un barrido por un intervalo de potenciales negativos y comprende una rampa lineal que incluye una forma de onda cuadrada superpuesta con una amplitud de aproximadamente 100 mV y una frecuencia de aproximadamente 1000 Hz. La forma de onda del pulso analítico y la interpretación de la respuesta de corriente posterior se toma de una voltamperometría de onda cuadrada (SWV). Por tanto, el documento US 6.413.398 B1 da a conocer un procedimiento amperométrico para determinar una concentración de analito. No trata el flujo de corriente durante las inversiones de la señal de SWV, no enseñando así el grado y la duración de la reducción del flujo de corriente requeridos por las relajaciones de la presente solicitud.

El documento US 4.897.162 da a conocer un aparato y procedimiento de detección de glucosa que incluye un sensor electrocatalítico que tiene un electrodo de referencia y un electrodo de detección. Una señal periódica está constituida por una tensión de rampa que se mezcla con una serie de pulsos de medición de onda cuadrada. Esta señal se aplica al sensor. Los niveles de corriente se muestrean dos veces durante cada pulso de medición, y a partir de aquí se deriva una señal indicativa del nivel de glucosa. Después de completar una medición, se aplica una señal de reactivación al electrodo para regenerar las superficies deterioradas del mismo. El documento US 4.897.162 no trata el flujo de corriente durante la señal de entrada continua, no enseñando así el grado y la duración de la reducción del flujo de corriente requeridos por las relajaciones de las presentes reivindicaciones.

El documento US 5.873.990 da a conocer un aparato que es un instrumento basado en microprocesador diseñado para medir de manera conveniente y rápida varios analitos en muestras ambientales y biológicas. Se da a conocer un procedimiento de voltamperometría de decapado anódico (ASV) que incluye una etapa de concentración previa en la que un metal pesado se deposita sobre un electrodo de manera similar a la galvanoplastia. Entonces el metal depositado o aplicado se retira eléctricamente del electrodo. La corriente requerida para retirar el metal puede correlacionarse con la cantidad de metal depositado inicialmente. El documento US 5.873.990 da a conocer múltiples procedimientos para el decapado del metal depositado del electrodo siendo el procedimiento de llenado previo la voltamperometría de onda cuadrada (SWV). El dispositivo puede utilizar la SWV para determinar la concentración de analitos no metálicos tales como fármacos. Según el procedimiento del documento US 5.873.990 la tensión aplicada se incrementa de un nivel a un nivel final en una serie de etapas, durante cada etapa se aplica una pequeña tensión de compensación, primero en la dirección positiva, luego en la dirección negativa. Por tanto, el documento US 5.873.990 da a conocer un procedimiento amperométrico para determinar una concentración de analito puesto que las mediciones de corriente, a partir de las cuales se determina la concentración de analito, se toman de un nivel de tensión generalmente uniforme de la señal de entrada. No trata el flujo de corriente durante las señales de entrada continuas utilizadas para retirar el metal pesado del electrodo, no enseñando así el grado y la duración de la reducción del flujo de corriente requerido por las relajaciones entre las excitaciones.

Como puede observarse por la descripción anterior, existe la necesidad constante de sistemas de sensores electroquímicos mejorados, especialmente aquellos que puedan proporcionar una determinación cada vez más exacta de la concentración de analito en menos tiempo. Los sistemas, dispositivos y procedimientos de la presente invención superan al menos una de las desventajas asociadas a los sistemas convencionales.

Sumario

Se proporciona un procedimiento voltamperométrico para determinar la concentración de un analito en una muestra que incluye aplicar una secuencia de pulsos a la muestra y medir las corrientes resultantes, la secuencia de pulsos incluye al menos dos ciclos de trabajo, incluyendo cada uno de los ciclos de trabajo una excitación y una relajación, la excitación incluye barrido voltamperométrico, y la relajación es de 0,1 a 3 segundos e incluye una reducción de corriente hasta al menos la mitad del flujo de corriente en el máximo de la excitación. Además de los al menos dos ciclos de trabajo, la secuencia de pulsos puede incluir un pulso de lectura terminal y/o un retardo de tiempo inicial y puede aplicarse a una tira de sensor que incluye una capa de barrera de difusión en un electrodo de trabajo. El

procedimiento puede incluir menor sesgo atribuible al fondo del mediador que una concentración del analito determinada con otro procedimiento o con un procedimiento voltamperométrico que carece de la secuencia de pulsos que comprende al menos dos ciclos de trabajo. La muestra puede ser un líquido que incluye un fluido biológico y el analito puede ser glucosa.

Los ciclos de trabajo pueden incluir una excitación que incluye un potencial que varía con el tiempo o un potencial que varía linealmente con el tiempo, tal como lineal, cíclico, acíclico o una combinación de estos tipos de excitación. Puede registrarse un valor de corriente durante cada una de las excitaciones y la secuencia de pulsos puede incluir un pulso de lectura terminal. Los ciclos de trabajo pueden incluir excitaciones acíclicas que excluyen sustancialmente un pico de oxidación inverso o un pico de reducción inverso y pueden reducir la concentración de un mediador en la muestra que no responde al analito con respecto al procedimiento en el que los ciclos de trabajo comprenden excitaciones cíclicas. Los ciclos de trabajo pueden incluir excitaciones acíclicas que terminan antes de que se inicie un pico de corriente inversa, excitaciones acíclicas que excluyen sustancialmente picos de oxidación y reducción directa e inversa, o excitaciones acíclicas sustancialmente dentro de una región de corriente con difusión limitada de un par redox.

El procedimiento puede incluir la determinación de al menos un perfil de contorno y puede incluir aplicar al menos un tratamiento de datos, tal como semiintegral, semiderivada o derivada, a las corrientes resultantes. El procedimiento también puede incluir determinar una pluralidad de conjuntos de calibración a partir de las corrientes y determinar el número de ciclos de trabajo a partir de la pluralidad de conjuntos de calibración. La determinación de la concentración de analito puede incluir promediar múltiples valores de concentración obtenidos a partir de la pluralidad de conjuntos de calibración.

El procedimiento también puede incluir determinar si una tira de sensor que contiene la muestra se ha llenado de manera insuficiente con la muestra. Esta determinación puede incluir comparar al menos un valor de corriente con un valor preseleccionado. El procedimiento también puede incluir determinar el contenido de agente ionizante activo de una tira de sensor, una determinación que puede realizarse determinando una relación a partir de valores de corriente de barrido directos e inversos. En un aspecto, esta relación se correlacionó previamente con cantidades conocidas del agente ionizante activo. En otro aspecto, puede modificarse una pendiente de calibración en respuesta al contenido de agente ionizante activo de la tira de sensor. En otro aspecto, la relación de tiempo de excitación/relajación de los ciclos de trabajo puede ser de 0,3 a 0,2.

Se proporciona un dispositivo de medición de analitos de mano para determinar la concentración de un analito en una muestra. El dispositivo incluye un dispositivo de medición de voltamperometría controlada adaptado para recibir una tira de sensor. El dispositivo de medición de amperometría controlada incluye al menos dos contactos de dispositivo en comunicación eléctrica con una pantalla mediante circuitería eléctrica. La tira de sensor incluye al menos unos contactos de tira de sensor primero y segundo. El primer contacto de tira de sensor está en comunicación eléctrica con un electrodo de trabajo y el segundo contacto de tira de sensor está en comunicación eléctrica con un contraelectrodo a través de conductores. Una primera capa de reactivo está sobre al menos uno de los electrodos e incluye una oxidorreductasa y al menos una especie de un par redox. Los electrodos pueden estar sobre el mismo o sobre diferentes sustratos.

La circuitería electrónica puede establecer una comunicación eléctrica entre los contactos y la pantalla. La circuitería incluye un cargador eléctrico y un procesador, estando el procesador en comunicación eléctrica con un medio de almacenamiento legible por ordenador. El medio incluye código de software legible por ordenador, que cuando se ejecuta por el procesador, hace que el cargador implemente una secuencia de pulsos de voltamperometría controlada que incluye al menos dos ciclos de trabajo, incluyendo cada uno de los ciclos de trabajo una excitación y una relajación, la excitación incluye barrido voltamperométrico, y la relajación es de 0,1 a 3 segundos e incluye una reducción de corriente hasta al menos la mitad del flujo de corriente en el máximo de la excitación.

Se proporciona un procedimiento para reducir el sesgo atribuible al fondo del mediador en una concentración determinada de un analito en una muestra que incluye aplicar una secuencia de pulsos de voltamperometría controlada que incluye al menos dos ciclos de trabajo.

Se proporciona un procedimiento para determinar la duración de una secuencia de pulsos que incluye al menos 2 ciclos de trabajo, para determinar la concentración de un analito en una muestra que incluye determinar una pluralidad de conjuntos de constantes de calibración determinadas a partir de corrientes registradas durante los al menos 2 ciclos de trabajo y determinar la duración de la secuencia de pulsos en respuesta a la concentración determinada del analito en la muestra. La secuencia de pulsos puede ser una secuencia de pulsos de voltamperometría controlada.

Se proporciona un procedimiento para indicar a un usuario que añada muestra adicional a una tira de sensor que incluye determinar si la tira de sensor se ha llenado de manera insuficiente comparando al menos un valor de corriente registrado a partir de una secuencia de pulsos que incluye al menos 2 ciclos de trabajo con un valor preseleccionado e indicar al usuario que añada muestra adicional a la tira de sensor si la tira se ha llenado de

manera insuficiente. La secuencia de pulsos puede ser una secuencia de pulsos de voltamperometría controlada. La tira de sensor puede incluir dos electrodos y la determinación puede realizarse en menos de cinco segundos.

Se proporciona un procedimiento voltamperométrico para determinar la concentración de un analito en una muestra que incluye aplicar una secuencia de pulsos a la muestra y medir las corrientes resultantes, la secuencia de pulsos incluye al menos 2 ciclos de trabajo que tienen relaciones de tiempo de excitación/relajación de 0,3 a 0,2. El procedimiento puede ser más exacto que una concentración del analito determinada con otro procedimiento en el que la relación de tiempo de excitación/relajación de un pulso es mayor que 0,3.

Se proporciona un procedimiento electroquímico para determinar la concentración de un analito en una muestra que incluye una mejora que incluye aplicar una secuencia de pulsos de voltamperometría controlada a la muestra que incluye al menos dos ciclos de trabajo.

Se proporcionan las siguientes definiciones para proporcionar un entendimiento claro y coherente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones.

El término “analito” se define como una o varias sustancias presentes en una muestra. El análisis determina la presencia y/o concentración del analito presente en la muestra.

El término “muestra” se define como una composición que puede contener una cantidad desconocida del analito. Normalmente, una muestra para análisis electroquímico está en forma líquida y preferiblemente la muestra es una mezcla acuosa. Una muestra puede ser una muestra biológica, tal como sangre, orina o saliva. Una muestra también puede ser un derivado de una muestra biológica, tal como un extracto, una dilución, un filtrado o un precipitado reconstituido.

El término “voltamperometría” se define como un procedimiento de análisis en el que la concentración de un analito en una muestra se determina midiendo de manera electroquímica la velocidad de oxidación o reducción del analito con un potencial variable.

El término “sistema” o “sistema de sensor” se define como una tira de sensor en comunicación eléctrica a través de sus conductores con un dispositivo de medición, que permite la cuantificación de un analito en una muestra.

El término “tira de sensor” se define como un dispositivo que contiene la muestra durante el análisis y proporciona comunicación eléctrica entre la muestra y el dispositivo de medición. La parte de la tira de sensor que contiene la muestra a menudo se denomina “espacio capilar”.

El término “conductor” se define como sustancia eléctricamente conductora que permanece estacionaria durante un análisis electroquímico.

El término “dispositivo de medición” se define como uno o varios dispositivos electrónicos que pueden aplicar un potencial eléctrico a los conductores de una tira de sensor y medir la corriente resultante. El dispositivo de medición también puede incluir la capacidad de procesamiento para determinar la presencia y/o concentración de uno o varios analitos en respuesta a los valores de corriente registrados.

El término “exactitud” se define como hasta qué punto la cantidad de analito medida por una tira de sensor corresponde a la cantidad real de analito en la muestra. En un aspecto, la exactitud puede expresarse en términos de sesgo.

El término “precisión” se define como la semejanza de múltiples mediciones de analito para la misma muestra. En un aspecto, la precisión puede expresarse en términos de dispersión o varianza entre múltiples mediciones.

El término “reacción redox” se define como una reacción química entre dos especies que implican la transferencia de al menos un electrón de una primera especie a una segunda especie. Por tanto, una reacción redox incluye una oxidación y una reducción. La semicelda de oxidación de la reacción implica la pérdida de al menos un electrón por la primera especie, mientras que la semicelda de reducción implica la adición de al menos un electrón a la segunda especie. La carga iónica de una especie que se oxida se hace más positiva por una cantidad igual al número de electrones eliminados. Del mismo modo, la carga iónica de una especie que se reduce se hace menos positiva por una cantidad igual al número de electrones obtenidos.

El término “mediador” se define como una sustancia que puede oxidarse o reducirse y que puede transferir uno o varios electrones. Un mediador es un reactivo en un análisis electroquímico y no es el analito de interés, aunque proporciona la medición indirecta del analito. En un sistema simple, el mediador se somete a una reacción redox en respuesta a la oxidación o reducción del analito. Entonces el mediador oxidado o reducido se somete a la reacción opuesta en el electrodo de trabajo de la tira de sensor y se regenera a su número de oxidación original.

El término “aglutinante” se define como un material que proporciona soporte físico y contención a los reactivos teniendo al mismo tiempo compatibilidad química con los reactivos.

El término “fondo del mediador” se define como el sesgo introducido en la concentración de analito medida atribuible a especies medibles que no responden a la concentración de analito subyacente.

El término “especie medible” se define como cualquier especie electroquímicamente activa que puede oxidarse o reducirse bajo un potencial apropiado en el electrodo de trabajo de una tira de sensor electroquímica. Los ejemplos de especies medibles incluyen analitos, oxidorreductasas y mediadores.

El término “llenado insuficiente” se define como cuando se introduce muestra insuficiente en la tira de sensor para obtener un análisis exacto.

El término “par redox” se define como dos especies conjugadas de una sustancia química que tienen diferentes números de oxidación. La reducción de la especie que tiene el número de oxidación superior produce la especie que tiene el número de oxidación inferior. Alternativamente, la oxidación de la especie que tiene el número de oxidación inferior produce la especie que tiene el número de oxidación superior.

El término “número de oxidación” se define como la carga iónica formal de una especie química, tal como un átomo. Un número de oxidación superior, tal como (III), es más positivo, y un número de oxidación inferior, tal como (II), es menos positivo.

El término “par redox reversible” se define como un par de especies redox en el que la separación entre los barridos directo e inverso de la semiintegral es de como mucho 30 mV a la mitad de la altura de la transición si_{ss}. Por ejemplo, en la figura 10A se muestran los barridos de semiintegral directo e inverso para el par redox ferricianuro/ferrocianuro además de la altura de transición si_{ss}. En la línea en la que la línea de transición de media altura interseca las líneas de barrido directo e inverso, la separación entre las líneas es de 29 mV, estableciendo la reversibilidad del par redox ferricianuro/ferrocianuro a la velocidad de barrido mostrada.

El término “par redox cuasirreversible” se define como un par redox en el que la separación entre los barridos directo e inverso de la semiintegral es mayor que 30 mV a la mitad de la altura de la transición si_{ss} para el par redox.

El término “especie redox soluble” se define como una sustancia que puede sufrir oxidación o reducción y que es soluble en agua (pH 7, 25ºC) a un nivel de al menos 1,0 gramos por litro. Las especies redox solubles incluyen moléculas orgánicas electroactivas, complejos organometálicos de transición y complejos de coordinación de metales de transición. El término “especie redox soluble” excluye metales elementales e iones metálicos individuales, especialmente aquellos que son insolubles o poco solubles en agua.

El término “oxidorreductasa” se define como cualquier enzima que facilita la oxidación o reducción de un analito. Una oxidorreductasa es un reactivo. El término oxidorreductasa incluye “oxidasas”, que facilitan las reacciones de oxidación en las que el oxígeno molecular es el aceptador de electrones; “reductasas”, que facilitan las reacciones de reducción en las que se reduce el analito y el oxígeno molecular no es el analito; y “deshidrogenasas”, que facilitan las reacciones de oxidación en las que el oxígeno molecular no es el aceptador de electrones. Véase, por ejemplo, Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, edición revisada, A.D. Smith, Ed., Nueva York: Oxford University Press (1997) págs. 161, 476, 47, y 560.

El término “molécula orgánica electroactiva” se define como una molécula orgánica que carece de un metal que pueda someterse a una reacción de oxidación o reducción. Las moléculas orgánicas electroactivas pueden servir de mediadores.

El término “complejo organometálico de transición”, también denominado “complejo OTM”, se define como un complejo en el que un metal de transición está unido a por lo menos un átomo de carbono a través de un enlace sigma (carga formal de -1 sobre el átomo de carbono unido por enlace sigma al metal de transición) o un enlace pi (carga formal de 0 sobre el átomo de carbono unido por enlace pi al metal de transición). Por ejemplo, el ferroceno es un complejo OTM con dos anillos de ciclopentadienilo (Cp), cada uno unido a través de sus cinco átomos de carbono a un hierro central por dos enlaces pi y un enlace sigma. Otro ejemplo de un complejo OTM es el ferricianuro (III) y su homólogo reducido ferrocianuro (II), en el que seis ligandos ciano (carga formal de -1 en cada uno de los 6 ligandos) están unidos por un enlace sigma a un hierro central a través de los átomos de carbono.

El término “complejo de coordinación” se define como un complejo que tiene una geometría de coordinación bien definida, como por ejemplo octaédrica o plana cuadrada. A diferencia de los complejos OTM, que se definen por sus enlaces, los complejos de coordinación se definen por su geometría. Por tanto, los complejos de coordinación pueden ser complejos OTM (tal como el ferricianuro mencionado anteriormente) o complejos en los que átomos no metálicos distintos del carbono, tales como heteroátomos que incluyen nitrógeno, azufre, oxígeno y fósforo, están unidos mediante enlace coordinado al centro de metal de transición. Por ejemplo, la hexamina de rutenio es un complejo de coordinación que tiene una geometría octaédrica bien definida en la que seis ligandos NH_3 (carga

formal de 0 en cada uno de los 6 ligandos) están unidos mediante enlace coordinado al centro de rutenio. Se puede encontrar una discusión más completa sobre complejos organometálicos de transición, complejos de coordinación y enlaces de metales de transición en Collman *et al.*, Principles and Applications of Organotransition Metal Chemistry (1987) y Miessler & Tarr, Inorganic Chemistry (1991).

El término “estado estacionario” se define como cuando el cambio en la señal electroquímica (corriente) con respecto a su variable de entrada independiente (tensión o tiempo) es sustancialmente constante, tal como dentro del ±10 o ±5%.

El término “relativamente constante” se define como cuando el cambio en un valor de corriente o una velocidad de difusión está dentro del ±20, ±10 o ±5%.

El término “punto de inversión” se define como el punto en un barrido cíclico o acíclico en el que se detiene el barrido directo y se inicia el barrido inverso.

El término “excitación lineal” se define como una excitación en la que la tensión se varía en una única dirección “directa” a una velocidad fija, tal como desde -0,5 V hasta +0,5 V para proporcionar un intervalo de excitación de 1,0 V. El intervalo de excitación puede cubrir los estados reducido y oxidado de un par redox de modo que se produce una transición de un estado al otro. Es posible una aproximación de una excitación lineal mediante una serie de cambios incrementales en el potencial. Si los incrementos se producen muy juntos en el tiempo, corresponden a una excitación lineal continua. Por tanto, la aplicación de un cambio de potencial que se aproxime a un cambio lineal puede considerarse una excitación lineal.

El término “excitación cíclica” se define como una combinación de una excitación directa lineal y una excitación inversa lineal, en la que el intervalo de excitación incluye los picos de oxidación y reducción de un par redox. Por ejemplo, la variación del potencial de una manera cíclica entre -0,5 V y +0,5 V y nuevamente a -0,5 V es un ejemplo de una excitación cíclica para el par redox ferricianuro/ferrocianuro utilizado en un sensor de glucosa, en el que tanto el pico de oxidación como el de reducción están incluidos en el intervalo de excitación.

El término “excitación acíclica” se define en un aspecto como una excitación que incluye más de un pico de corriente directo o inverso que el otro pico de corriente. Por ejemplo, una excitación que incluye excitaciones lineales directas e inversas donde la excitación directa se inicia a una tensión diferente de cuando se detiene la excitación inversa, tal como desde -0,5 V hasta +0,5 V y nuevamente hasta +0,25 V, es un ejemplo de una excitación acíclica. En otro ejemplo, una excitación acíclica puede iniciarse y terminar sustancialmente a la misma tensión cuando la excitación se inicia como mucho a ±20, ±10 o ±5 mV con respecto al potencial formal $E^{o'}$ del par redox. En otro aspecto, una excitación acíclica se define como una excitación que incluye excitaciones lineales directa e inversa que sustancialmente excluyen los picos de oxidación y reducción de un par redox. Por ejemplo, la excitación puede comenzar, invertirse y terminar dentro de la región con difusión limitada de un par redox, excluyendo así los picos de oxidación y reducción del par.

Los términos “excitación rápida”, “velocidad de excitación rápida”, “barrido rápido” y “velocidad de barrido rápido” se definen como una excitación en la que la tensión se cambia a una velocidad de al menos 176 mV/s. Velocidades de excitación rápidas preferidas son velocidades superiores a 200, 500, 1.000 o 2.000 mV/s.

Los términos “excitación lenta”, “velocidad de excitación lenta”, “barrido lento”, y “velocidad de barrido lento” se definen como una excitación en la que la tensión se cambia a una velocidad de como mucho 175 mV/s. Velocidades de excitación lentas preferidas son velocidades más lentas de 150, 100, 50 o 10 mV/s.

El término “grosor inicial promedio” se refiere a la altura promedio de una capa antes de la introducción de una muestra líquida. Se utiliza el término promedio porque la superficie superior de la capa es irregular, con picos y valles.

El término “intensidad redox” (RI) se define como el tiempo de excitación total dividido por la suma de los retardos de tiempo de excitación total y de tiempo de relajación total para una secuencia de pulsos.

El término “dispositivo de mano” se define como un dispositivo que puede sujetarse en una mano humana y es portátil. Un ejemplo de un dispositivo de mano es el dispositivo de medición que acompaña al sistema de monitorización de glucosa en sangre Elite de Ascensia®, comercializado por Bayer HealthCare, LLC, Elkhart, IN.

El término “sobre” se define como “por encima de” y es con respecto a la orientación descrita. Por ejemplo, si se deposita un primer elemento sobre al menos una parte de un segundo elemento, se dice que el primer elemento está “depositado sobre” el segundo. En otro ejemplo, si un primer elemento está presente por encima de al menos una parte de un segundo elemento, se dice que el primer elemento está “sobre” el segundo. El uso del término “sobre” no excluye la presencia de sustancias entre los elementos superior e inferior descritos. Por ejemplo, un primer elemento puede tener un recubrimiento sobre su superficie superior, todavía un segundo elemento sobre al menos una parte del primer elemento y su recubrimiento superior puede describirse como “sobre” el primer

elemento. Por tanto, el uso del término “sobre” puede significar o no que los dos elementos relacionados están en contacto físico.

Breve descripción de los dibujos

La invención puede entenderse mejor con referencia a los siguientes dibujos y la siguiente descripción. Los componentes en las figuras no están necesariamente a escala, poniendo énfasis en su lugar en la ilustración de los principios de la invención. Además, en las figuras, los números de referencia similares designan partes correspondientes en todas las vistas diferentes.

La figura 1A es una representación en perspectiva de una tira de sensor ensamblada.

La figura 1B es un diagrama de vista superior de una tira de sensor, con la tapa retirada.

La figura 2 muestra un diagrama de vista de extremo de la tira de sensor de la figura 1B.

Las figuras 3A y 3B muestran un electrodo de trabajo que tiene un conductor de superficie y una DBL durante la aplicación de pulsos de lectura largos y cortos.

Las figuras 4A y 4B son gráficos que ilustran la mejora en la exactitud de medición cuando se combina una DBL con una excitación corta.

La figura 5 representa un procedimiento analítico electroquímico para determinar la presencia y concentración de un analito en una muestra.

Las figuras 6A-6F representan seis ejemplos de secuencias de pulsos en los que se aplicaron múltiples ciclos de trabajo a la tira de sensor tras la introducción de la muestra, que no están dentro del alcance de las reivindicaciones independientes.

La figura 7A es un gráfico que muestra un voltamperograma cíclico de un sistema de sensor.

La figura 7B compara un barrido cíclico con un barrido acíclico, en el que la excitación directa del barrido acíclico se inicia cerca del potencial formal Eº’ para el par redox.

La figura 7C muestra un barrido acíclico, en el que el barrido inverso termina en el pico de corriente inversa.

La figura 7D muestra un barrido cíclico con un barrido acíclico superpuesto en la región de DLC.

Las figuras 8A-8D muestran las corrientes de salida trazadas como voltamperogramas a partir de la secuencia de pulsos representada en la figura 6C para muestra de ST con un 40% de hematocrito que contienen 50, 100 y 400 mg/dL de glucosa.

Las figuras 9A-9C muestran perfiles de contorno de los voltamperogramas de las figuras 8A-8C.

La figura 10A es un gráfico de la semiintegral correspondiente al voltamperograma cíclico de la figura 7A.

La figura 10B presenta la semiintegral de los datos acíclicos correspondientes al voltamperograma acíclico de la figura 7C.

La figura 10C presenta las semiintegrales de las excitaciones cíclicas y acíclicas de la figura 7B.

La figura 10D muestra la semiintegral y valores de corriente registrados para la excitación acíclica de la figura 7D.

La figura 11 muestra perfiles de contorno preparados mediante semiintegración de voltamperogramas a partir de una secuencia de siete pulsos de excitación para muestras de ST que contienen cantidades variables de glucosa.

La figura 12A muestra el voltamperograma cíclico, la semiintegral y semiderivada de 16 mM de ferrocianuro en una muestra de ST con un 20% de hematocrito.

La figura 12B es una ampliación de la curva de semiderivada de la figura 12A.

Las figuras 13A-13C muestran las derivadas de voltamperogramas cíclicos.

La figura 14 traza las corrientes de semiintegral registradas como una función del tiempo para los perfiles de contorno de la figura 11.

La figura 15 muestra los voltamperogramas cíclicos obtenidos a partir de una tira de sensor con un llenado insuficiente.

La figura 16A muestra gráficos de semiintegral de voltamperogramas cíclicos obtenidos a partir de cinco tiras de sensor con velocidades de barrido de 1 V/s para una muestra que incluye 100 mg/dL de glucosa y un 40% de hematocrito en ST.

La figura 16B traza la relación de los valores de corriente de barrido directo e inverso tomados al potencial de 0,15 como una función de la concentración de enzimas.

La figura 16C muestra una respuesta típica de la pendiente de la calibración de respuesta lineal de la tira de sensor como una función del contenido en GO (% de peso en seco).

La figura 17 es una representación esquemática de un dispositivo de medición.

Descripción detallada

Un sistema analítico electroquímico determina la concentración de analitos en una muestra, tal como la concentración de glucosa de sangre total. El sistema incluye al menos un dispositivo que aplica secuencias de pulsos de voltamperometría controlada que incluyen múltiples ciclos de trabajo a la muestra. Cada ciclo de trabajo incluye una excitación lineal, cíclica o acíclica durante las cuales se miden corrientes (amperaje) a partir de una tira de sensor mientras que un potencial (tensión) aplicado a la tira se varía linealmente con el tiempo. Cada ciclo de trabajo también incluye una relajación que puede proporcionarse mediante un circuito abierto. El sistema puede comparar los datos de corriente resultantes para determinar la concentración del analito en la muestra, corrigiendo al mismo tiempo los resultados para las variaciones en factores que no responden al analito. El sistema también puede aplicar uno o varios tratamientos de datos, incluyendo aquellos que se basan en semiintegración, derivadas y semiderivadas para analizar los datos voltamperométricos.

Las secuencias de pulsos de voltamperometría controlada pueden proporcionar una exactitud y precisión mejoradas al análisis, reduciendo al mismo tiempo el tiempo para completar el análisis. Los errores de exactitud introducidos por el efecto del hematocrito y los errores de precisión introducidos por el volumen del espacio capilar variables pueden reducirse a través de la combinación de una capa de barrera de difusión con las secuencias de pulsos controladas. También pueden reducirse los errores que resultan de otro modo de una condición de sensor de estado no estacionario y/o fondo del mediador. El tiempo requerido para el análisis puede reducirse eliminando la necesidad de retardos y pulsos adicionales, tales como retardos de “incubación” para proporcionar la rehidratación del reactivo, pulsos de “agotamiento” para renovar los electrodos y pulsos de regeneración del mediador para renovar el estado de oxidación del mediador. Las secuencias de pulsos controladas también pueden permitir la determinación de perfiles de corriente y contorno dinámicos que proporcionan múltiples puntos de calibración, detección de llenado insuficiente y la capacidad para aplicar compensación de temperatura al análisis. Como las secuencias de pulsos controladas pueden generar datos útiles rápidamente, pueden evitarse los tiempos de espera prolongados de la culombimetría convencional y la inexactitud de las mediciones de estado no estacionario en la amperometría convencional.

Las figuras1A-1B muestran una tira de sensor 100, que puede utilizarse en el presente sistema de sensor. La figura 1A es una representación en perspectiva de una tira de sensor ensamblada 100 que incluye una base de sensor 110, al menos parcialmente cubierta por una tapa 120 que incluye un conducto de ventilación 130, un área cóncava 140 y una abertura de extremo de entrada 150. Un volumen parcialmente encerrado 160 (el espacio capilar) está formado entre la base 110 y la tapa 120. También pueden utilizarse otros diseños de tira de sensor compatibles con la presente invención, tales como los descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 5.120.420 y 5.798.031.

Una muestra líquida para el análisis puede transferirse al espacio capilar 160 introduciendo el líquido en la abertura 150. El líquido llena el espacio capilar 160 expulsando el aire contenido previamente a través del conducto de ventilación 130. El espacio capilar 160 puede contener una composición (no mostrada) que ayude a retener la muestra líquida en el espacio capilar. Los ejemplos de tales composiciones incluyen polímeros hidrófilos, tales como carboximetilcelulosa y polietilenglicol; y matrices de polímeros porosos, tales como dextrano y poliacrilamida.

La figura 1B muestra una vista superior de la tira de sensor 100, con la tapa 120 retirada. Unos conductores 170 y 180 pueden discurrir bajo una capa dieléctrica 190 desde la abertura 150 hasta un electrodo de trabajo 175 y un contraelectrodo 185, respectivamente. En un aspecto, los electrodos de trabajo y los contraelectrodos 175, 185 pueden estar sustancialmente en el mismo plano, como se muestra en la figura. En otro aspecto, los electrodos 175, 185 pueden estar enfrentados, como se describe en la solicitud de patente estadounidense 2004/0054267.

Aunque los electrodos de trabajo y los contraelectrodos 175, 185 pueden estar más cerca, en un aspecto los electrodos 175, 185 pueden estar separados más de 200 o 250 μm. De manera similar, aunque al menos uno de los electrodos 175, 185 puede estar más cerca, en un aspecto al menos un electrodo puede estar separado de una parte superior de la tapa 120 al menos 100 μm. En un aspecto, los electrodos de trabajo y los contraelectrodos 175,

185 pueden tener áreas de superficie de aproximadamente 1 mm^2 y 1,2 mm^2, respectivamente. La capa dieléctrica 190 puede cubrir parcialmente los electrodos 175, 185 y puede estar hecha de cualquier material dieléctrico adecuado, tal como un polímero aislante.

El contraelectrodo 185 equilibra el potencial en el electrodo de trabajo 175 de la tira de sensor 100. En un aspecto, este potencial puede ser un potencial de referencia que se consigue formando el contraelectrodo 185 a partir de un par redox, tal como Ag/AgCl, para proporcionar un electrodo de referencia-contraelectrodo combinado. En otro aspecto, el potencial puede proporcionarse al sistema de sensor formando el contraelectrodo 185 a partir de un material inerte, tal como carbono, e incluyendo una especie redox soluble, tal como ferricianuro, dentro del espacio capilar 160.

Alternativamente, la tira de sensor 100 puede dotarse de un tercer conductor y electrodo (no mostrado) para proporcionar un potencial de referencia al sistema de sensor. Este tercer electrodo puede estar configurado como electrodo de referencia real o como material inerte que se basa en una especie redox soluble para proporcionar el potencial de referencia. El tercer electrodo también puede permitir que el dispositivo de medición determine la inserción de una tira de sensor y/o si el espacio capilar 160 se ha llenado con la muestra. También pueden proporcionarse conductores y/o electrodos adicionales sobre la tira 100 para proporcionar éstas y otras funciones.

La figura 2 muestra un diagrama de vista de extremo de la tira de sensor ilustrada en la figura 1B que muestra la estructura en capas del electrodo de trabajo 175 y del contraelectrodo 185. Los conductores 170 y 180 pueden situarse directamente sobre la base 110. Las capas de conductor de superficie 270 y 280 pueden depositarse opcionalmente sobre los conductores 170 y 180, respectivamente. Las capas de conductor de superficie 270, 280 pueden estar hechas del mismo material o de materiales diferentes.

El material o los materiales utilizados para formar los conductores 170, 180 y las capas de conductor de superficie 270, 280 pueden incluir cualquier conductor eléctrico. Los conductores eléctricos preferibles son los no ionizantes, de modo que el material no sufra una oxidación neta o reducción neta durante el análisis de la muestra. Los conductores 170, 180 incluyen preferiblemente una capa delgada de una pasta de metal o metal, tal como oro, plata, platino, paladio, cobre o tungsteno. Las capas de conductor de superficie 270, 280 incluyen preferiblemente carbono, oro, platino, paladio o combinaciones de los mismos. Si sobre un conductor no está presente una capa de conductor de superficie, el conductor está hecho preferiblemente de un material no ionizante.

El material de conductor de superficie puede depositarse sobre los conductores 170, 180 mediante cualquier medio convencional compatible con el funcionamiento de la tira de sensor, incluyendo deposición en láminas, deposición química de vapor, deposición en suspensión, metalización, y similar. En el caso de deposición en suspensión, la mezcla puede aplicarse como una tinta a los conductores 170, 180, como se describe en la patente estadounidense n.º 5.798.031.

Las capas de reactivo 275 y 285 pueden depositarse sobre los conductores 170 y 180, respectivamente, e incluir reactivos y opcionalmente un aglutinante. El material de aglutinante es preferiblemente un material polimérico que es soluble en agua al menos parcialmente. Los materiales poliméricos solubles en agua parcialmente adecuados para su uso como aglutinante pueden incluir poli(óxido de etileno) (PEO), carboximetilcelulosa (CMC), alcohol polivinílico (PVA), hidroxietilcelulosa (HEC), hidroxipropilcelulosa (HPC), metilcelulosa, etilcelulosa, etilhidroxietilcelulosa, carboximetiletilcelulosa, polivinilpirrolidona (PVP), poliaminoácidos tales como polilisina, polisulfonato de estireno, gelatina, ácido acrílico, ácido metacrílico, almidón, anhídrido maleico, sales de los mismos, derivados de los mismos, y combinaciones de los mismos. De entre los materiales de aglutinante anteriores se prefieren PEO, PVA, CMC y PVA, siendo los más preferidos actualmente CMC y PEO.

Además del aglutinante, las capas de reactivo 275 y 285 pueden incluir los mismos reactivos o reactivos diferentes. En un aspecto, los reactivos presentes en la primera capa 275 pueden seleccionarse para su uso con el electrodo de trabajo 175, mientras que los reactivos presentes en la segunda capa 285 pueden seleccionarse para su uso con el contraelectrodo 185. Por ejemplo, los reactivos en la capa 285 pueden facilitar el flujo libre de electrones entre la muestra y el conductor 180. De manera similar, los reactivos en la capa 275 pueden facilitar la reacción del analito.

La capa de reactivo 275 puede incluir una oxidorreductasa específica para el analito que puede facilitar la reacción del analito potenciando la especificidad del sistema de sensor para el analito, especialmente en muestras biológicas complejas. A continuación, en la tabla II, se proporcionan ejemplos de algunas oxidorreductasas específicas y los analitos correspondientes.

Tabla II

Oxidorreductasa (capa de reactivo)	Analito
Glucosa deshidrogenasa	β-glucosa
Glucosa oxidasa	β-glucosa
Colesterol esterasa; colesterol oxidasa	Colesterol

Lipoproteína lipasa; glicerol quinasa; glicerol-3-fosfato oxidasa	Triglicéridos
Lactato oxidasa; lactato deshidrogenasa; diaforasa	Lactato
Piruvato oxidasa	Piruvato
Alcohol oxidasa	Alcohol
Bilirrubina oxidasa	Bilirrubina
Uricasa	Ácido úrico
Glutatión reductasa	NAD(P)H
Monóxido de carbono oxidorreductasa	Monóxido de carbono

Actualmente, las oxidorreductasas especialmente preferidas para el análisis de glucosa incluyen glucosa oxidasa, glucosa deshidrogenasa, derivados de las mismas, o combinaciones de las mismas.

La capa de reactivo 275 también puede incluir un mediador para comunicar de manera más eficaz los resultados de la reacción del analito al conductor de superficie 270 y/o al conductor 170. Los ejemplos de mediadores incluyen complejos OTM, complejos de coordinación y moléculas orgánicas electroactivas. Los ejemplos específicos incluyen compuestos de ferroceno, ferrocianuro, ferricianuro, coenzimas de pirroloquinolinquinonas sustituidas o no sustituidas (PQQ), 3 fenilimino-3H-fenotiazinas sustituidas o no sustituidas (PIPT), 3-fenilimino-3H-fenoxazina (PIPO), benzoquinonas sustituidas o no sustituidas, naftoquinonas sustituidas o no sustituidas, N óxidos, compuestos nitrosos, hidroxilaminas, oxinas, flavinas, fenazinas, derivados de fenazinas, fenotiazinas, indofenoles e indaminas. Éstos, y otros mediadores que pueden incluirse en la capa de reactivo pueden encontrarse en las patentes estadounidenses n.ºs 5.653.863; 5.520.786; 4.746.607; 3.791.988; y en las patentes europeas n.ºs 0 354 441 y 0 330 517.

Actualmente, los mediadores especialmente preferidos para el análisis de glucosa incluyen ferricianuro, hexamina de rutenio, PIPT, PIPO o combinaciones de los mismos. Puede consultarse una revisión de los mediadores electroquímicos útiles para los sistemas redox biológicos en Analytica Clínica Acta. 140 (1982), páginas 1-18.

Las capas de reactivo 275, 285 pueden depositarse mediante cualquier medio conveniente, tal como impresión, deposición líquida o deposición de chorro de tinta. En un aspecto, las capas se depositan mediante impresión. Siendo otros factores iguales, el ángulo de la hoja de impresión puede afectar inversamente al grosor de las capas de reactivo. Por ejemplo, cuando la hoja se mueve con un ángulo de aproximadamente 82º con respecto a la base 110, la capa puede tener un grosor de aproximadamente 10 μm. De manera similar, cuando se utiliza un ángulo de hoja de aproximadamente 62º con respecto a la base 110, puede producirse una capa más gruesa de 30 μm. Por tanto, ángulos de hoja inferiores pueden proporcionar capas de reactivo más gruesas. Además del ángulo de la hoja, otros factores, tales como la viscosidad del material aplicado así como el tamaño de pantalla y la combinación de emulsión, pueden afectar al grosor resultante de las capas de reactivo 275, 285.

El electrodo de trabajo 175 también puede incluir una capa de barrera de difusión (DBL) integrada en una capa de reactivo 275 o que es una capa distinta 290, tal como se ilustra en la figura 2. Por tanto, la DBL puede formarse como una combinación de reactivo/DBL sobre el conductor, como una capa distinta sobre el conductor o como una capa distinta sobre la capa de reactivo. Cuando el electrodo de trabajo 175 incluye la DBL distinta 290, la capa de reactivo 275 puede encontrarse o no sobre la DBL 290. En lugar de encontrarse sobre la DBL 290, la capa de reactivo 275 puede encontrarse sobre cualquier parte de la tira de sensor 100 que permita la solubilización del reactivo en la muestra. Por ejemplo, la capa de reactivo 175 puede encontrarse sobre la base 110 o sobre la tapa 120.

La DBL proporciona un espacio poroso que tiene un volumen interno en el que puede encontrarse una especie medible. Los poros de la DBL pueden seleccionarse de modo que la especie medible se pueda difundir en la DBL, excluyéndose sustancialmente constituyentes de muestra físicamente más grandes, tales como glóbulos rojos. Aunque las tiras de sensores convencionales han utilizado diversos materiales para filtrar los glóbulos rojos de la superficie del electrodo de trabajo, una DBL proporciona un volumen interno para contener y aislar una parte de la especie medible de la muestra.

Cuando la capa de reactivo 275 incluye un aglutinante soluble en agua, cualquier parte del aglutinante que no se disuelva en la muestra antes de la aplicación de una excitación puede funcionar como una DBL integral. El grosor inicial promedio de una combinación de DBL/capa de reactivo es preferiblemente menor de 30 o 23 micrómetros (μm) y más preferiblemente menor de 16 μm. Actualmente, un grosor inicial promedio especialmente preferido de una combinación de DBL/capa de reactivo es de 1 a 30 μm o de 3 a 12 μm. El grosor inicial promedio deseado de una combinación de DBL/capa de reactivo puede seleccionarse para una longitud de excitación específica basándose en cuando la velocidad de difusión de la especie medible de la DBL a una superficie de conductor, tal como la superficie del conductor 170 o la superficie del conductor de superficie 270 de la figura 2, se vuelve relativamente constante.

Además, el uso de una DBL demasiado gruesa con una longitud de excitación corta puede producir un retardo cuando la velocidad de difusión de la especie medible de la DBL a la superficie de conductor se vuelve relativamente constante. Por ejemplo, cuando se aplican ciclos de trabajo que incluyen excitaciones secuenciales de 1 segundo separadas por relajaciones de 0,5 segundos a un electrodo de trabajo utilizando una combinación de DBL/capa de reactivo que tiene un grosor inicial promedio de 30 μm, puede no alcanzarse una velocidad de difusión de especie medible preferida de la DBL a la superficie de conductor hasta que se hayan aplicado al menos 6 ciclos de trabajo (>~10 segundos). Por el contrario, cuando se aplican los mismos ciclos de trabajo a un electrodo de trabajo utilizando una combinación de DBL/capa de reactivo que tiene un grosor inicial promedio de 11 μm, puede alcanzarse una velocidad de difusión relativamente constante después de la segunda excitación (~2,5 segundos). Por tanto, existe un límite superior para el grosor inicial promedio preferido de la DBL para un ciclo de trabajo dado. En el documento WO 2006/042304, presentado el 12 de octubre de 2005, titulado “Concentration Determination in a Diffusion Barrier Layer” puede encontrarse un tratamiento más detallado de la correlación entre grosor de DBL, longitud de excitación y tiempo para alcanzar una velocidad de difusión relativamente constante.

La DBL distinta 290 puede incluir cualquier material que proporcione el espacio de poro deseado, siendo al mismo tiempo soluble de manera parcial o lenta en la muestra. En un aspecto, la DBL distinta 290 puede incluir un material de aglutinante de reactivo que carezca de reactivos. La DBL distinta 290 puede tener un grosor inicial promedio de al menos 1 μm, preferiblemente, de 5 a 25 μm y más preferiblemente de 8 a 15 μm.

Las figuras 3A y 3B muestran un electrodo de trabajo 300 que tiene un conductor de superficie 330 y una DBL distinta 305 durante la aplicación de pulsos de lectura largos y cortos. Cuando se aplica una muestra de ST al electrodo de trabajo 300, los glóbulos rojos 320 cubren la DBL 305. El analito presente en la muestra forma una especie medible externa 310 por fuera de la DBL 305. Una parte de la especie medible externa 310 se difunde en la DBL distinta 305 para proporcionar una especie medible interna 315.

Como se muestra en la figura 3A, cuando se aplica un pulso de lectura continuo de 10 segundos al electrodo de trabajo 300, tanto la especie medible externa como la interna 310 y 315 se excitan en el conductor de superficie 330 por un cambio en el estado de oxidación. Durante el pulso de lectura largo, la especie medible externa 310 se difunde a través de la región de muestra en la que residen los glóbulos rojos 320 y a través de la DBL 305 al conductor de superficie 330. La difusión de la especie medible externa 310 a través de los glóbulos rojos 320 durante el pulso de lectura introduce el efecto del hematocrito en el análisis. Como una parte sustancial de la especie medible excitada en el conductor de superficie 330 se origina fuera de la DBL 320, un pulso de lectura largo aplicado a una tira de sensor con una DBL puede actuar de manera similar con respecto al efecto del hematocrito con un pulso de lectura corto aplicado a una tira que carece de una DBL.

Por el contrario, la figura 3B representa la situación en la que se aplica una excitación corta a la tira de sensor dotada de DBL 300 para excitar la especie medible interna 315, excluyendo sustancialmente de la excitación la especie medible 310 por fuera de la DBL 305. Durante la excitación corta, la especie medible 310 o bien permanece por fuera de la DBL 305 o bien no se difunde sustancialmente a través de la DBL para alcanzar el conductor de superficie 330. De este modo, la excitación corta puede proporcionar una reducción sustancial en la influencia del efecto del hematocrito sobre el análisis. Reduciendo el efecto del hematocrito, pueden reducirse los errores de análisis (sesgo) introducidos por los componentes de la muestra, incluyendo los glóbulos rojos.

Otra ventaja de analizar selectivamente la especie medible dentro de la DBL con una excitación corta es una reducción de la imprecisión de medición de las tiras de sensor que tienen volúmenes de espacio capilar variables. Las variaciones en el volumen de espacio capilar entre las tiras de sensor pueden llevar a imprecisión porque la electrónica en los dispositivos de medición convencionales aplica el mismo potencial eléctrico y realiza los mismos cálculos para cada análisis. Si un pulso de lectura continúa pasado el tiempo en el que se ha analizado sustancialmente toda la especie medible presente en el espacio capilar, el análisis ya no representa la concentración de especie medible en la muestra, sino que representa la cantidad de especie medible en el espacio capilar; una medición muy diferente. Por tanto, una tira de sensor con un volumen de espacio capilar más grande mostrará una mayor concentración de analito que una tira de sensor con un volumen de espacio capilar más pequeño, independientemente de la concentración de analito de la muestra. Limitando sustancialmente el análisis a la especie medible presente en la DBL, puede reducirse la imprecisión introducida de otro modo por la variabilidad de fabricación entre las tiras de sensor.

Las figuras 4A y 4B son gráficos que ilustran la mejora en la exactitud de medición cuando se combina una DBL con una excitación corta. La figura 4A muestra una inexactitud grande representada como la diferencia entre las líneas de calibración del 16% y 48% (la amplitud del sesgo del hematocrito total) que resulta de una tira de sensor que carece de una DBL después de una excitación de 1 segundo. Por el contrario, la figura 4B muestra una menor diferencia entre las líneas de calibración que representan un resultado más exacto cuando se combina una DBL con una excitación de 1 segundo. La amplitud del sesgo del hematocrito total para la DBL combinada con una excitación corta fue casi dos tercios menor que la amplitud del sesgo total sin la DBL.

Como se describió anteriormente y como se describe en más detalle en el documento WO 2006/042304, una excitación o pulso de lectura corto puede proporcionar una mejora en la exactitud y/o precisión de un análisis. Sin

embargo, si se utiliza una única excitación corta para el análisis, puede no alcanzarse una velocidad de difusión relativamente constante de la especie medible de la DBL a la superficie de conductor durante el análisis. Esta condición también puede dar como resultado una inexactitud de la medición porque la concentración de la especie medible dentro de la DBL no representa con exactitud la de la muestra. Además, la excitación única puede no reducir de manera eficaz la señal de fondo del mediador.

La figura 5 representa un análisis electroquímico 500 para determinar la presencia y opcionalmente la concentración de un analito 522 en una muestra 512 que puede superar las desventajas asociadas a las excitaciones cortas. En un aspecto, el análisis 500 puede reducir el sesgo del fondo del mediador proporcionando un tiempo de análisis más corto con o sin una DBL. En un aspecto preferido, el análisis 500 puede completarse en menos de 3 o menos de 1 minuto. En un aspecto más preferido, el análisis 500 puede completarse en de 2 a 50 o de 4 a 32 segundos.

En 510, la muestra 512 se introduce en una tira de sensor 514, tal como la tira de sensor ilustrada en las figuras 1A-1B y 2. Las capas de reactivo, tales como 275 y/o 285 de la figura 2, comienzan a disolverse en la muestra 512, permitiendo así la reacción. En este momento en el análisis, opcionalmente puede proporcionarse un retardo de tiempo inicial, o “periodo de incubación”, para que los reactivos reaccionen con la muestra 512. Preferiblemente, el retardo de tiempo opcional puede ser de 1 a 10 segundos. En las patentes estadounidenses n.ºs 5.620.579 y 5.653.863 puede encontrarse un tratamiento más detallado de retardos de tiempo iniciales. En un aspecto, el análisis 500 puede reducir la necesidad de un periodo de incubación.

Durante la reacción, una parte del analito 522 presente en la muestra 512 se oxida o reduce químicamente o bioquímicamente en 520, tal como por una oxidorreductasa. Tras la oxidación o reducción, opcionalmente pueden transferirse electrones entre el analito 522 y un mediador 532 en 530.

En 540, una especie medible 542, que puede ser el analito cargado 522 de 520 o el mediador cargado 532 de 530, se excita de manera electroquímica (oxida o reduce). Por ejemplo, cuando la muestra 512 es sangre total que contiene glucosa oxidada por glucosa oxidasa en 520 y se transfiere un electrón para reducir un mediador de ferricianuro (III) a ferrocianuro (II) en 530, la excitación de 540 oxida el ferrocianuro (II) a ferricianuro (III) en el electrodo de trabajo. De este modo, se transfiere un electrón selectivamente del analito de glucosa al electrodo de trabajo de la tira de sensor donde puede detectarse mediante un dispositivo de medición (no mostrado).

La excitación 540 incluye barrido voltamperométrico en el que se aplica un potencial o “barrido” variable a través de los electrodos de la tira de sensor 514 a una velocidad sustancialmente fija (V/s). La velocidad de barrido puede ser lenta o rápida; sin embargo, se prefieren barridos rápidos debido a la naturaleza de las secuencias de pulsos controladas. En un aspecto, la velocidad a la que se realiza un barrido del potencial es al menos 2 mV/s, preferiblemente de 20 a 5000 mV/s, más preferiblemente de 200 a 2000 mV/s. Actualmente, una velocidad de barrido especialmente preferida es de 500 a 1500 mV/s.

La duración de la excitación 540 es de como mucho 4 o 5 segundos, y preferiblemente menor de 3, 2, 1,5, o 1 segundo. En otro aspecto, la duración de la excitación 540 es de 0,1 a 3 segundos, de 0,1 a 2 segundos, o de 0,1 a 1,5 segundos. Más preferiblemente, la duración de la excitación 540 es de 0,4 a 1,2 segundos.

En 550, las corrientes resultantes de la excitación de barrido 540 pueden monitorizarse y registrarse como una función del potencial (tensión) aplicado. Esto contrasta con la amperometría y culombimetría convencionales en las que se aplica una tensión constante mientras que la corriente se mide como una función de tiempo. En un aspecto, la corriente se monitoriza y registra durante la excitación 540. En otro aspecto, la corriente no se monitoriza durante la relajación 560 o al menos durante una parte de la relajación 560. En otro aspecto, la corriente y el potencial en el electrodo de trabajo pueden monitorizarse durante al menos una parte de la relajación 560, aunque los valores no se utilizan para determinar la concentración del analito 522.

En 560, la muestra experimenta una relajación, en la que el dispositivo de medición puede abrir el circuito a través de la tira de sensor 514, permitiendo así que el sistema se relaje. Durante la relajación 560, la corriente aplicada durante la excitación 540 se reduce sustancialmente en al menos la mitad, preferiblemente en un orden de magnitud, y más preferiblemente hasta cero. Preferiblemente, se proporciona un estado de corriente cero mediante un circuito abierto. En un aspecto, la relajación 560 tiene una duración de al menos 10, 5, 3, 2, 1,5, 1 o 0,5 segundos. En otro aspecto, la relajación 560 es de 0,1 a 3 segundos, de 0,1 a 2 segundos o de 0,1 a 1,5 segundos de duración. Más preferiblemente, la relajación 360 es de 0,2 a 1,5 segundos de duración y se proporciona mediante un circuito abierto.

Durante la relajación 560, el agente ionizante puede reaccionar con el analito para generar una especie medible adicional sin los efectos de un potencial eléctrico. Por tanto, para un sistema de sensor de glucosa que incluye glucosa oxidasa y un mediador de ferricianuro como reactivos, puede producirse ferrocianuro adicional (mediador reducido) que responde a la concentración de analito de la muestra sin interferencia de un potencial eléctrico durante la relajación 560.

La excitación 540, el registro 550 y la relajación 560 constituyen un único ciclo de trabajo. En 570, el ciclo de trabajo se repite al menos una vez para un total de al menos dos ciclos de trabajo. En un aspecto, el ciclo de trabajo se repite al menos dos veces para un total de al menos tres ciclos de trabajo en 180 segundos, 90 segundos, o menos. En otro aspecto, la secuencia de pulsos del análisis 500 incluye al menos 4, 6, 8, 10, 14, 18 o 22 ciclos de trabajo aplicados durante periodo de tiempo de 120, 90, 60, 30, 15, 10 o 5 segundos seleccionado de manera independiente. En otro aspecto, los ciclos de trabajo se aplican durante un periodo de tiempo de 5 a 60 segundos. En otro aspecto, pueden aplicarse de 3 a 18 o de 3 a 10 ciclos de trabajo en 30 segundos o menos. En otro aspecto, pueden aplicarse de 4 a 8 ciclos de trabajo en 3 a 16 segundos.

La naturaleza repetitiva de “encendido” y “apagado” de los ciclos de trabajo del análisis 500 contrasta directamente con los procedimientos convencionales en los que la tensión se aplica de manera continua a y la corriente se extrae de manera continua de una tira de sensor durante de 5 a 10 segundos durante la duración del pulso de lectura. Para estos procedimientos convencionales, la tensión aplicada puede tener un potencial fijo o puede tener un potencial que se desplaza de un potencial positivo a uno negativo o de un potencial positivo o uno negativo a un potencial cero con respecto a un potencial de referencia. Incluso con un potencial relativo cero, estos procedimientos extraen corriente de manera continua de la tira de sensor durante el pulso de lectura, lo que permite que continúe la reacción electroquímica durante todo el pulso de lectura. Por tanto, en estos procedimientos convencionales la reacción que produce especies medibles que responden a la concentración de analito y la difusión de la especie medible al electrodo de trabajo se ven afectadas en ambos casos por la corriente durante la parte de potencial cero de un pulso de lectura convencional. Las secuencias de pulsos del análisis 500 también son notablemente diferentes de los procedimientos convencionales que utilizan un único pulso de duración larga con múltiples mediciones, tales como los dados a conocer en la patente estadounidense n.º 5.243.516, debido a las múltiples relajaciones 560.

En 580, pueden transformarse los valores de corriente y tensión registrados con uno o varios tratamientos de datos. Los valores transformados pueden utilizarse para determinar la presencia y/o concentración del analito 522 en la muestra 512. Los valores transformados también pueden utilizarse para determinar otras características del análisis 500, incluyendo la concentración de hematocrito de la muestra, múltiples conjuntos de calibración, llenado insuficiente y el contenido de agente ionizante activo de la tira de sensor, como se indica a continuación.

Las figuras 6A-6F muestran seis ejemplos de secuencias de pulsos de voltamperometría controlada que pueden utilizarse con el procedimiento 500. En cada secuencia de pulsos, se aplicaron múltiples ciclos de trabajo a la tira de sensor tras la introducción de la muestra. La parte de excitación voltamperométrica de cada ciclo de trabajo puede aplicarse de una manera lineal (figura 6A), cíclica (figura 6B) o acíclica (figuras 6C-6F). En estos ejemplos, se utilizaron pulsos de excitación inclinada (lineales) o de onda triangular (cíclicos o acíclicos); sin embargo, también pueden utilizarse otros tipos de onda compatibles con el sistema de sensor y la muestra.

La figura 6A muestra múltiples excitaciones inclinadas en las que la tensión aumenta linealmente con el tiempo hasta un punto final. La figura 6B muestra múltiples excitaciones de onda triangular que proporcionan datos cíclicos que incluyen el intervalo de potencial completo del mediador de ferricianuro. La figura 6C muestra seis ciclos de trabajo que incluyen seis excitaciones de onda triangular que proporcionan datos acíclicos que comienzan y terminan sustancialmente a la misma tensión. Dado que la última excitación de la figura 6C, un pulso de lectura terminal 640, carece de relajación, solo se muestran seis ciclos de trabajo. La figura 6D muestra siete ciclos de trabajo que incluyen siete excitaciones de onda triangular que proporcionan datos acíclicos. El primer ciclo de trabajo está precedido por un período de incubación inicial. La figura 6E muestra múltiples excitaciones de onda triangular que proporcionan datos acíclicos que comienzan y terminan a diferentes tensiones. La figura 6F muestra múltiples excitaciones de onda triangular que dan como resultado datos acíclicos que excluyen sustancialmente los picos de oxidación y reducción del par redox ferricianuro/ferrocianuro.

El pulso de lectura terminal 640 puede tener la misma duración y velocidad de barrido que las excitaciones de los ciclos de trabajo anteriores, como se muestra en la figura 6C, o el pulso de lectura terminal 640 puede tener una duración o velocidad diferente. En un aspecto, el pulso de lectura terminal 640 puede ser de mayor duración y una tensión aumentada con relación a las excitaciones de los ciclos de trabajo anteriores. La tensión aumentada puede proporcionar la capacidad para detectar una especie con un potencial de oxidación mayor, tal como una solución control. Puede encontrarse una discusión más completa con respecto a los pulsos de lectura terminales en la solicitud provisional estadounidense n.º 60/669.729, presentada el 8 de abril de 2005, titulada “Oxidizable Species as an Internal Reference in Control Solutions for Biosensors”.

Pueden utilizarse soluciones de control que contienen cantidades conocidas de glucosa para verificar que el sistema de análisis funciona correctamente. En las patentes estadounidenses n.ºs 3.920.580; 4.572.899; 4.729.959; 5.028.542; 5.605.837; y en las publicaciones PCT WO 93/21928; WO 95/13535; y WO 95/13536 pueden encontrarse formulaciones específicas para soluciones de control. Si el dispositivo de medición no puede distinguir entre una señal de una solución de control frente a una muestra, las lecturas de la solución de control pueden almacenarse como valores de analito. Por lo tanto, es posible que el historial de lecturas de glucosa de un paciente, por ejemplo, sea inexacto con respecto a la enfermedad diabética.

Si el medidor de prueba no puede identificar las soluciones de control y sus respuestas por separado con respecto a las de las muestras de sangre, se incluirán las lecturas de glucosa de las soluciones de control en el historial de las mediciones de glucosa, lo que podría llevar a una interpretación errónea de la enfermedad diabética de un paciente.

Cada uno de los ciclos de trabajo para las secuencias de pulsos mostradas en las figuras 6A-6F proporciona tiempos de excitación de menor duración que los tiempos de relajación de circuito abierto posteriores; sin embargo, esto no es necesario. En la figura 6C la duración de las excitaciones es de 0,8 segundos a una velocidad de 1 V/s mientras que la duración de cada relajación es de aproximadamente 3,2 segundos. Por lo tanto, cada ciclo de trabajo tiene una duración de aproximadamente 4 segundos y la secuencia de pulsos dura aproximadamente 24,8 segundos, incluyendo un pulso de lectura terminal para proporcionar una intensidad redox (RI) de 0,226 (5,6/24,8). La secuencia de pulsos de la figura 6D proporciona una RI menor de 0,2 (5,6/28), atribuible al período de incubación antes del primer ciclo de trabajo.

Cuanto mayor sea la RI para una secuencia de pulsos, menor será la inexactitud de fondo introducida en el análisis por el mediador. Las secuencias de pulsos representadas en las figuras 6A-6F son pulsos oxidativos, diseñados para excitar (por ejemplo oxidar) un mediador reducido, que es la especie medible. Por tanto, cuanto mayor sea la corriente oxidativa aplicada a la tira de sensor en un periodo de tiempo dado, menor será la posibilidad de que el mediador reducido por mecanismos distintos a la oxidación del analito contribuya a los valores de corriente registrados. En combinación, las múltiples excitaciones de la secuencia de pulsos de voltamperometría controlada pueden eliminar la necesidad de un pulso inicial para renovar el estado de oxidación del mediador. Para el ferricianuro, se prefieren secuencias de pulsos con valores de RI de al menos 0,01, 0,3, 0,6 o 1, siendo más preferidos actualmente los valores de RI de 0,1 a 0,8, de 0,2 a 0,7 o de 0,4 a 0,6.

Durante una excitación lineal, tal como la excitación directa 610 mostrada en la figura 6A, se mide la corriente en el electrodo de trabajo mientras que el potencial en el electrodo de trabajo cambia linealmente con el tiempo a una velocidad constante. El intervalo de excitación, tal como de -0,5 V a +0,5 V, puede cubrir los estados reducido y oxidado de un par redox de modo que se produzca una transición de un primer estado a un segundo estado. Se puede considerar que la corriente medida en el electrodo de trabajo tiene tres componentes: la corriente de equilibrio, la corriente de difusión y la corriente de superficie. La corriente de superficie, que puede proceder de cualquier especie adsorbida sobre el electrodo, es en general pequeña. Las corrientes de equilibrio y difusión son las componentes primarias representadas en el voltamperograma resultante.

Un voltamperograma lineal (un gráfico de corriente frente a tensión) puede caracterizarse por un trazado que comienza en una corriente inicial, alcanza una corriente de pico y cae a un nivel de corriente menor de difusión limitada (DLC) durante la excitación. La corriente inicial depende sustancialmente del potencial aplicado, mientras que la DLC no. Si el barrido es suficientemente lento, la DLC puede considerarse como una región de meseta en un voltamperograma.

La región de DLC representa un estado en el que la oxidación o reducción de la especie medible en la superficie de conductor alcanza una velocidad máxima sustancialmente limitada por la difusión. La difusión puede limitarse por la velocidad a la que la especie medible se desplaza desde la muestra a la superficie de conductor. Alternativamente, cuando el electrodo de trabajo de la tira de sensor incluye una DBL, la difusión puede limitarse por la velocidad a la que la especie medible se desplaza desde la DBL a la superficie de conductor.

Los valores de DLC registrados a una velocidad de difusión relativamente constante después de la rehidratación de la capa de reactivo pueden minimizar las inexactitudes que se introducirían de otro modo por variaciones en las velocidades de rehidratación y difusión de los reactivos. Por tanto, una vez alcanzada una velocidad de difusión relativamente constante, los valores de DLC registrados pueden corresponder más exactamente a la concentración de la especie medible, y por lo tanto al analito.

Tras finalizar la excitación directa 610, para una excitación cíclica o acíclica, tales como las que se muestran en las figuras 6B y 6C, respectivamente, se aplica una excitación lineal de potencial inverso 620. El barrido lineal de potencial inverso de la excitación 620 puede aplicarse sustancialmente a la misma velocidad que el barrido directo 610. Por tanto, se realiza un barrido del intervalo de excitación de un primer valor inferior a un valor superior y de nuevo a un segundo valor inferior, donde los valores inferiores primero y segundo pueden ser o no iguales para los barridos cíclico y acíclico, respectivamente. Las excitaciones cíclicas, y en algunos casos acíclicas, pueden examinar la transición de una especie redox de un estado reducido a un estado oxidado (y viceversa) en relación al potencial aplicado o en relación a la velocidad de difusión de la especie redox hacia la superficie de conductor.

En relación a una excitación lineal, las excitaciones cíclicas y acíclicas pueden proporcionar una mejor representación de la región de DLC de la excitación. La ventaja de las excitaciones cíclicas y acíclicas puede ser especialmente ventajosa para cuantificar la DLC a partir de pares redox cuasirreversibles a velocidades de barrido rápidas. En “Electrochemical Methods; Fundamentals and Applications” de A.J. Bard y L.R. Faulkner, 1980 puede encontrarse información adicional sobre voltamperometría de barrido lineal y cíclico.

La figura 7A presenta los datos de una excitación cíclica de 25 mV/s de un par redox ferricianuro/ferrocianuro como un voltamperograma cíclico. El voltamperograma se caracteriza por un pico de corriente directa durante la parte directa del barrido de -0,3 V a +0,6 V que indica la oxidación de ferrocianuro y un pico de corriente inversa durante el barrido de tensión inversa de +0,6 V de vuelta a -0,3 V que indica la reducción de ferricianuro. Los picos de corriente directa e inversa se centran alrededor del potencial formal $E^{0'}$ del par redox ferrocianuro/ferricianuro, con referencia al contraelectrodo. En este aspecto, el potencial del contraelectrodo se determina sustancialmente por el potencial de reducción del ferricianuro, estando presente la especie redox principal en el contraelectrodo.

Mientras que los potenciales en los que comienzan los barridos directo e inverso (el intervalo de excitación) pueden seleccionarse de modo que incluyan los estados reducido y oxidado del par redox, puede reducirse el intervalo de excitación para acortar el tiempo de análisis. Sin embargo, el intervalo de excitación incluye preferiblemente la región de DLC para el par redox. Por ejemplo, a una velocidad de barrido de 25 mV/s, la concentración de las especies reducida [Red] y oxidada [Ox] del par redox reversible ferrocianuro/ferricianuro y el potencial de electrodo resultante se describen mediante la ecuación de Nernst de la siguiente manera.

$$\mathrm{E} = E^{0'} + \frac{RT}{nF}\ln\frac{[Ox]}{[\mathrm{Re}d]} \underline{\underline{T=25°C}}\ E^{0'} + \frac{0{,}059}{n}\log\frac{[Ox]}{[\mathrm{Re}d]} \underline{\underline{\mathrm{n}=1}}\ E^{0'} + 0{,}059\log\frac{[Ox]}{[\mathrm{Re}d]} \quad (1)$$

En la ecuación de Nernst, R es la constante de los gases de 8,314 J/(mol*K), F es la constante de Faraday de 96.5000 C/equiv., n es el número de equivalentes por mol, y T es la temperatura en grados Kelvin. Cuando el potencial en el electrodo de trabajo está en referencia a su propio potencial redox, el potencial formal $E^{0'}$ pasará a ser sustancialmente cero y la ecuación se convierte en:

$$\mathrm{E} = 0{,}059\log\frac{[\mathrm{Ox}]}{[\mathrm{Red}]} = 0{,}059\log\frac{[\mathrm{Fe(CN)}_6^{-3}]}{[\mathrm{Fe(CN)}_{6'}^{-4}]}. \quad (2)$$

De la ecuación (2), cuando la relación del mediador oxidado con respecto al mediador reducido cambia en 10, el potencial en el electrodo de trabajo cambia en aproximadamente 60 mV. Lo inverso también es cierto. Por tanto, para las relaciones de concentración de ferricianuro [Ox] con respecto a ferrocianuro [Red] de 10:1, 100:1, 1000:1 y 10.000:1, el potencial en el electrodo de trabajo será de aproximadamente 60, 120, 180 y 240 mV a partir del potencial cero, respectivamente.

Por tanto, cuando la relación de ferricianuro con respecto a ferrocianuro sea ~1000:1, un intervalo de barrido de -180 mV a +180 mV proporcionará una oxidación sustancialmente completa de la especie reducida en el electrodo de trabajo. A 180 mV, la velocidad de oxidación está limitada por lo rápido que se puede difundir la forma reducida del mediador en la superficie de conductor, y desde este potencial hacia adelante, existe una región de DLC. Por tanto, si el punto de inversión se establece en ~400 mV desde el potencial cero, pueden proporcionarse ~200 mV de la región de DLC.

Para sistemas reversibles, puede ser preferible proporcionar un intervalo de excitación de 400 a 600 mV, produciendo así una excitación de 200 a 300 mV a cada lado del potencial formal $E^{0'}$ del par redox. Para los sistemas cuasirreversibles, puede ser preferible proporcionar un intervalo de excitación de 600 a 1000 mV, produciendo así una excitación de 300 a 500 mV a cada lado del potencial formal $E^{0'}$ del par redox.

Puede preferirse el intervalo de excitación mayor para sistemas cuasirreversibles debido a que la región de DLC puede ser más pequeña. Además de los pares redox que de manera inherente son cuasirreversibles, una excitación de barrido rápido puede hacer que un par redox que es reversible a velocidades de excitación lentas muestre un comportamiento cuasirreversible. Por tanto, puede ser preferible proporcionar un intervalo de excitación cuasirreversible mayor para un par redox reversible a velocidades de excitación rápidas.

Preferiblemente, se proporcionan al menos 25, 50, 100, 150 o 300 mV de región de DLC por el intervalo de excitación seleccionado. En otro aspecto, el punto de inversión para una excitación cíclica o acíclica se selecciona de modo que se proporcionen de 25 a 400 mV, de 50 a 350 mV, de 100 a 300 mV o de 175 a 225 mV de región de DLC. Para sistemas reversibles, el punto de inversión para una excitación cíclica o acíclica puede seleccionarse de modo que se proporcionen de 180 a 260 mV o de 200 a 240 mV de región de DLC. Para sistemas cuasirreversibles, el punto de inversión para una excitación cíclica o acíclica puede seleccionarse de modo que se proporcionen de 180 a 400 mV o de 200 a 260 mV de región de DLC.

Una vez que se selecciona el punto de inversión para proporcionar la región de DLC deseada, puede seleccionarse la duración del barrido inverso para un barrido acíclico. Como puede observarse en la figura 7B, el comienzo del barrido directo y la finalización del barrido inverso a aproximadamente -0,025 mV dio como resultado un barrido acíclico que incluyó más del pico de corriente directa que del pico de corriente inversa. A partir de la comparación

con la figura 7B, mientras que las corrientes pico obtenidas para los barridos cíclico (a) y acíclico (b) difieren, la región de DLC de los barridos fue casi la misma, especialmente con respecto al barrido inverso.

En otro aspecto, la excitación inversa puede terminarse antes de que se alcance el pico de corriente inversa, como se muestra en la figura 7C. Cuando la excitación directa se inicia a un potencial suficientemente negativo, tal como a -0,3 mV en la figura 7C, en el medio del intervalo de potencial del par redox, tal como -0,05 mV en la figura 7C, la excitación directa incluye el intervalo completo del potencial redox del par redox. Por tanto, terminando la excitación inversa a un potencial de 50 a 500 mV, de 150 a 450 o de 300 a 400 mV negativo desde el punto de inversión, por ejemplo, puede excluirse el pico de corriente inversa para el par redox ferricianuro/ferrocianuro.

De manera similar, la excitación inversa también puede terminarse antes de alcanzar el pico de corriente inversa terminando la excitación cuando la corriente de excitación inversa se desvía con respecto a su valor de la DLC. Puede utilizarse un cambio en la corriente de excitación inversa de al menos el 2%, 5%, 10% o 25% para indicar el inicio del pico de corriente de excitación inversa.

La figura 7D compara un voltamperograma cíclico de 1 V/s que incluye los picos de oxidación directo e inverso del par redox con un voltamperograma acíclico de 1V/s que excluye los picos de oxidación directo e inverso de un par redox. La excitación acíclica tuvo puntos de inicio y finalización de 200 mV y un punto de inversión de 300 mV. Intervalos de excitación preferibles para las excitaciones acíclicas dentro de la región de DLC del par redox ferricianuro/ferrocianuro, que excluyen los picos de oxidación y reducción directo e inverso, son de 10 a 200 mV, más preferiblemente de 50 a 100 mV. Mientras que el voltamperograma cíclico que incluye el intervalo de barrido completo cayó significativamente después de alcanzar el pico de corriente, el voltamperograma acíclico proporcionó una región de corriente sustancialmente plana por el intervalo de barrido. Esta región de corriente puede correlacionarse directamente con la concentración de analito de la muestra.

Como se observa en la figura 7D, los valores de corriente registrados para la excitación acíclica son numéricamente más pequeños que los de la excitación cíclica, mientras que la corriente de fondo es menor para la excitación acíclica. Esta reducción beneficiosa en la corriente de fondo se obtuvo inesperadamente sin tener que iniciar la excitación acíclica en la parte de pico de reducción de la excitación cíclica. Por tanto, una excitación acíclica rápida y corta dentro de la región de DLC de un par redox puede aumentar la exactitud de la determinación del analito debido a una reducción en la corriente de fondo, que puede proporcionar un aumento en la relación señal a fondo.

Las excitaciones cíclicas y acíclicas pueden proporcionar múltiples beneficios en relación con las excitaciones lineales. En un aspecto, la parte del barrido inverso a partir del punto de inversión hasta el punto en el que comienza el pico de corriente inversa puede ser una mejor representación de los valores de DLC reales que la región de DLC del barrido directo. La región de DLC de la excitación inversa puede ser una representación más exacta de la concentración de analito para sistemas redox cuasirreversibles o a velocidades de excitación rápidas porque la excitación directa puede no mostrar una región de DLC distinta.

Las excitaciones acíclicas pueden tener múltiples ventajas sobre las excitaciones cíclicas, incluyendo un tiempo de excitación más corto *y* una disminución sustancial en la cantidad de mediador convertido electroquímicamente al estado medible. Por tanto, si el mediador se reduce en respuesta al analito y se oxida electroquímicamente durante la medición, el terminar la excitación inversa antes de que el mediador oxidado se reduzca electroquímicamente disminuye la cantidad de mediador reducido en la muestra que no responde al analito. De manera similar, el iniciar la excitación directa a un potencial por encima del cual se reduce la especie medible también puede disminuir la cantidad de mediador reducido en la muestra que no responde al analito. Ambas excitaciones acíclicas pueden permitir un tiempo de análisis más corto, un beneficio significativo para el usuario.

Las figuras 8A-8D muestran las corrientes dinámicas de salida trazadas como una función del potencial de la secuencia de pulsos de la figura 6C utilizando 7 excitaciones de forma de onda triangular para muestras de ST que contienen un 40% de hematocrito y 0, 50, 100 y 400 mg/dL de glucosa. La velocidad de barrido fue de 1 V/s. En lugar de un pulso de lectura de larga duración convencional que da como resultado una oxidación extensa de la especie medible, cada excitación triangular iba seguida de una relajación para proporcionar un corte en el perfil de corriente. Las corrientes de cada excitación sucesiva se trazaron como una línea “rep” diferente, proporcionando así rep1 a rep7 para cada figura.

Los valores de corriente de cada una de las múltiples excitaciones (cada rep) en los voltamperogramas de las figuras 8A-8D se convirtieron en un punto de dato individual y se conectaron para proporcionar los perfiles de contorno de las figuras 9A-9C. Para las figuras 9A y 9B, la conversión se llevó a cabo seleccionado un valor de corriente al mismo potencial en la región de DLC de cada excitación sucesiva, tal como 300 mV. En la FIG. 9A, los valores de corriente de las figuras 8A-8D se trazaron directamente como una función del tiempo desde la finalización de la secuencia de pulsos. En la figura 9B, se aplicó un tratamiento de datos semiintegral a los valores de corriente antes del trazado. Para la figura 9C, las múltiples excitaciones se convirtieron en puntos de datos individuales seleccionando el valor de corriente de pico de cada rep y utilizando un tratamiento de datos semiderivado. De este modo, el eje X de los perfiles de contorno se expresa en términos de tiempo, simulando así los datos obtenidos a partir de un sistema convencional en estado estacionario, en el que el cambio de corriente con el tiempo es

sustancialmente constante. Aunque las corrientes de voltamperograma registradas pueden tratarse de múltiples maneras para extraer información útil, en la actualidad se prefieren los tratamientos de datos semiintegrales, semiderivados y derivados.

Los perfiles de corriente dinámicos obtenidos de las secuencias de pulsos de voltamperometría controlada son fundamentalmente diferentes de los perfiles de corriente obtenidos a partir de un análisis convencional utilizando un único pulso de lectura. Mientras que las corrientes registradas de un único pulso de lectura derivan de una única relajación/difusión, cada punto de tiempo en el perfil de contorno de las corrientes dinámicas se origina de una excitación después de un proceso de relajación/difusión independiente. Además, a medida que aumenta la longitud de una excitación, la correlación entre la corriente y la concentración de analito puede disminuir, a menudo debido al efecto del hematocrito. Por tanto, puede aumentarse la exactitud de un análisis que utiliza múltiples excitaciones cortas, comparado con un análisis que utiliza un pulso de lectura más largo que tiene la duración de las múltiples excitaciones combinadas.

Más abajo se describe la aplicación de estos tratamientos de datos al análisis de glucosa. Sin embargo, puede encontrarse una discusión más detallada de tratamientos de datos para transformar corrientes electroquímicas y las implementaciones digitales relacionadas en Bard, AJ., Faulkner, L.R., “Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications”, 1980; Oldham, K.B.; “A Signal-Independent Electroanalytical Method”, Anal. Chem. 1972, 44, 196; Goto, M., Oldham, K.B., “Semi-integral Electroanalysis: Shapes of Neopolarograms”, Anal. Chem. 1973, 45, 2043; Dalrymple-Alford, P., Goto, M., Oldham, K.B., “Peak Shapes in Semi-differential Electroanalysis”, Anal. Chem. 1977, 49, 1390; Oldham, K.B., “Convolution: A General Electrochemical Procedure Implemented by a Universal Algorithm”, Anal. Chem. 1986, 58, 2296; Pedrosa, J.M., Martin, M.T., Ruiz, J.J., Camacho, L., “Application of the Cyclic Semi-Integral Voltammetry and Cyclic Semi-Differential Voltammetry to the Determination of the Reduction Mechanism of a Ni-Porphyrin”, J. Electroanal. Chem. 2002, 523, 160; Klicka, R, “Adsorption in Semi-Differential Voltammetry,” J. Electroanal. Chem. 1998, 455, 253.

La semiintegración de un voltamperograma puede separar la DLC de la corriente en equilibrio afectada por hematocrito (pico inicial) porque pueden observarse señales separadas para la corriente si en equilibrio afectada por hematocrito y el hematocrito. Esto ocurre especialmente a velocidades de barrido lentas. La semiintegral de la corriente voltamperométrica obtenida experimentalmente i(t) tiene la siguiente forma matemática:

$$\frac{d^{-1/2}}{dt^{-1/2}} i(t) = I(t) = \frac{1}{\pi^{1/2}} \int_0^t \frac{i(u)}{(t-u)^{1/2}} du \qquad (3)$$

donde i(t) es la función de tiempo de la corriente voltamperométrica obtenida durante el barrido;

I(t) es una transformación y la semiintegral de i(t);

u es un parámetro de transformación; y

$d^{-1/2}/dt^{-1/2}$ es el operador de semiintegración.

A un potencial de oxidación suficientemente elevado, la corriente de semiintegración de estado estacionario viene dada por:

$$I_{lim} = nFAD^{1/2}C \ (\mathrm{c/s^{1/2}}) \qquad (4)$$

donde I_{lim} es la DLC bajo la condición de que la concentración de superficie de la especie oxidable sea cero. Obsérvese que la unidad de corriente semiintegral es $C/s^{1/2}$, que no es la unidad tradicional para expresar la corriente eléctrica, que es C/s.

Por motivos de simplicidad, I_{lim} se denomina DLC de semiintegración (SI) con una unidad de $C/s^{1/2}$. Esta corriente SI ($C/s^{1/2}$) es sólo una integración de medio paso a partir de la corriente (C/s). La integración de medio paso es fundamentalmente diferente de la culombimetría en la que se aplica una integral completa a la curva i-t para proporcionar la carga total que pasa a través de los electrodos.

Aunque la ecuación (3) proporciona una definición teórica de la semiintegral, para procesamiento digital los datos i-t pueden dividirse en N intervalos de tiempo igualmente espaciados entre $t = 0$ y $t = N\Delta t$. Un algoritmo de procesamiento digital de este tipo viene dado por la ecuación (5) donde $t = k\Delta t$ y $u = j\Delta t$, e i se determina en el punto medio de cada intervalo.

$$I(k\Delta t) = \frac{1}{\pi^{1/2}} \sum_{j=1}^{j=k} \frac{i(j\Delta t - 1/2\Delta t)\Delta t^{1/2}}{\sqrt{k-j+1/2}} \quad (5)$$

Un algoritmo preferido para el procesamiento digital viene dado por

$$I(k\Delta t) = \frac{1}{\pi^{1/2}} \sum_{j=1}^{j=k} \frac{\Gamma(k-j+1/2)}{(k-j)!} \Delta t^{1/2} i(j\Delta t) \quad (6)$$

donde Γ(x) es la función gamma de x, donde $\Gamma(1/2) = \pi^{1/2}$, $\Gamma(3/2) = 1/2\pi^{1/2}$ y $\Gamma(5/2) = 3/2*1/2\pi^{1/2,}$, etc.

A partir de la ecuación (4) puede observarse que la corriente SI carece del factor de dependencia del tiempo de los procedimientos amperométricos convencionales. Por tanto, la respuesta de corriente SI puede considerarse como una serie de corrientes de meseta, en lugar de las corrientes amperométricas continuamente cambiantes obtenidas en la amperometría convencional. Como la semiintegración permite la cuantificación de la DLC, puede utilizarse una velocidad de barrido más rápida que cuando se cuantifican corrientes de pico. Por tanto, la voltamperometría lineal, cíclica o acíclica en combinación con la semiintegración pueden generar rápidamente una DLC en respuesta a las concentraciones de glucosa. De esta manera, pueden reducirse las desventajas de los largos tiempos de espera de la culombimetría y la naturaleza de estado no estacionario de la corriente en la amperometría convencional.

La ecuación (4) también muestra que los pares redox reversibles o cuasirreversibles son preferidos para su uso con la semiintegración. Esto se debe a que la semiintegral de un par redox reversible o cuasirreversible puede mostrar una transición brusca del estado reducido al estado oxidado (y viceversa) y una región de DLC amplia, haciendo así que la transición sea más sencilla de determinar. Ferricianuro/ferrocianuro y los estados +3 y +2 de hexamina de rutenio son ejemplos de pares redox que muestran comportamientos reversibles (barrido lento) o cuasirreversibles (barrido rápido) preferidos.

Los electrodos con una activación pobre pueden no proporcionar una condición de DLC aceptable, incluso con pares redox reversibles o cuasirreversibles. Por tanto, pueden utilizarse los procedimientos de activación de electrodos, tales como los que se describen en la patente estadunidense n.º 5.429.735, para conseguir la actividad de electrodo preferida.

Además de las semiintegrales, también pueden utilizarse semiderivadas de un voltamperograma para cuantificar el analito midiendo el pico de la semiderivada. La semiderivada de la corriente voltamperométrica obtenida experimentalmente i(t) tiene las siguientes formas matemáticas:

$$\frac{d^{1/2}}{dt^{1/2}} i(t) \quad (7)$$

$$\frac{d^{1/2}}{dt^{1/2}} i(t) = \frac{dI(t)}{dt} = \frac{d}{dt}\left[\frac{1}{\pi^{1/2}} \int_0^t \frac{i(u)}{(t-u)^{1/2}} du\right], (c/s^{3/2}) \quad (8)$$

donde I(t) es la semiintegral de la función de tiempo i(t). Las ecuaciones utilizadas para el tratamiento de datos de la semiintegral, semiderivada y derivada descrito más abajo se implementaron con el paquete de software Electrochemical Workstation, versión 4.07, actualizado el 26 de abril de 2004, que acompaña a la estación de trabajo electroquímica de CH Instruments, modelo CHI 660A.

La figura 10A presenta el gráfico de la semiintegral del voltamperograma cíclico de la figura 7A. De manera similar, la figura 10B presenta el gráfico de la semiintegral del voltamperograma acíclico de la figura 7C, en el que la excitación inversa termina antes del inicio del pico de corriente inversa. La figura 10C establece que cuando se traza la semiintegral de las excitaciones cíclicas y acíclicas de la figura 7B, la región de DLC del barrido de retorno se estableció de inmediato, permitiendo una lectura de corriente exacta en tan poco como 50 mV del punto de inversión. Además, la parte de pico del gráfico de la semiintegral respondía al contenido en hematocrito de la muestra y la magnitud del pico puede relacionarse cuantitativamente al nivel de hematocrito.

La figura 10D muestra las semiintegrales para las excitaciones cíclicas y acíclicas de 200 a 300 mV de la figura 7D. La forma del voltamperograma si de la excitación corta acíclica difiere del voltamperograma de la excitación cíclica porque la región de transición oxidación-reducción falta en la excitación acíclica. Iniciando la excitación acíclica en la región de DLC, la corriente si de fondo disminuye a una velocidad mayor en comparación con la observada para el voltamperograma cíclico, mejorando así la relación señal a fondo para la excitación acíclica. Además, la corriente si inversa de la excitación acíclica muestra una meseta que describe con mayor exactitud la concentración de analito

de la muestra que la corriente si directa. De este modo, el barrido acíclico de la región de DLC proporciona un aumento en la exactitud para el análisis cuando se compara con la excitación cíclica.

La figura 11 muestra perfiles de contorno preparados mediante voltamperogramas de semiintegración a partir de una secuencia de siete pulsos de excitación para muestras de ST que contienen 0, 56, 111, 221,75, 455,25 y 712,5 mg/dL de glucosa en plasma. Para cada una de las concentraciones de glucosa, se alcanzó el equilibrio con respecto a la rehidratación de DBL al valor de corriente máximo en el perfil de contorno para cada concentración de glucosa. Por tanto, las lecturas 1110 (máxima) y 1120 (mínima) establecen que se ha alcanzado el equilibrio con respecto a la rehidratación de DBL en aproximadamente cuatro segundos para la concentración de glucosa de 455 mg/dL.

Los valores de corriente registrados a una velocidad de difusión relativamente constante pueden minimizar las inexactitudes que de otro modo se introducirían por las variaciones en la rehidratación y las velocidades de difusión de los reactivos. Por tanto, una vez que se alcanza una velocidad de difusión relativamente constante, los valores de corriente registrados pueden corresponder más exactamente a la concentración de las especies medibles, y por tanto el analito. Además, para la figura 11, puede completarse todo el análisis en tan solo siete segundos porque una vez conocido el valor de corriente máximo 1110 del perfil de contorno, su valor puede correlacionarse directamente a la concentración de analito. Pueden obtenerse puntos de datos adicionales para reducir el error de fondo atribuible al mediador, como se comentó anteriormente con respecto a RI.

Otra forma de tratamiento de datos que puede utilizarse para generar un perfil de contorno es la semiderivada. Una implementación de una semiderivada es considerar una derivada completa de la semiintegral, como se describió anteriormente en relación a la ecuación (8). A diferencia de la región de meseta que representa el barrido voltamperométrico en los gráficos de semiintegral, los gráficos de semiderivada convierten los datos de barrido voltamperométrico en un pico centrado en la transición del par redox.

La figura 12A muestra el voltamperograma cíclico (a), la semiintegral (b) y semiderivada (c) de ferrocianuro 16 mM en una muestra de ST con un 20% de hematocrito. En este caso, el electrodo de trabajo de la tira de sensor carece de enzima y mediador oxidado. La figura 12B es una ampliación de la curva de semiderivada de la figura 12A que muestra la altura de pico para el barrido directo. El valor de la altura de pico de barrido directo o inverso puede correlacionarse con la concentración de analito de la muestra. Además, el tratamiento de datos de semiderivada puede proporcionar de manera inherente una compensación de hematocrito para la determinación de la glucosa, especialmente para muestras que incluyen menos de un 40% de hematocrito. En el documento WO 2005/114164, presentado el 16 de mayo de 2005, titulado “Voltammetric Systems for Assaying Biological Analytes” puede encontrarse una descripción más detallada de la aplicación del tratamiento de datos de semiderivada al análisis de glucosa.

Además de los tratamientos de datos de semiintegral y semiderivada, también puede utilizarse un tratamiento de datos de derivada para generar un perfil de contorno, y así determinar la concentración del analito en la muestra. Las figuras 13A-13C muestran las derivadas de voltamperogramas cíclicos para muestras que tienen un 20, 40 y 60% de hematocrito. Estos gráficos de derivación muestran un aumento inicial en la corriente a medida que aumenta la tensión, seguido de una disminución, y finalmente una región de DLC. El efecto del hematocrito puede observarse en el pico negativo ubicado aproximadamente a 0,1 voltios en las figuras 12A-12C, reflejándose concentraciones de glóbulos rojos mayores como valores de pico más negativos.

Aunque los valores de los picos de derivada positivo y negativo, tales como los mostrados en el gráfico de derivada de la figura 13B, dependen de la concentración, la relación del pico negativo con el pico positivo anula la dependencia de la concentración, siendo así dependiente del hematocrito. Como esta relación (HI-DER) es independiente de la concentración y dependiente del hematocrito, la relación indica el porcentaje de hematocrito en la muestra. Por tanto, puede utilizarse esta relación de los picos de derivada para determinar una ecuación de compensación de hematocrito para la determinación de analitos. En el documento WO 2005/114164 puede encontrarse una descripción más detallada de la aplicación de un tratamiento de datos de derivada al análisis de glucosa.

Además de la capacidad de las secuencias de pulsos controladas para reducir la inexactitud del efecto del hematocrito y de la señal de fondo del mediador, puede utilizarse la combinación del perfil de corriente dinámica de cada excitación y los perfiles de contorno resultantes para proporcionar múltiples conjuntos de constantes de calibración al sistema de sensor, aumentando así la exactitud del análisis. Cada conjunto de constantes de calibración obtenido puede utilizarse para correlacionar una lectura de corriente específica con una concentración específica de especie medible en la muestra. Por tanto, en un aspecto, puede obtenerse un aumento en la exactitud promediando los valores de glucosa obtenidos utilizando múltiples conjuntos de constantes de calibración.

Los sistemas convencionales de sensores electroquímicos utilizan generalmente un conjunto de constantes de calibración, tal como pendiente e intercepción, para convertir las lecturas de corriente en una concentración correspondiente del analito en la muestra. Sin embargo, un único conjunto de constantes de calibración puede dar

como resultado inexactitudes en la concentración de analito determinada a partir de los valores de corriente registrados porque en la medición se incluye el ruido aleatorio.

Tomando el valor de corriente o el valor de corriente transformado después del tratamiento de datos en un tiempo fijo dentro de cada ciclo de trabajo de una secuencia de pulsos de voltamperometría controlada, pueden establecerse múltiples conjuntos de constantes de calibración. La figura 14 traza las corrientes de semiintegral registradas a 7,4, 10,65, 13,9 y 17,15 segundos para los perfiles de contorno de la figura 11. Cada una de estas cuatro líneas de calibración es independiente de la otra y pueden utilizarse de al menos dos maneras.

En primer lugar, pueden utilizarse los múltiples conjuntos de constantes de calibración para determinar el número de ciclos de trabajo que deberán aplicarse durante la secuencia de pulsos para obtener la exactitud y precisión deseadas. Por ejemplo, si los valores de corriente obtenidos a partir de las tres primeras excitaciones indican una alta concentración de glucosa, tal como >150 o 200 mg/dL, el sistema de sensor puede terminar el análisis pronto, tal como después de la 4ª excitación mostrada en la figura 11. De este modo, puede acortarse sustancialmente el tiempo requerido para el análisis. Tal acortamiento es posible debido a la imprecisión a altas concentraciones de glucosa es normalmente menor que a concentraciones de glucosa inferiores. Por el contrario, si los valores de corriente obtenidos a partir de las tres primeras excitaciones indican una baja concentración de glucosa, tal como ≤150 o 100 mg/dL, el sistema de sensor puede extender el análisis a más de 5 o 7 excitaciones. Por tanto, puede aumentarse la exactitud y/o precisión del análisis incluyendo 5 o más ciclos de trabajo.

En segundo lugar, pueden utilizarse los múltiples conjuntos de constantes de calibración para aumentar la exactitud y/o precisión del análisis promediando. Por ejemplo, si el tiempo de medición de la glucosa objetivo es de 17,15 segundos, pueden utilizarse las corrientes a 10,65, 13,9 y 17,15 segundos para calcular las concentraciones de glucosa utilizando las pendientes e intercepciones de las líneas de calibración correspondientes; por tanto, $G_{10,65} = (i_{10,65} - Int_{10,65})/Pendiente_{10,65}$, $G_{13,9} = (i_{13,9} - Int_{13,9})/Pendiente_{13,9}$, y $G_{17,15} = (i_{17,15} - Int_{17,15})/Pendiente_{17,15}$. En teoría, estos tres valores de glucosa serán equivalentes, difiriendo sólo en variaciones aleatorias. Por tanto, los valores de glucosa $G_{10,65}$, $G_{13,9}$ y $G_{17,15}$ pueden promediarse y puede calcularse el valor de glucosa final de $(G_{10,65} + G_{13,9} + G_{17,15})/3$. El promediado de los valores de las líneas de calibración puede proporcionar una reducción del ruido a la tasa de $1/\sqrt{3}$).

Un beneficio inesperado de las secuencias de pulsos de voltamperometría controlada que incluyen excitaciones relativamente cortas y relajaciones relativamente largas, tal como las mostradas en la figura 6C, es la capacidad para simplificar la calibración. Aunque los múltiples conjuntos de constantes de calibración que pueden obtenerse a partir de los perfiles dinámicos y de contorno pueden proporcionar una ventaja para la exactitud del análisis, una secuencia de pulsos tal como se ilustra en la figura 6C, puede proporcionar una exactitud similar a la obtenida utilizando múltiples conjuntos de constantes de calibración a partir de un único conjunto de constantes de calibración. Este efecto puede observarse en los perfiles de contorno de la figura 11 y las líneas de calibración resultantes en la figura 14.

Este aumento inesperado de la exactitud puede ser atribuible a los tiempos de relajación relativamente largos en comparación con las relajaciones cortas. En un aspecto, se prefieren relaciones de tiempo de excitación/relajación (ERT) de 0,3 a 0,2, siendo más preferibles relaciones de ERT de 0,27 a 0,22. Por ejemplo, puede preferirse una secuencia de pulsos de voltamperometría controlada con una relación de ERT de 0,25 (0,8 segundos/3,2 segundos), tal como se ilustra en la figura 6C, frente a un pulso con una relación de ERT mayor de 0,3, tal como la secuencia de pulsos de la figura 6B con una relación de ERT de 0,56 (1,4 segundos/2,5 segundos). Sin tener en cuenta ninguna teoría particular, los tiempos de relajación relativamente largos pueden proporcionar un estado en el que la velocidad de consumo promedio de la especie medible durante la excitación se equilibra mediante la velocidad de suministro de la especie medible que se difunde en la DBL. De este modo, los múltiples conjuntos de constantes de calibración pueden convertirse en un único conjunto y la conversión de los datos registrados a una concentración de analito puede simplificarse llevando a cabo el proceso de promediado en los datos de corriente registrados antes de determinar la concentración de analito.

Pueden utilizarse los perfiles de corriente dinámica proporcionados por los múltiples ciclos de trabajo para determinar si la tira de sensor se ha llenado de manera insuficiente con la muestra, permitiendo así que el usuario añada muestra adicional a la tira de sensor. Además de los electrodos de trabajo y los contraelectrodos, los sistemas de sensor convencionales pueden determinar una condición de llenado insuficiente a través del uso de un tercer electrodo o par de electrodos; sin embargo, el tercer electrodo o par de electrodos añade complejidad y coste al sistema de sensor.

Los sistemas convencionales de dos electrodos pueden reconocer que un análisis es “malo”, pero pueden no determinar si la razón ara el análisis fallido fue el llenado insuficiente o una tira de sensor defectuosa. La capacidad para determinar si un llenado insuficiente ha provocado el fallo del análisis es beneficiosa porque puede corregirse añadiendo muestra adicional a la misma tira de sensor y repitiendo el análisis, evitando así que se deseche una tira válida.

La figura 15 muestra los voltamperogramas cíclicos obtenidos a partir de una tira de sensor con un llenado insuficiente, mientras que la figura 8A muestra una serie de siete voltamperogramas cíclicos obtenidos con una secuencia de pulsos de voltamperometría controlada a partir de una tira de sensor llenada de manera normal. En ambos casos, la velocidad de barrido fue de 1 V/s. Aunque la muestra de la figura 8A no tenía glucosa y la muestra utilizada para la figura 15 incluía 400 mg/dL de glucosa, los valores de corriente obtenidos a partir de la tira con un llenado insuficiente con la concentración de glucosa de 400 mg/dL fueron mucho menores que los de la tira con un llenado normal sin glucosa. Por tanto, puede determinarse por el segundo ciclo de trabajo de la secuencia de pulsos que las corrientes obtenidas son menores que un valor seleccionado anteriormente y que la tira de sensor se ha llenado de manera insuficiente. Por ejemplo, para el sistema de la figura 15, valores de corriente iniciales menores de 0 significan que la tira de sensor se ha llenado de manera insuficiente.

De este modo, las secuencias de pulsos de voltamperometría controlada de la presente invención permitieron la detección de llenado insuficiente en una tira de sensor de dos electrodos, una función que normalmente requiere un tercer electrodo para los sistemas de sensor convencionales. Además, la determinación del llenado insuficiente puede realizarse en menos de 5 segundos, proporcionando tiempo para que el dispositivo de medición indique al usuario, por ejemplo enviando una señal a un dispositivo emisor de luz o una pantalla, que añada más muestra a la tira.

Un problema común para la exactitud de los procedimientos de análisis basados en tiras es que los reactivos, especialmente la enzima, se degradan con el tiempo. Uno de los efectos de la degradación enzimática es un cambio en los valores de calibración, y por tanto la precisión y/o exactitud del análisis.

Pueden utilizarse los perfiles de corriente dinámica proporcionados por los múltiples ciclos de trabajo de la presente invención para determinar el contenido de agente ionizante activo de tiras de sensor envejecidas, en las que la especie ionizante puede haberse degradado. El conocer la cantidad de agente ionizante disponible para reaccionar con el analito puede permitir la identificación de tiras de sensor defectuosas y la corrección del valor de concentración de analito para proporcionar la exactitud y precisión deseadas al análisis. De este modo, puede obtenerse la exactitud y/o precisión del análisis, obtenidos a partir de tiras de sensor que tienen cantidades variables de agente ionizante activo debido a la variabilidad de fabricación o degradación del reactivo.

La figura 16A muestra gráficos de semiintegral de voltamperogramas cíclicos obtenidos a partir de cinco tiras de sensor con velocidades de barrido de 1 V/s para una muestra que incluye 100 mg/dL de glucosa y un 40% de hematocrito en ST. Aunque la figura 16A presenta voltamperogramas acíclicos, el procedimiento también puede aplicarse a barridos cíclicos. El agente ionizante utilizado en la capa de reactivo para la tiras de sensor fue la enzima glucosa oxidasa (GO). Cada tira de sensor incluyó un porcentaje de peso en seco del 1,7, 3,5, 5,3, 7 o 10 por ciento (peso/peso) de GO en relación con el peso en seco total del material que forma la capa de reactivo. Como se observa en la figura, los valores de corriente para los barridos directos aumentan en relación con aquellos para los barridos inversos a medida que aumenta el porcentaje de agente ionizante. Por tanto, puede utilizarse la diferencia entre los valores de corriente de barrido directo e inverso para determinar el porcentaje de agente ionizante activo presente en la capa de reactivo de la tira de sensor.

La figura 16B traza la relación de los valores de corriente si de barrido directo e inverso tomados al potencial 0,15 como una función de porcentaje de GO. Una vez determinada la correlación entre las relaciones de corriente directa e inversa y el porcentaje de GO activa, puede determinarse la cantidad de GO activa presente en una capa de reactivo a partir de los valores de corriente medidos para una tira. Puede determinarse la relación de los barridos directo e inverso antes o durante la parte de análisis del analito de la secuencia de pulsos, permitiendo así notificar al usuario si la tira está defectuosa.

Entonces puede utilizarse el contenido de agente ionizante activo real de la tira para modificar la pendiente de calibración a través de una relación tal como se muestra en la figura 16C. La figura 16C muestra una respuesta típica de la pendiente de la calibración de respuesta lineal de la tira de sensor como una función del contenido en GO (% de peso en seco). Este gráfico muestra que a medida que aumenta el contenido en GO, disminuye la pendiente de calibración. Por tanto, si se calcula el contenido real en GO de la capa de reactivo a partir de la figura 16B, puede calcularse la pendiente afectada de la tira de sensor basada en GO a partir del polinomio de 2º orden de la figura 16C utilizando el contenido en GO como entrada. Entonces puede utilizarse la pendiente de salida para corregir el valor de la concentración de glucosa en respuesta a diferentes cantidades de agente ionizante activo presente en la capa de reactivo de la tira de sensor. De este modo, puede reducirse la inexactitud y/o imprecisión que de otro modo resultaría de la degradación enzimática.

La figura 17 es una representación esquemática de un dispositivo de medición 1700 que incluye contactos 1720 en comunicación eléctrica con una circuitería eléctrica 1710 y una pantalla 1730. En un aspecto, el dispositivo de medición 1700 es portátil y está adaptado para sujetarse en la mano y para recibir una tira de sensor, tal como la tira 100 de la figura 1A. En otro aspecto, el dispositivo de medición 1700 es un dispositivo de medición de mano adaptado para recibir una tira de sensor e implementar secuencias de pulsos de voltamperometría controlada.

Los contactos 1720 están adaptados para proporcionar comunicación eléctrica con la circuitería eléctrica 1710 y los contactos de una tira de sensor, tal como los contactos 170 y 180 de la tira de sensor 100 mostrada en la figura 1B. La circuitería eléctrica 1710 puede incluir un cargador eléctrico 1750, un procesador 1740 y un medio de almacenamiento legible por ordenador 1745. El cargador eléctrico 1750 puede ser un potenciostato, generador de señales, o similar. Por tanto, el cargador 1750 puede aplicar una tensión a los contactos 1720 registrando al mismo tiempo la corriente resultante para funcionar como cargador-registrador.

El procesador 1740 puede estar en comunicación eléctrica con el cargador 1750, el medio de almacenamiento legible por ordenador 1745 y la pantalla 1730. Si el cargador no está adaptado para registrar corriente, el procesador 1740 puede estar adaptado para registrar la corriente en los contactos 1720.

El medio de almacenamiento legible por ordenador 1745 puede ser cualquier medio de almacenamiento, tal como una memoria de semiconductor, óptica, magnética, y similar. El medio de almacenamiento legible por ordenador 1745 puede ser un dispositivo de memoria fijo o un dispositivo de memoria extraíble, tal como una tarjeta de memoria extraíble. La pantalla 1730 puede ser analógica o digital, en un aspecto una pantalla LCD adaptada para mostrar una lectura numérica.

Cuando los contactos de una tira de sensor que contiene una muestra están en comunicación eléctrica con los contactos 1720, el procesador 1740 puede dirigir el cargador 1750 para aplicar una secuencia de pulsos de voltamperometría controlada a la muestra, iniciando así el análisis. El procesador 1740 puede iniciar el análisis en respuesta a la inserción de una tira de sensor, la aplicación de una muestra a una tira de sensor insertada previamente o en respuesta a una entrada de usuario, por ejemplo.

Las instrucciones con respecto a la implementación de la secuencia de pulsos de voltamperometría controlada pueden proporcionarse mediante código de software legible por ordenador almacenado en el medio de almacenamiento legible por ordenador 1745. El código puede ser código objeto o cualquier otro código que describa o controle la funcionalidad descrita en esta solicitud. Los datos obtenidos a partir de la secuencia de pulsos de voltamperometría controlada pueden someterse a uno o varios tratamientos de datos, incluyendo la determinación de velocidades de caída, constantes K, pendientes, intercepciones y/o temperatura de la muestra en el procesador 1740 y los resultados, tales como una concentración de analito corregida, pueden proporcionarse a la pantalla 1730. Como con las instrucciones respecto a la secuencia de pulsos, el tratamiento de datos puede implementarse mediante el procesador 1740 a partir de código de software legible por ordenador almacenado en el medio de almacenamiento legible por ordenador 1745.

Ejemplos

Ejemplo 1: recopilación de datos voltamperométricos

El voltamperograma cíclico de la figura 7A se obtuvo a partir de una estación de trabajo electroquímica de CH aplicando un potencial entre los electrodos de trabajo y los contraelectrodos de una tira de sensor que variaba linealmente en 1 V/s a una velocidad de barrido de 0,025 V/s. Se registró la corriente generada en el electrodo de trabajo durante la aplicación del potencial y se trazó como una función del potencial aplicado. Después de la excitación inicial de 0,8 segundos, el potenciostato abrió el circuito para proporcionar una relajación de 3,2 segundos. Se aplicaron seis excitaciones adicionales a la tira utilizando la secuencia de pulsos de la figura 6C. De este modo, se obtuvieron siete voltamperogramas acíclicos para concentraciones de glucosa de 0, 50, 100 y 400 mg/dL, como se muestra en las figuras 8A-8D, respectivamente.

Ejemplo 2: establecimiento de gráficos de contorno para múltiples tratamientos de datos

Las figuras 9A, 9B y 9C son gráficos de contorno de corrientes voltamperométricas sin procesar, tratamientos de datos de semiintegral y semiderivada, respectivamente. En la figura 9A, se tomaron valores de corriente sin procesar a 0,3 V de cada barrido directo para proporcionar siete puntos de datos. El gráfico de contorno resultante presenta los valores de corriente sin procesar como una función del tiempo puesto que cada ciclo de trabajo incluyó una excitación de 0,8 segundos seguida de una relajación de 3,2 segundos.

La figura 9B presenta un gráfico de contorno de los mismos datos voltamperométricos convertidos con procesamiento de datos de semiintegral según la ecuación (3) e implementado con las ecuaciones (5) y (6). El procesamiento de datos de semiintegral implementado fue el presente en el paquete de software de la estación de trabajo electroquímica de CH, versión 4.07, actualizado el 26 de abril de 2004, que acompaña a la estación de trabajo electroquímica de CH Instruments, modelo CHI 660A. Después del procesamiento de semiintegral, se tomaron las corrientes de semiintegral a 0,3 V de la parte inversa de cada barrido y se trazaron como función del tiempo, como se describió anteriormente con respecto a la figura 9A.

La figura 9C presenta un gráfico de contorno de los mismos datos voltamperométricos convertidos con procesamiento de datos de semiderivada según la ecuación (8). El procesamiento de datos de semiderivada utilizado fue el presente en el paquete de software de la estación de trabajo electroquímica de CH, versión 4.07,

actualizado el 26 de abril de 2004, que acompaña a la estación de trabajo electroquímica de CH Instruments, modelo CHI 660A. Después del procesamiento de semiderivada, se tomó el valor de corriente de pico de cada barrido y se trazó como función del tiempo, como se describió anteriormente con respecto a las figuras 9A y 9B. Por tanto, el eje Y de la figura 9C tiene la unidad de $uC/s^{3/2}$ para las corrientes de semiderivada.

Ejemplo 3: construcción de gráficos de calibración y determinación de la concentración de analito

Como se muestra en la figura 14, se formó un gráfico de calibración para el procedimiento de procesamiento de datos de semiintegral tomando las corrientes de semiintegral de las cuatro concentraciones de glucosa diferentes a 8,8, 12,8, 16,8 y 20,8 segundos de la figura 9B y trazando las corrientes como una función de concentración de glucosa en plasma YSI. Se determinaron las concentraciones de muestras de glucosa a partir del gráfico de calibración introduciendo la corriente procesada de semiintegral de una medición de muestras en un momento específico en la pendiente e intercepción de la línea de calibración.

De manera similar se generaron gráficos de calibración para los datos sin procesar y procesados con semiderivada. Entonces se utilizaron los gráficos de calibración para determinar las concentraciones de muestras de glucosa a partir de valores de corriente medidos sin procesar y procesados con semiderivada tomados en un momento específico.

Ejemplo 4: determinación de la concentración de analito a partir de múltiples conjuntos de calibración

La figura 4 muestra al menos cuatro líneas de calibración para tiempos de hasta 20,8 segundos. Para un tiempo de análisis de 16,8 segundos, se utilizaron los puntos de calibración a 8,8 y 12,8 segundos para calibrar los valores de glucosa. Los tres valores de glucosa calculados a partir de los puntos de calibración de 8,8, 12,8 y 16,8 segundos fueron el resultado de oxidaciones independientes separadas por el tiempo de relajación antes de la excitación de 8,8, 12,8 y 16,8 segundos. Aunque representan la misma concentración de glucosa de muestra, los valores de concentración difieren por el ruido experimental. Por tanto, promediando, $G = (G_{8,8} + G_{12,8} + G_{16,8})/3$, estos valores, se aumentó la relación señal a ruido del valor de concentración de glucosa final.

Aunque se han descrito varias formas de realización de la invención resultará evidente para los expertos en la técnica que son posibles otras formas de realización e implementaciones dentro del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento voltamperométrico para determinar la concentración de un analito en una muestra, que comprende:

aplicar una secuencia de pulsos a la muestra;

medir las corrientes resultantes a partir de la secuencia de pulsos; y

determinar la concentración del analito en la muestra a partir de al menos una de las corrientes resultantes,

caracterizado por que

la secuencia de pulsos incluye al menos dos ciclos de trabajo, incluyendo cada uno de los ciclos de trabajo una excitación y una relajación,

la excitación incluye barrido voltamperométrico, y

la relajación es de 0,1 a 3 segundos e incluye una reducción de corriente hasta al menos la mitad del flujo de corriente en el máximo de la excitación.

2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la relajación incluye una reducción del flujo de corriente hasta al menos un orden de magnitud menor que el flujo de corriente en el máximo de excitación.

3. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la relajación incluye una reducción de corriente hasta un estado de flujo de corriente cero.

4. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la excitación es de 0,1 a 1,5 segundos.

5. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la relajación es de 0,1 a 2 segundos.

6. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la secuencia de pulsos comprende al menos tres ciclos de trabajo en 90 segundos.

7. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la secuencia de pulsos comprende al menos tres ciclos de trabajo en 5 segundos.

8. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la determinación de la concentración del analito en la muestra se completa en de 2 a 50 segundos.

9. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la secuencia de pulsos comprende un pulso de lectura terminal.

10. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además aplicar la secuencia de pulsos a una tira de sensor (100) que incluye un contraelectrodo (185) y una capa de barrera de difusión (290) en un electrodo de trabajo (175).

11. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la muestra es un líquido que comprende un fluido biológico.

12. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el analito es glucosa.

13. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la excitación comprende un potencial que varía linealmente a una velocidad de al menos 2 mV/s.

14. El procedimiento según la reivindicación 13, en el que la excitación se selecciona del grupo que consiste en lineal, cíclica, acíclica, y combinaciones de las mismas.

15. El procedimiento según la reivindicación 13, en el que durante la excitación se registran al menos dos valores de corriente resultantes.

16. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, en el que las excitaciones son acíclicas y sustancialmente excluyen un pico de oxidación inverso o un pico de reducción inverso de una especie medible que responde a la concentración del analito en la muestra.

17. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, en el que las excitaciones son acíclicas y terminan antes del inicio de un pico de corriente inversa.

18. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, en el que las excitaciones son acíclicas y sustancialmente excluyen picos de oxidación y reducción directos e inversos de una especie medible que responde a la concentración del analito en la muestra.

19. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, en el que las excitaciones son acíclicas y están sustancialmente dentro de una región de corriente con difusión limitada de un par redox.

20. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende además determinar al menos un perfil de contorno a partir de las corrientes resultantes.

21. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende además aplicar al menos un tratamiento de datos seleccionado del grupo que consiste en semiintegral, semiderivada y derivada a las corrientes resultantes.

22. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende además determinar una pluralidad de conjuntos de calibración a partir de las corrientes resultantes.

23. El procedimiento según la reivindicación 22, que comprende además determinar el número de ciclos de trabajo de la secuencia de pulsos a partir de la pluralidad de conjuntos de calibración.

24. El procedimiento según la reivindicación 22, en el que la determinación de la concentración del analito en la muestra comprende promediar múltiples valores de concentración obtenidos a partir de la pluralidad de conjuntos de calibración.

25. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 24, en el que una relación de tiempo de excitación/relajación de los ciclos de trabajo es de 0,3 a 0,2.

26. Un dispositivo de medición de mano (1700) adaptado para recibir una tira de sensor (100), para determinar la concentración de un analito en una muestra, que comprende:

al menos dos contactos (1720); y

una circuitería eléctrica (1710), en el que la circuitería eléctrica (1710) incluye un procesador (1740) en comunicación eléctrica con un cargador eléctrico (1750) y un medio de almacenamiento legible por ordenador (1745),

en el que el procesador (1740) puede hacerse funcionar para implementar una secuencia de pulsos desde el cargador eléctrico (1750) hasta los al menos dos contactos (1720),

en el que el procesador (1740) puede hacerse funcionar para medir al menos un perfil de corriente en los al menos dos contactos (1720), y

en el que el procesador (1740) puede hacerse funcionar para determinar una concentración de analito en la muestra en respuesta al al menos un perfil de corriente, caracterizado por que la secuencia de pulsos incluye al menos dos ciclos de trabajo, incluyendo cada uno de los ciclos de trabajo una excitación y una relajación,

la excitación incluye barrido voltamperométrico, y

la relajación es de 0,1 a 3 segundos e incluye una reducción de corriente hasta al menos la mitad del flujo de corriente en el máximo de la excitación.

27. El dispositivo (1700) según la reivindicación 26, en el que el procesador (1740) puede hacerse funcionar para aplicar al menos un tratamiento de datos seleccionado del grupo que consiste en semiintegral, semiderivada y derivada al perfil de corriente para determinar la concentración de analito en la muestra.

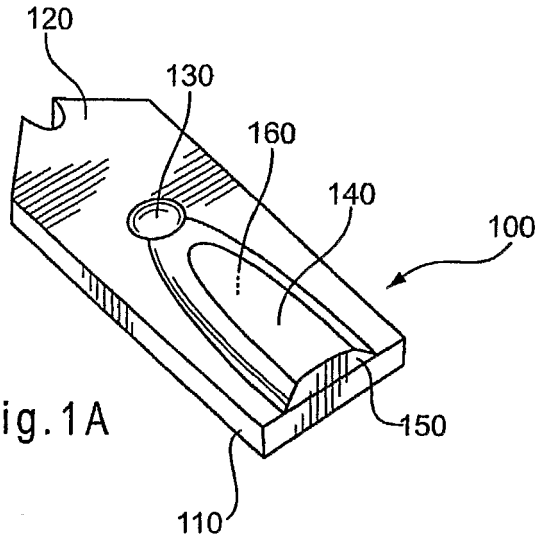

Fig.1A

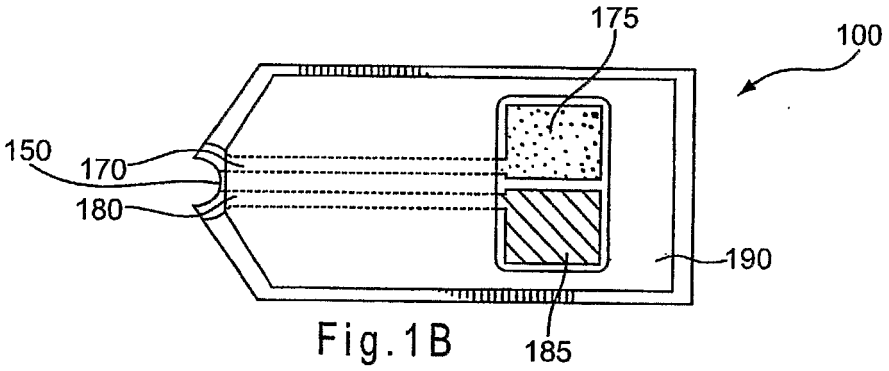

Fig.1B

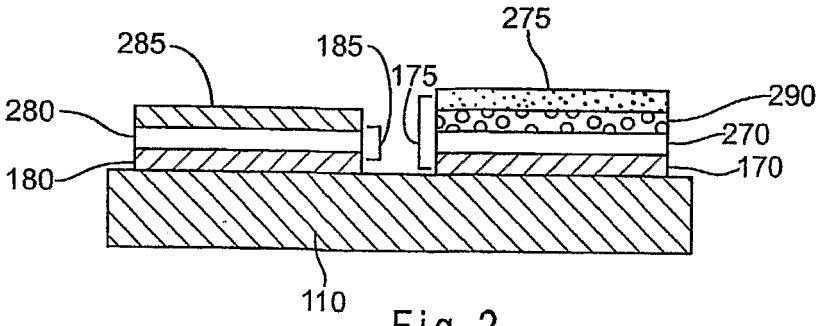

Fig.2

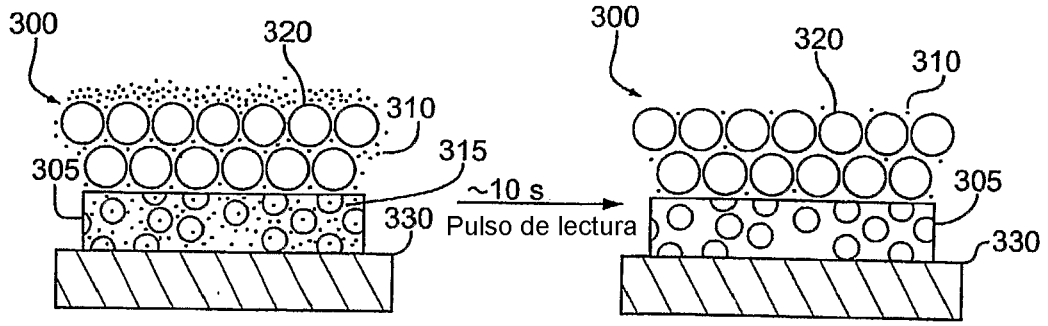
300
320
310
315
305
330
~10 s
Pulso de lectura
300
320
310
305
330

Fig.3A

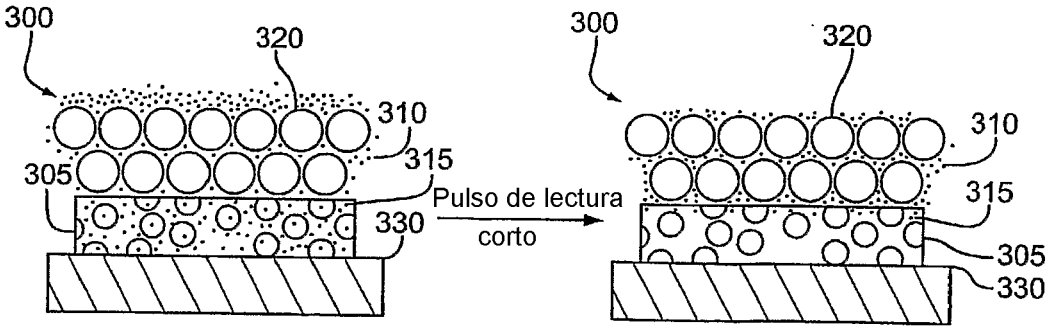
300
320
310
315
305
330
Pulso de lectura
corto
300
320
310
315
305
330

Fig.3B

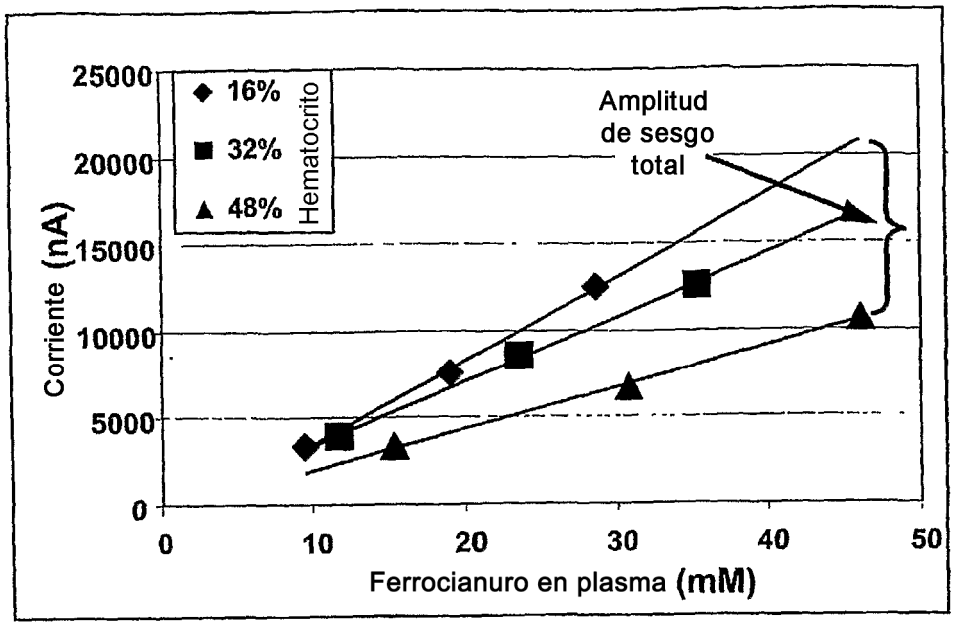
25000
20000
15000
10000
5000
0
Corriente (nA)
16%
32%
48%
Hematocrito
Amplitud
de sesgo
total
0
10
20
30
40
50
Ferrocianuro en plasma (mM)

Fig.4A

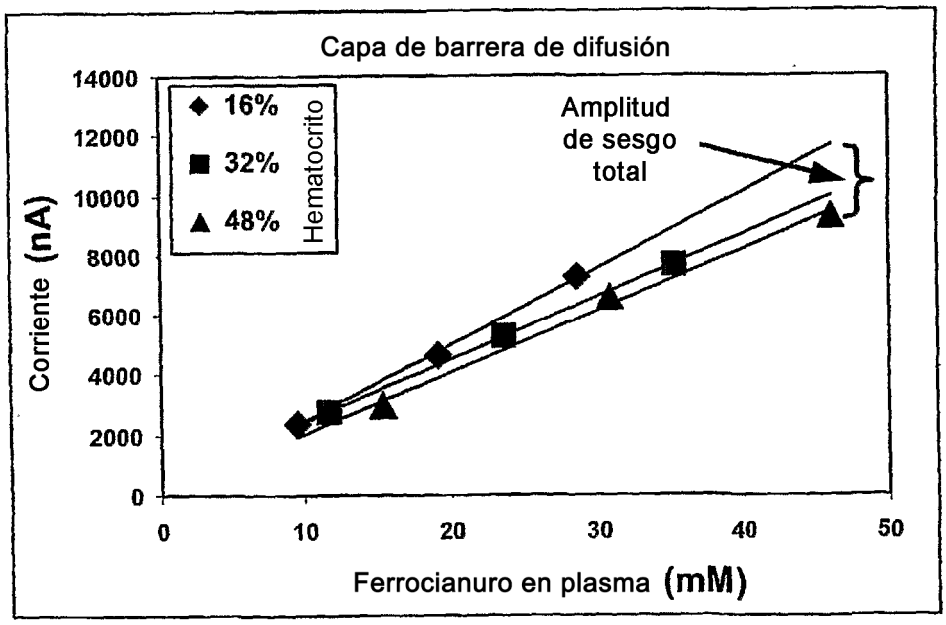
Capa de barrera de difusión
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Corriente (nA)
16%
32%
48%
Hematocrito
Amplitud
de sesgo
total
0
10
20
30
40
50
Ferrocianuro en plasma (mM)

Fig.4B

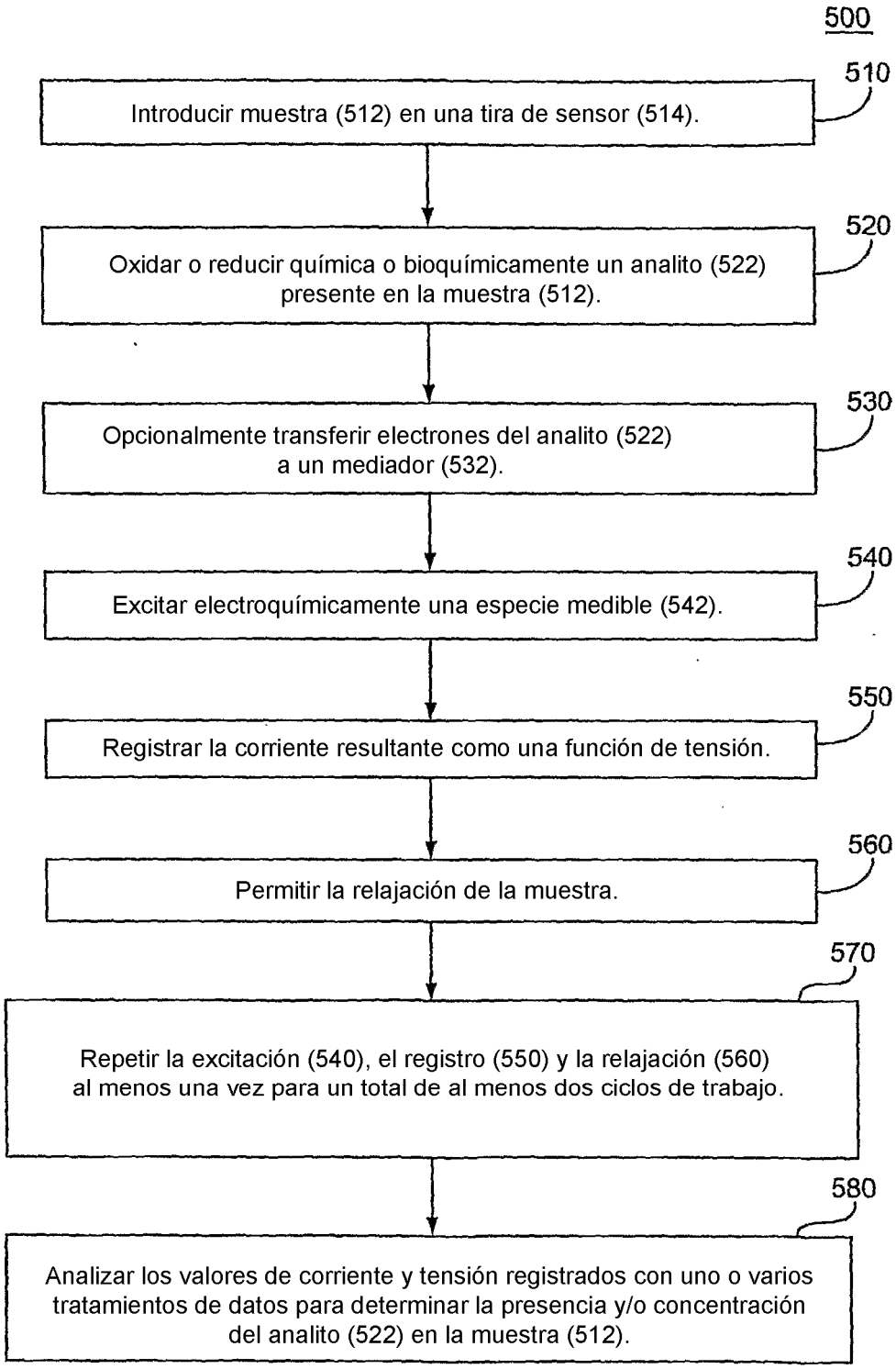
500
510
Introducir muestra (512) en una tira de sensor (514).
520
Oxidar o reducir química o bioquímicamente un analito (522) presente en la muestra (512).
530
Opcionalmente transferir electrones del analito (522) a un mediador (532).
540
Excitar electroquímicamente una especie medible (542).
550
Registrar la corriente resultante como una función de tensión.
560
Permitir la relajación de la muestra.
570
Repetir la excitación (540), el registro (550) y la relajación (560) al menos una vez para un total de al menos dos ciclos de trabajo.
580
Analizar los valores de corriente y tensión registrados con uno o varios tratamientos de datos para determinar la presencia y/o concentración del analito (522) en la muestra (512).

Fig.5

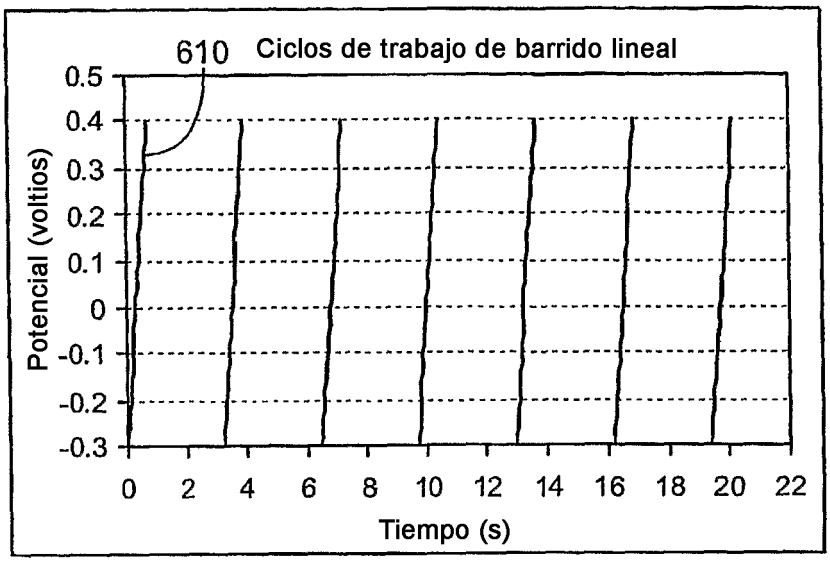
610
Ciclos de trabajo de barrido lineal
Potencial (voltios)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
-0.2
-0.3
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
Tiempo (s)

Fig.6A

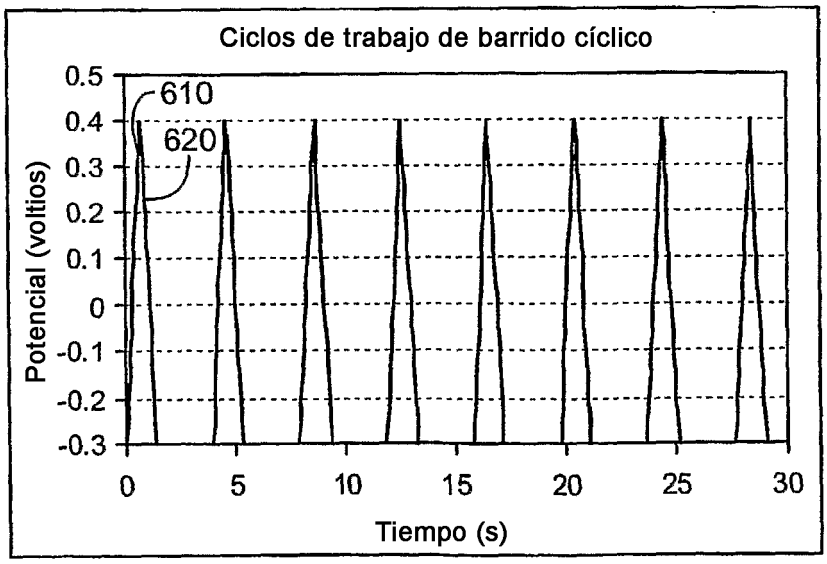
Ciclos de trabajo de barrido cíclico
610
620
Potencial (voltios)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
-0.2
-0.3
0
5
10
15
20
25
30
Tiempo (s)

Fig.6B

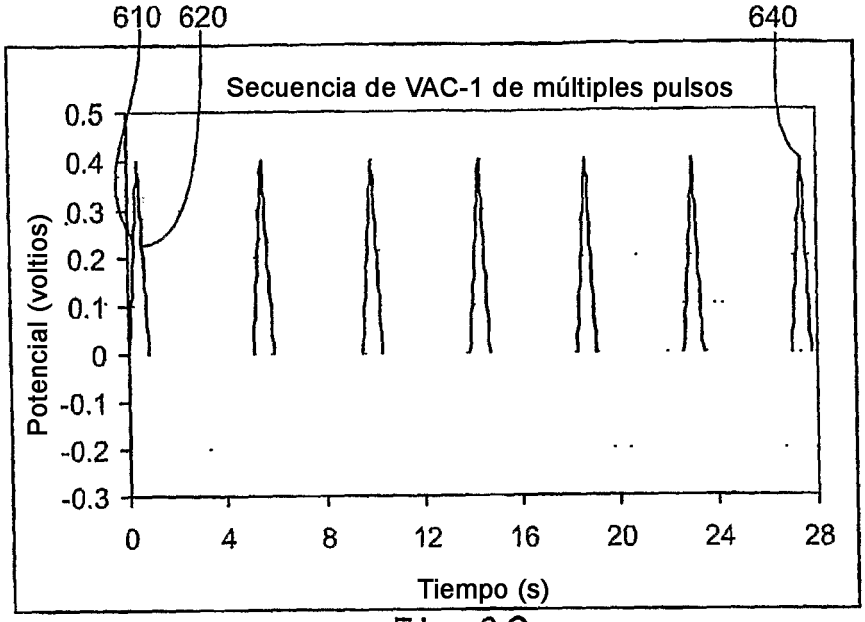
610
620
640
Secuencia de VAC-1 de múltiples pulsos
Potencial (voltios)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
-0.2
-0.3
0
4
8
12
16
20
24
28
Tiempo (s)

Fig.6C

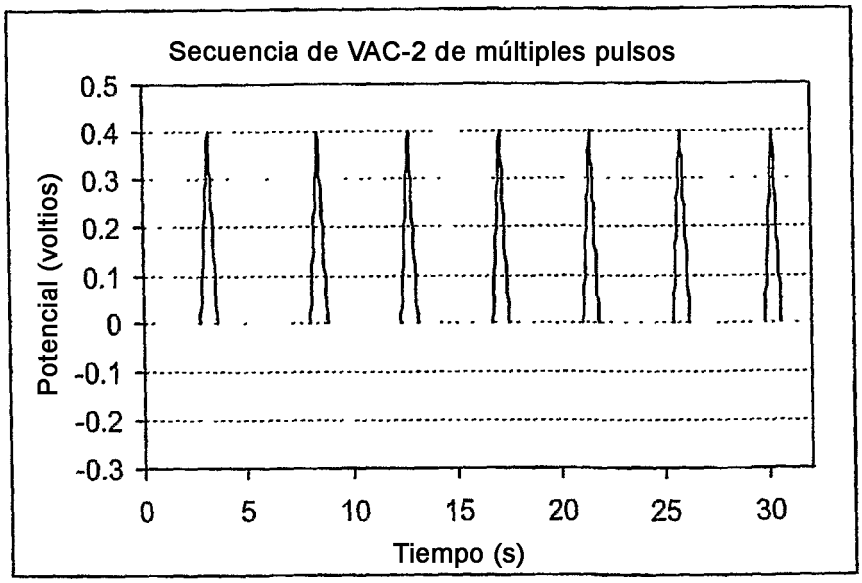
Secuencia de VAC-2 de múltiples pulsos
Potencial (voltios)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
-0.2
-0.3
0
5
10
15
20
25
30
Tiempo (s)

Fig.6D

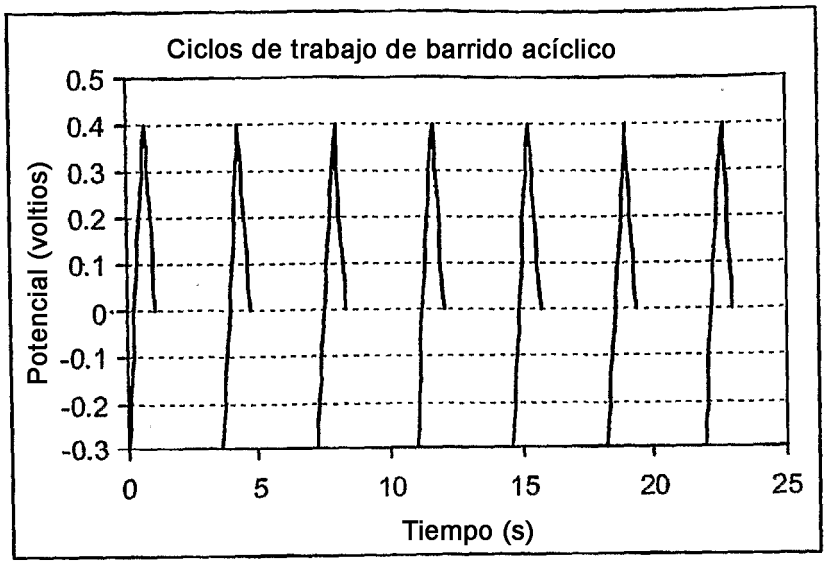
Ciclos de trabajo de barrido acíclico
Potencial (voltios)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
-0.2
-0.3
0
5
10
15
20
25
Tiempo (s)

Fig.6E

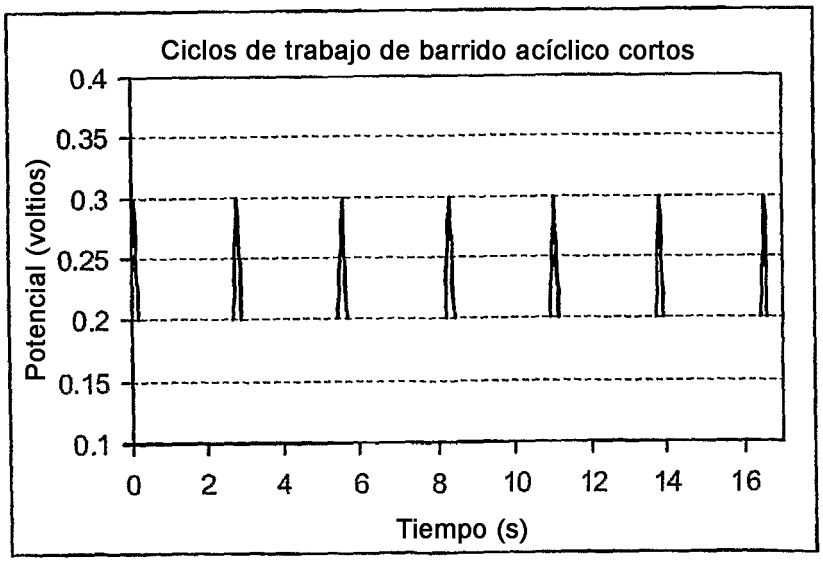
Ciclos de trabajo de barrido acíclico cortos
Potencial (voltios)
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Tiempo (s)

Fig.6F

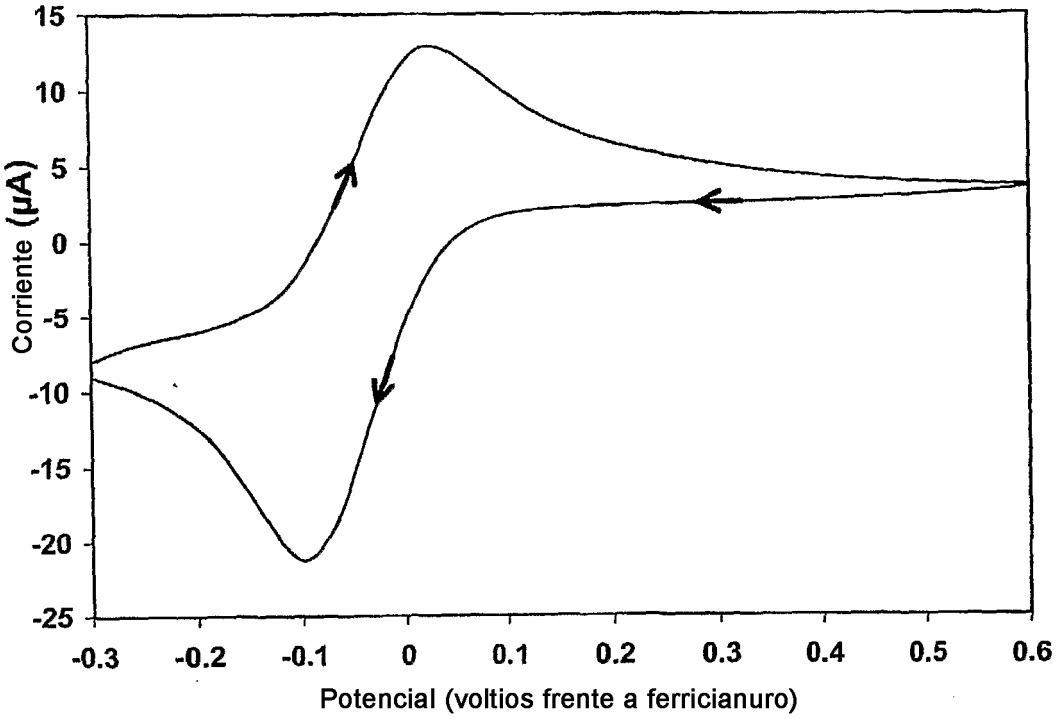
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
Corriente (µA)
-0.3
-0.2
-0.1
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
Potencial (voltios frente a ferricianuro)

Fig.7A

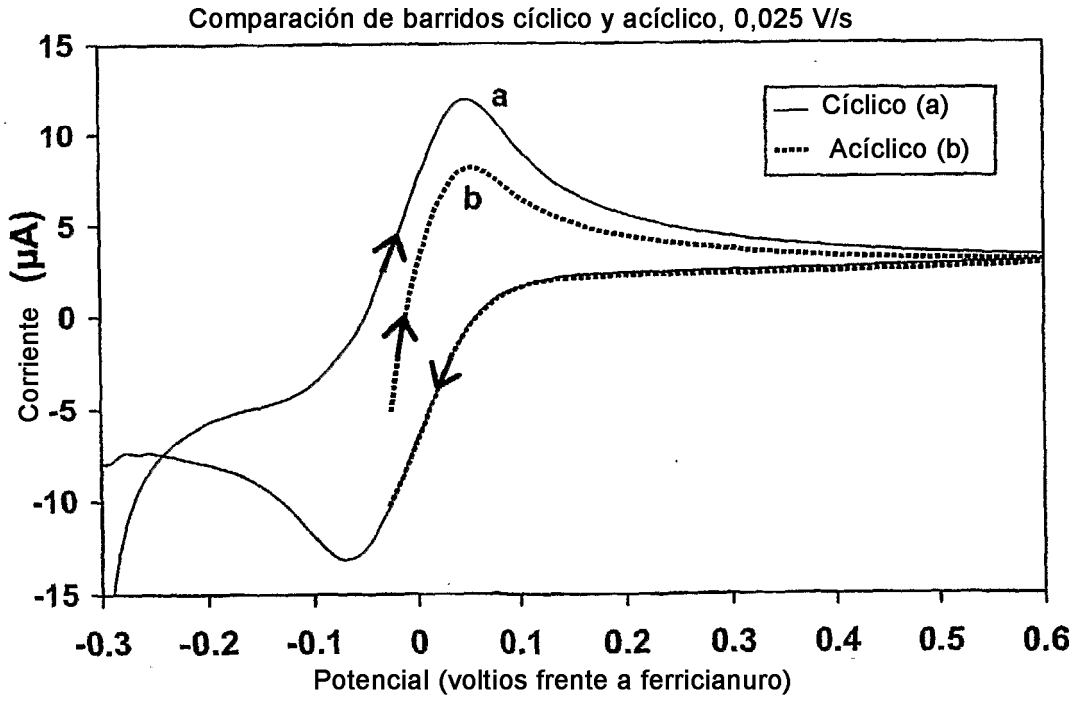
Comparación de barridos cíclico y acíclico, 0,025 V/s
Cíclico (a)
Acíclico (b)
a
b
15
10
5
0
-5
-10
-15
Corriente (µA)
-0.3
-0.2
-0.1
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
Potencial (voltios frente a ferricianuro)

Fig.7B

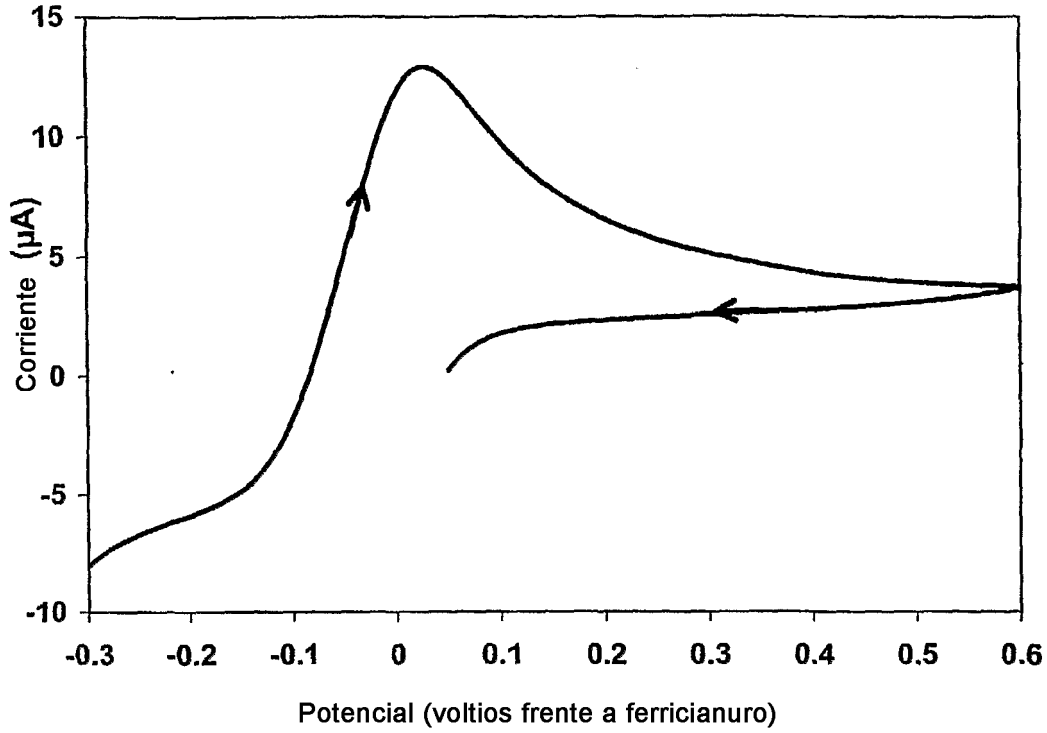
15
10
5
0
-5
-10
Corriente (µA)
-0.3
-0.2
-0.1
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
Potencial (voltios frente a ferricianuro)

Fig.7C

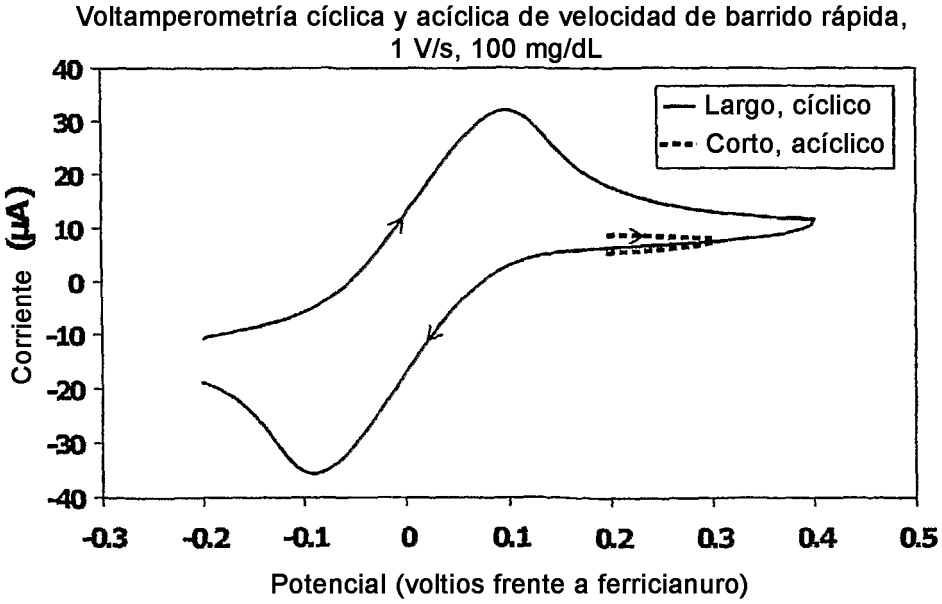
Voltamperometría cíclica y acíclica de velocidad de barrido rápida, 1 V/s, 100 mg/dL
Largo, cíclico
Corto, acíclico
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
Corriente (µA)
-0.3
-0.2
-0.1
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
Potencial (voltios frente a ferricianuro)

Fig.7D

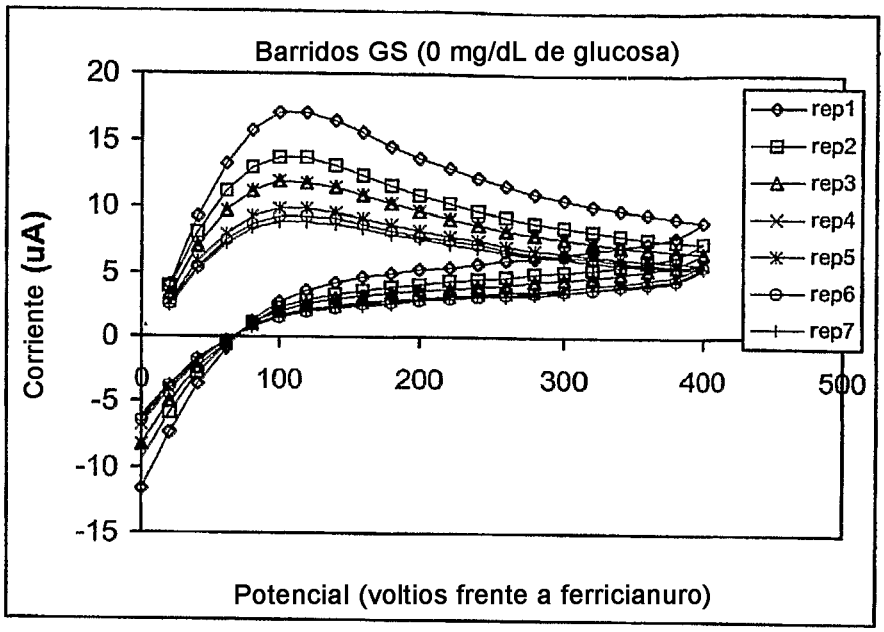
Barridos GS (0 mg/dL de glucosa)
Corriente (uA)
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
0
100
200
300
400
500
rep1
rep2
rep3
rep4
rep5
rep6
rep7
Potencial (voltios frente a ferricianuro)

Fig.8A

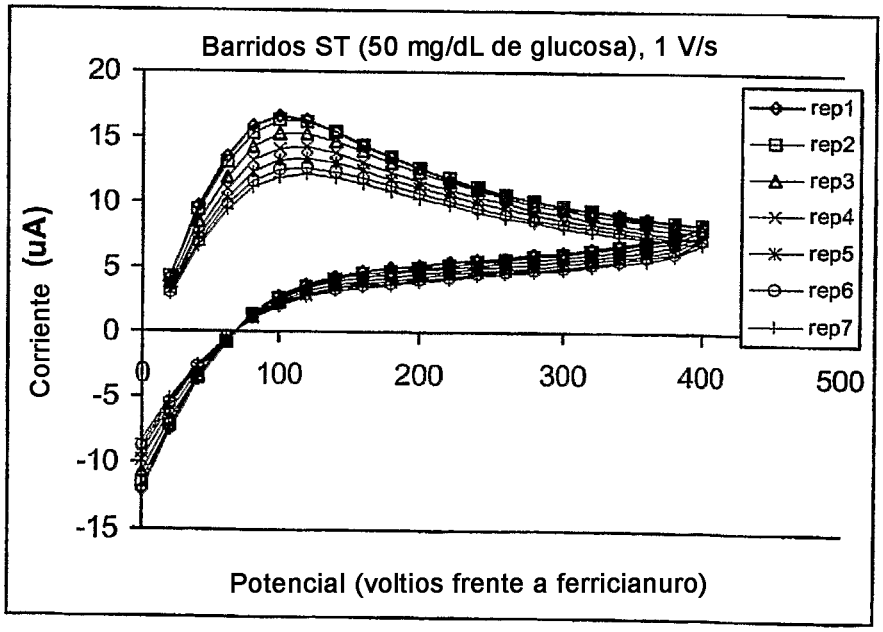
Barridos ST (50 mg/dL de glucosa), 1 V/s
Corriente (uA)
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
0
100
200
300
400
500
rep1
rep2
rep3
rep4
rep5
rep6
rep7
Potencial (voltios frente a ferricianuro)

Fig.8B

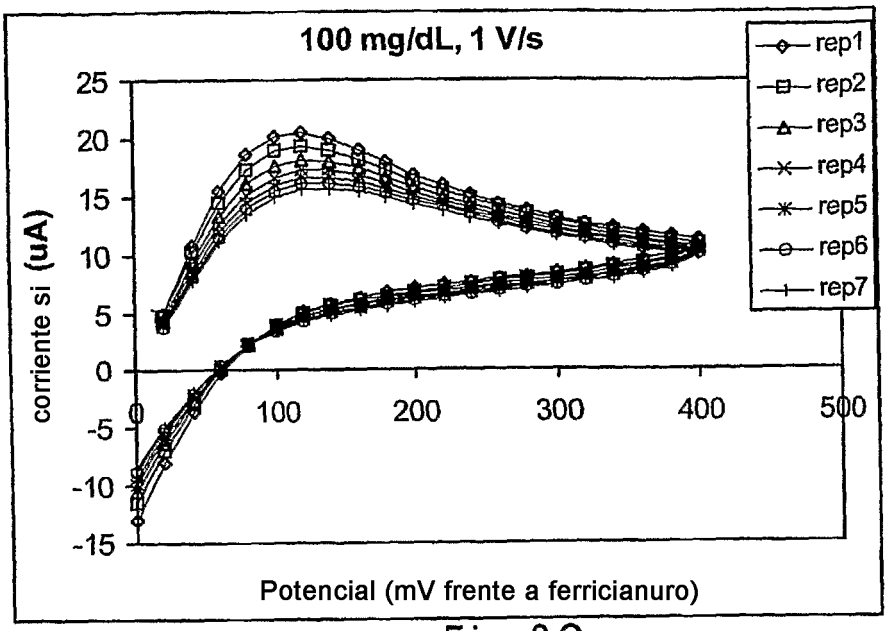
100 mg/dL, 1 V/s
corriente si (uA)
25
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
0
100
200
300
400
500
Potencial (mV frente a ferricianuro)
rep1
rep2
rep3
rep4
rep5
rep6
rep7

Fig.8C

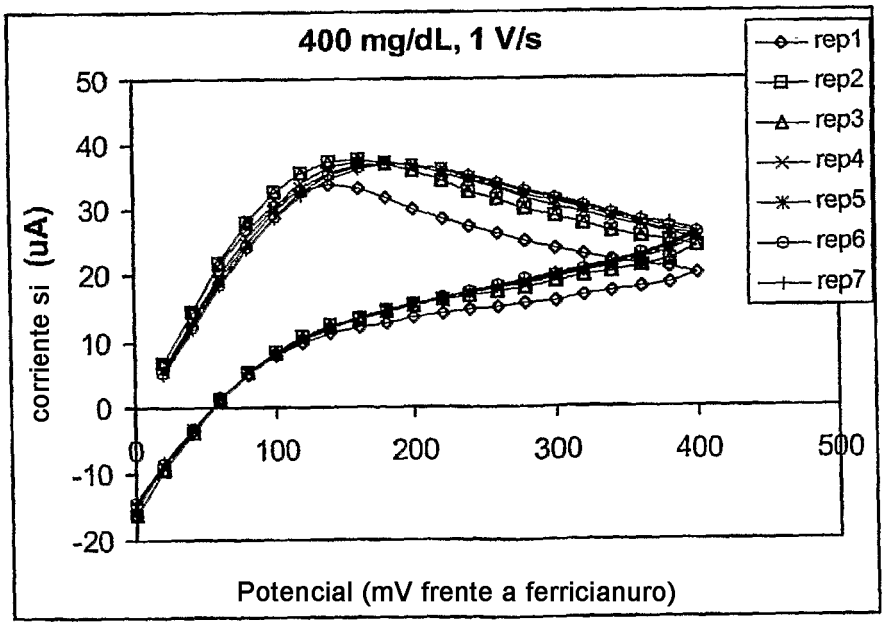
400 mg/dL, 1 V/s
corriente si (uA)
50
40
30
20
10
0
-10
-20
0
100
200
300
400
500
Potencial (mV frente a ferricianuro)
rep1
rep2
rep3
rep4
rep5
rep6
rep7

Fig.8D

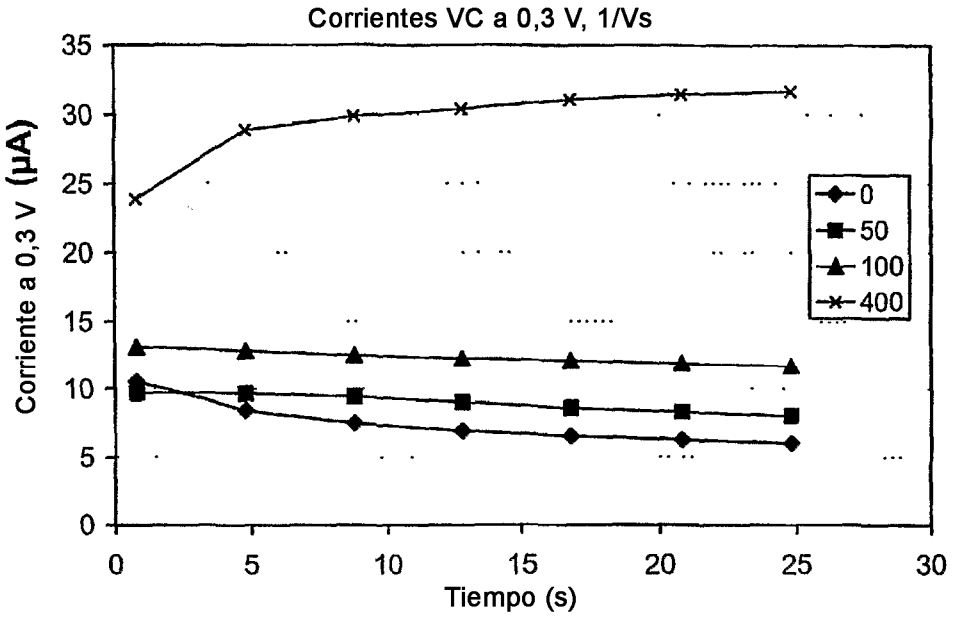
Corrientes VC a 0,3 V, 1/Vs
Corriente a 0,3 V (µA)
Tiempo (s)
0
50
100
400
0
5
10
15
20
25
30
35

Fig.9A

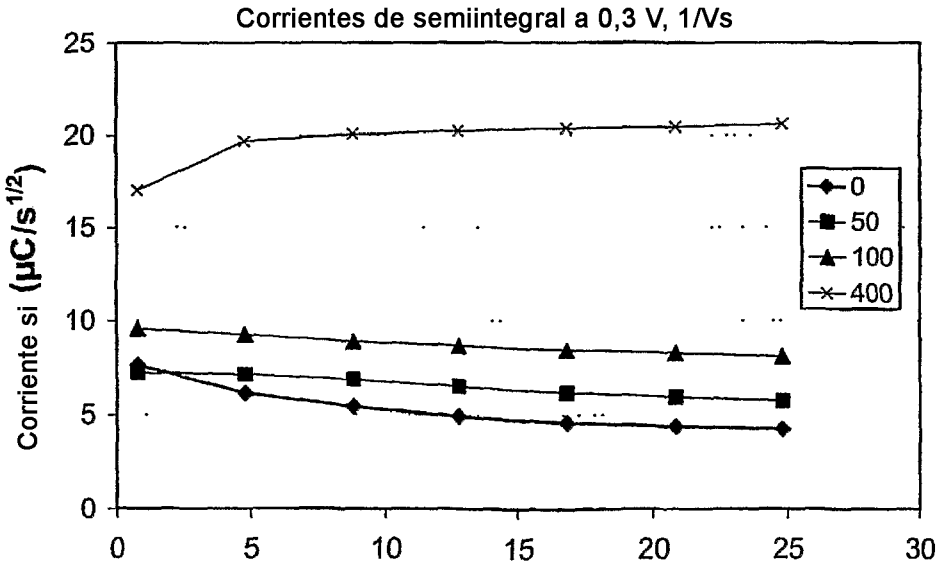
Corrientes de semiintegral a 0,3 V, 1/Vs
Corriente si (µC/s^1/2)
0
50
100
400
0
5
10
15
20
25
30

Fig.9B

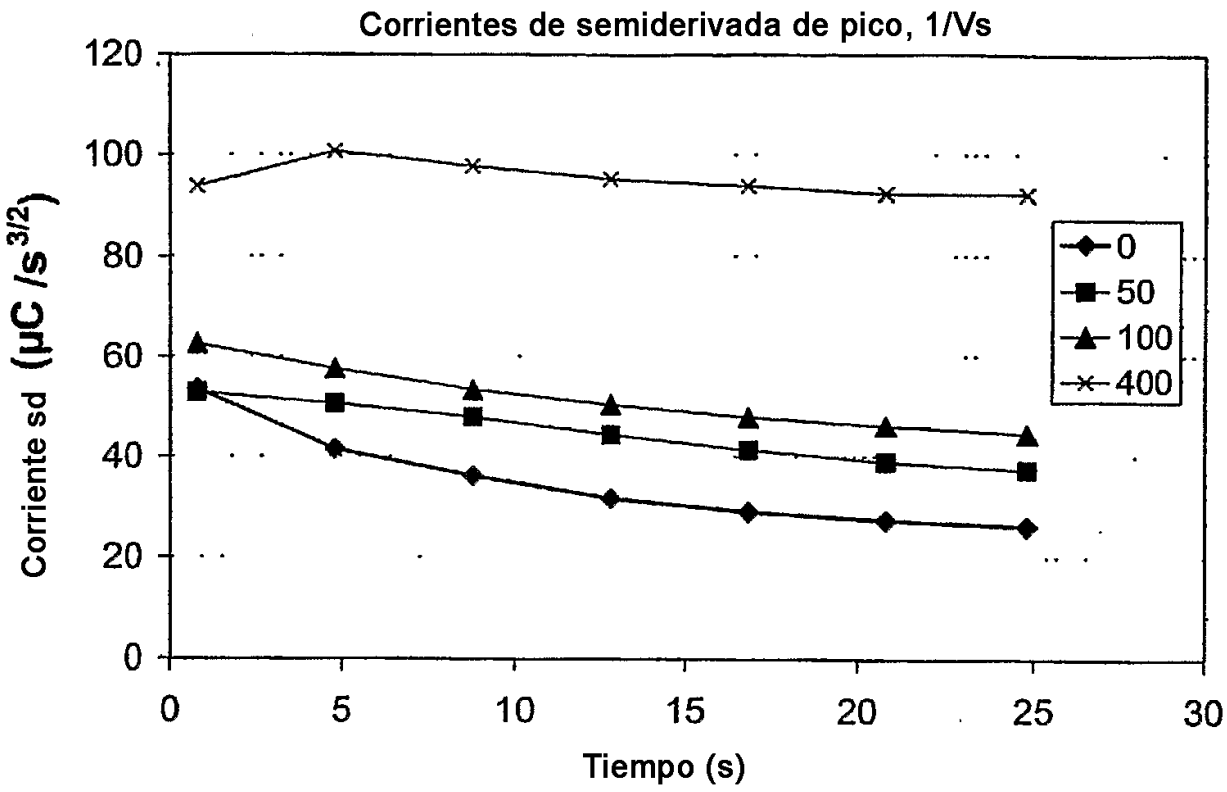
Corrientes de semiderivada de pico, 1/Vs
Corriente sd (µC /s^3/2)
120
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
Tiempo (s)
0
50
100
400

Fig.9C

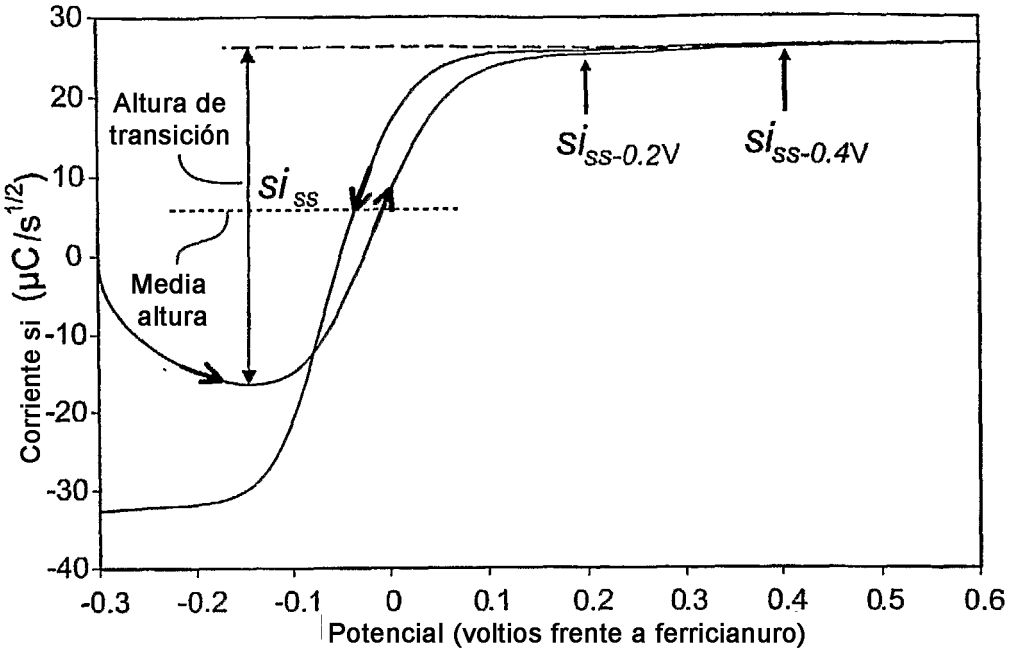

Fig.10A

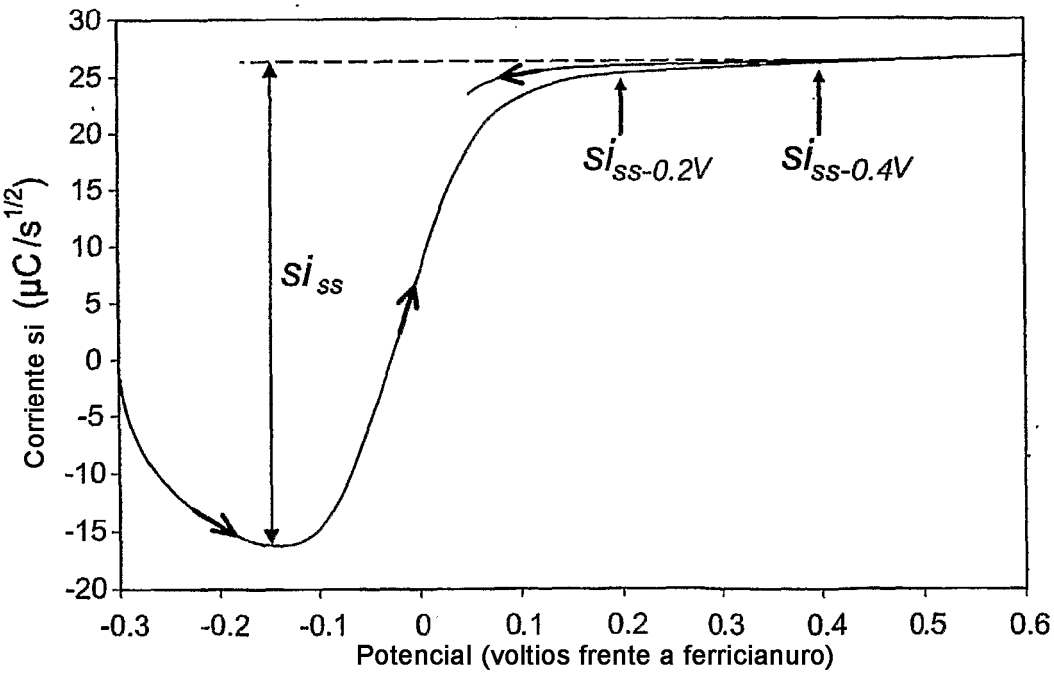

Fig.10B

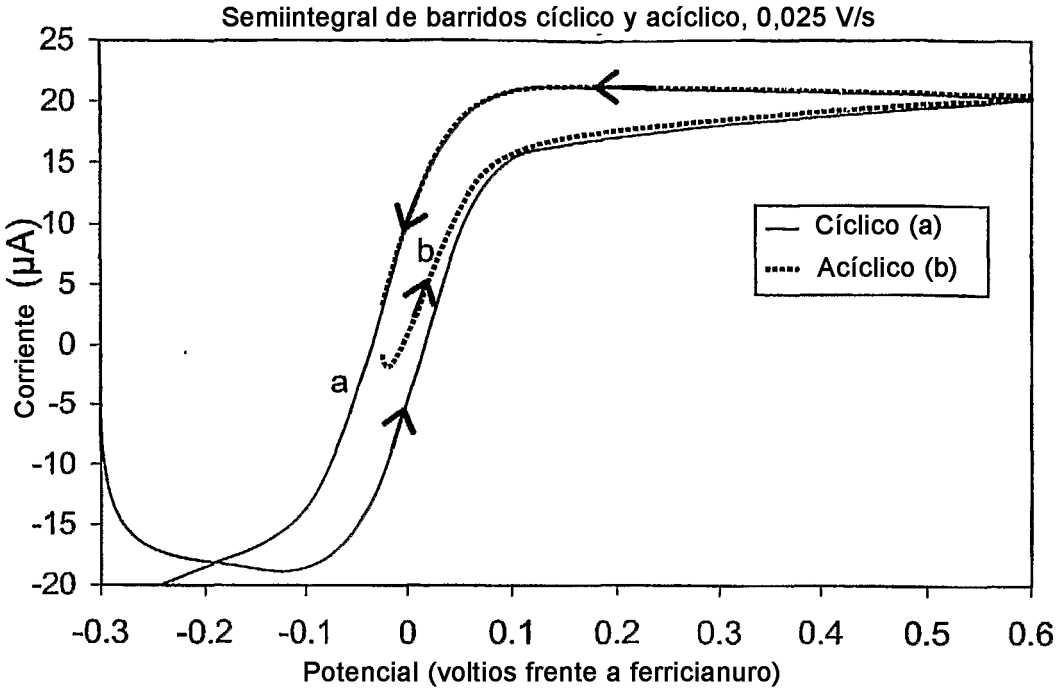

Fig.10C

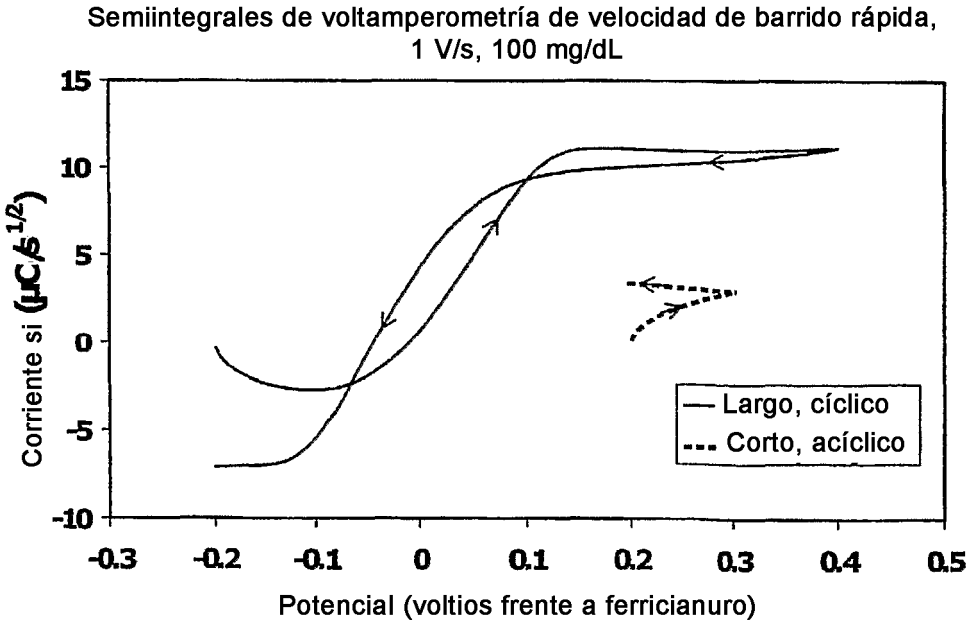

Fig.10D

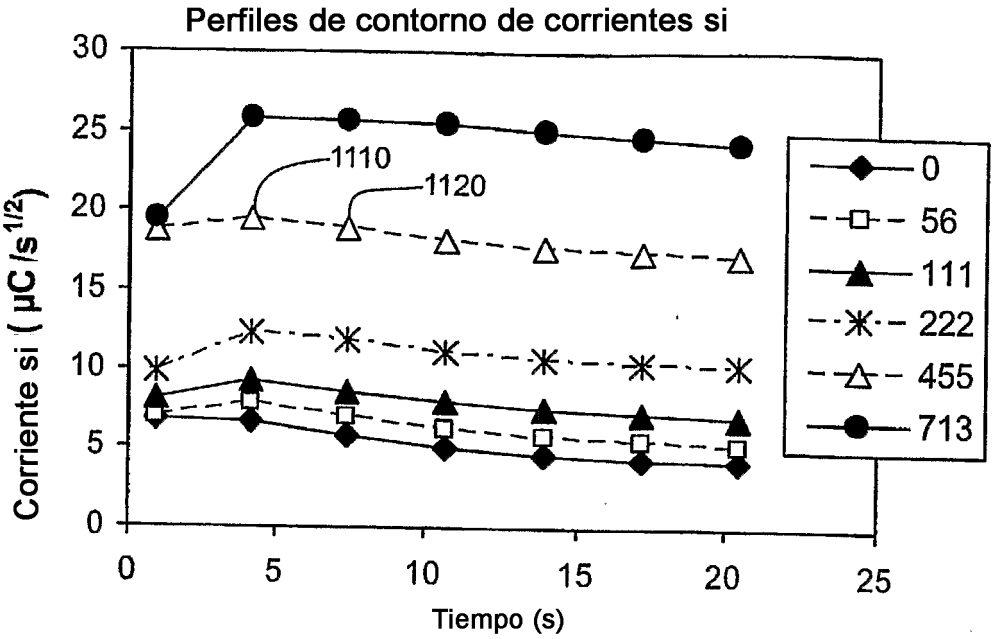

Fig.11

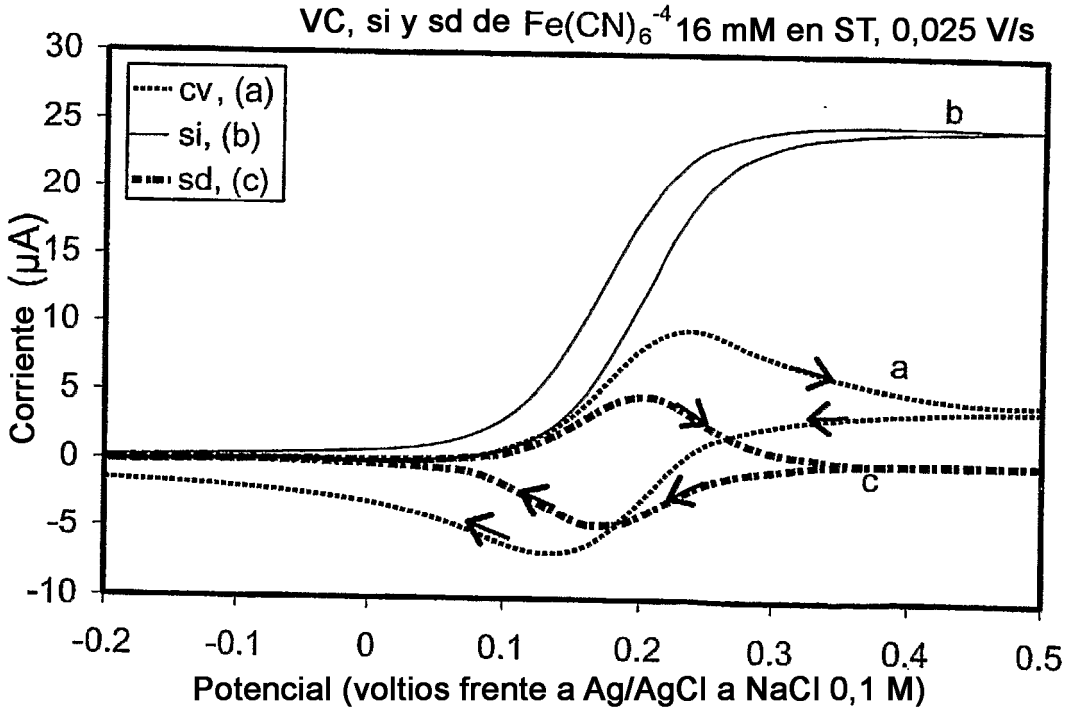

Fig.12A

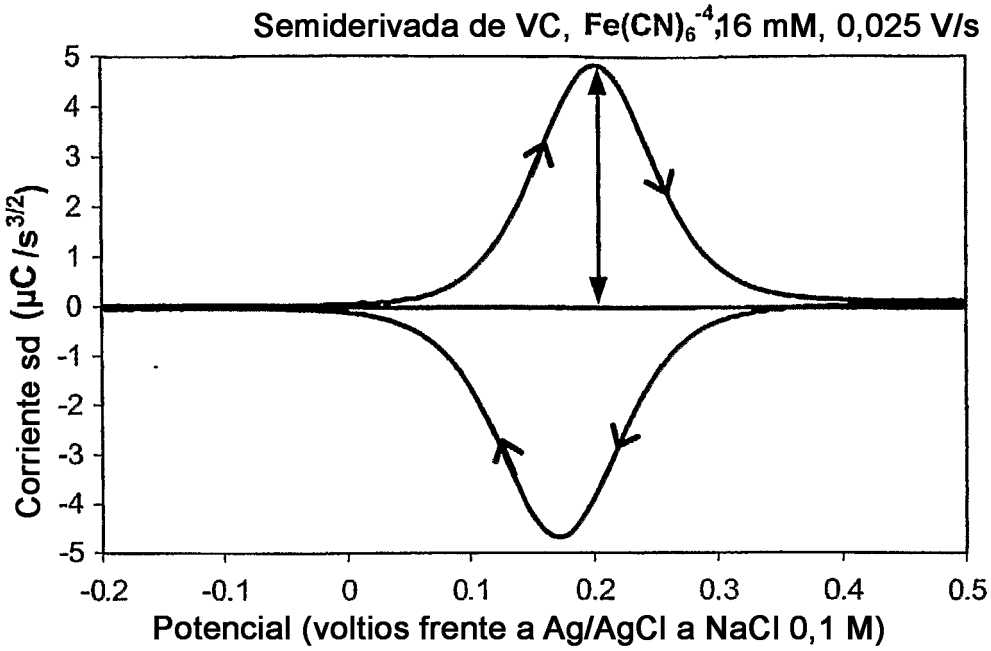

Fig.12B

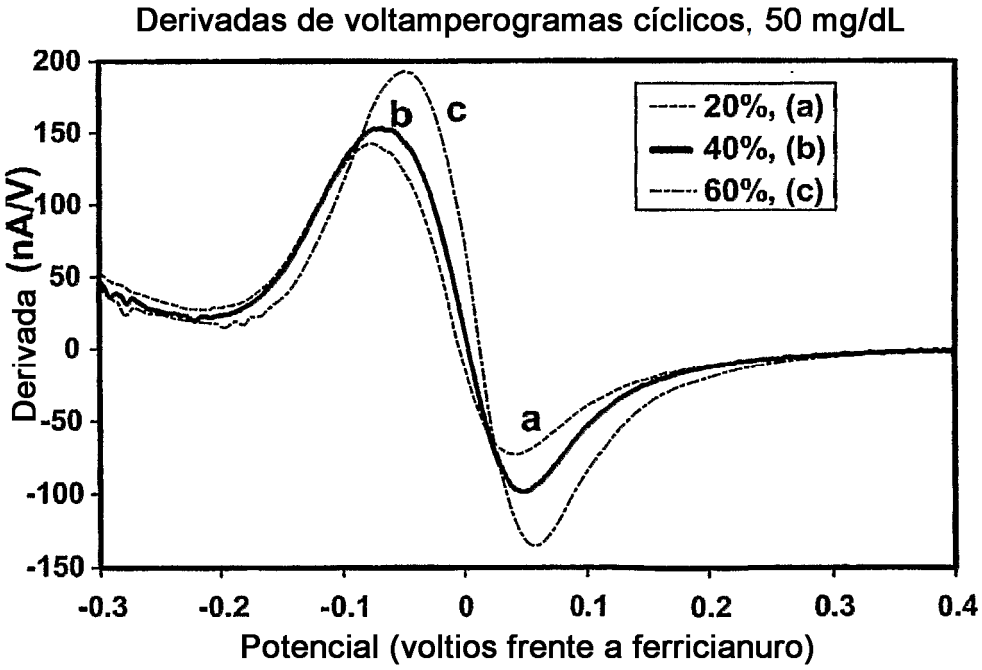

Fig.13A

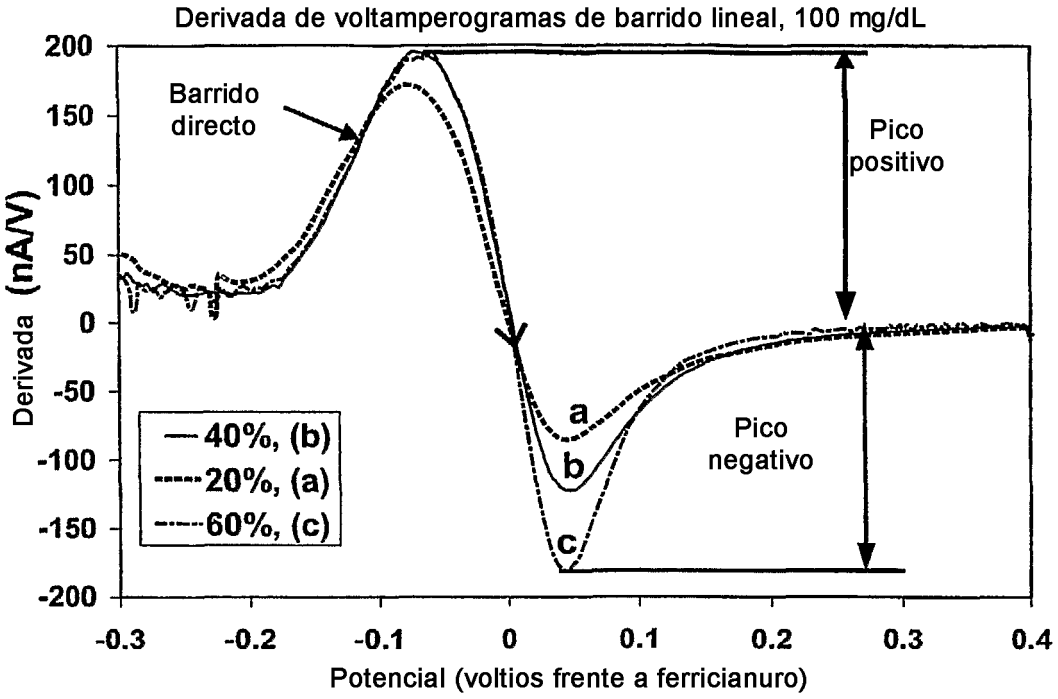

Fig.13B

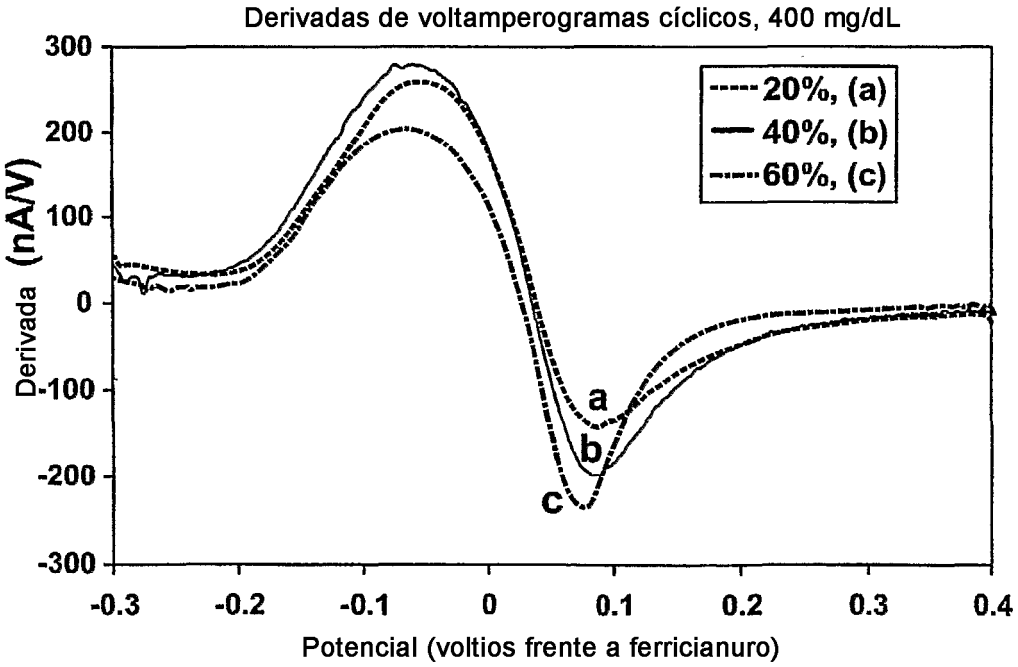

Fig.13C

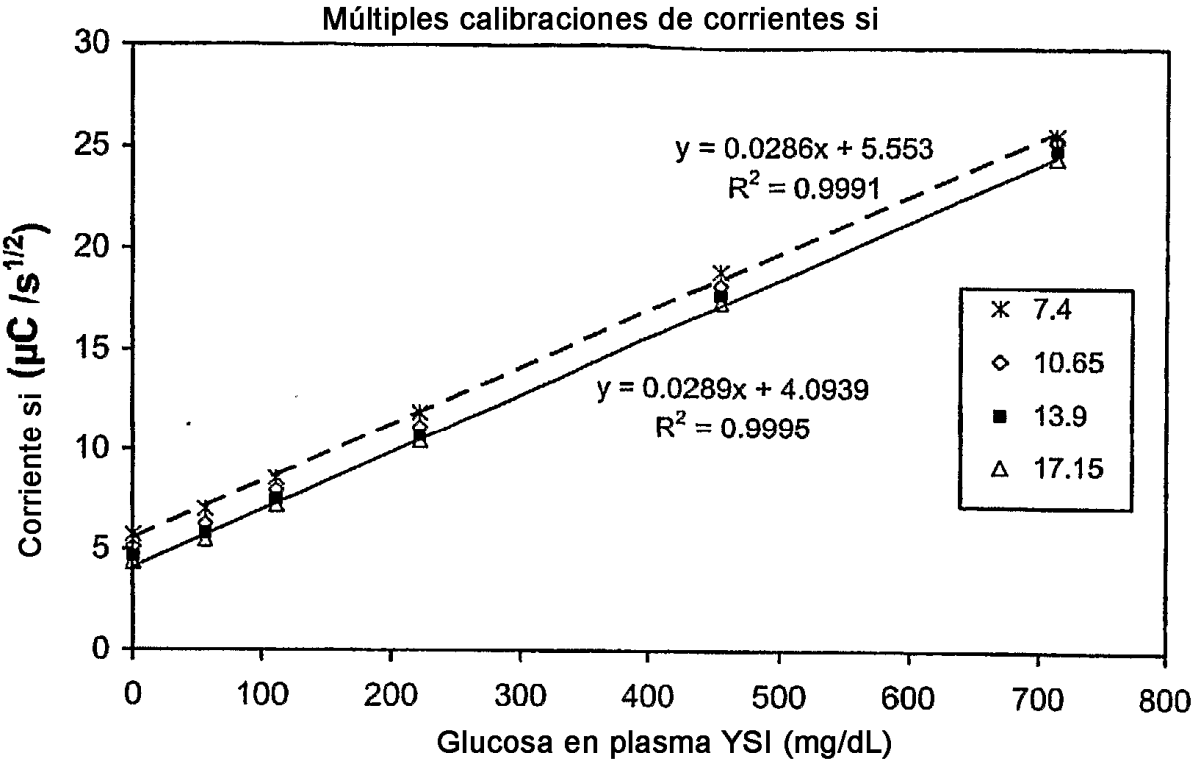
Múltiples calibraciones de corrientes si
y = 0.0286x + 5.553
R² = 0.9991
y = 0.0289x + 4.0939
R² = 0.9995
7.4
10.65
13.9
17.15
Corriente si (µC /s^1/2)
Glucosa en plasma YSI (mg/dL)
0
5
10
15
20
25
30
0
100
200
300
400
500
600
700
800

Fig.14

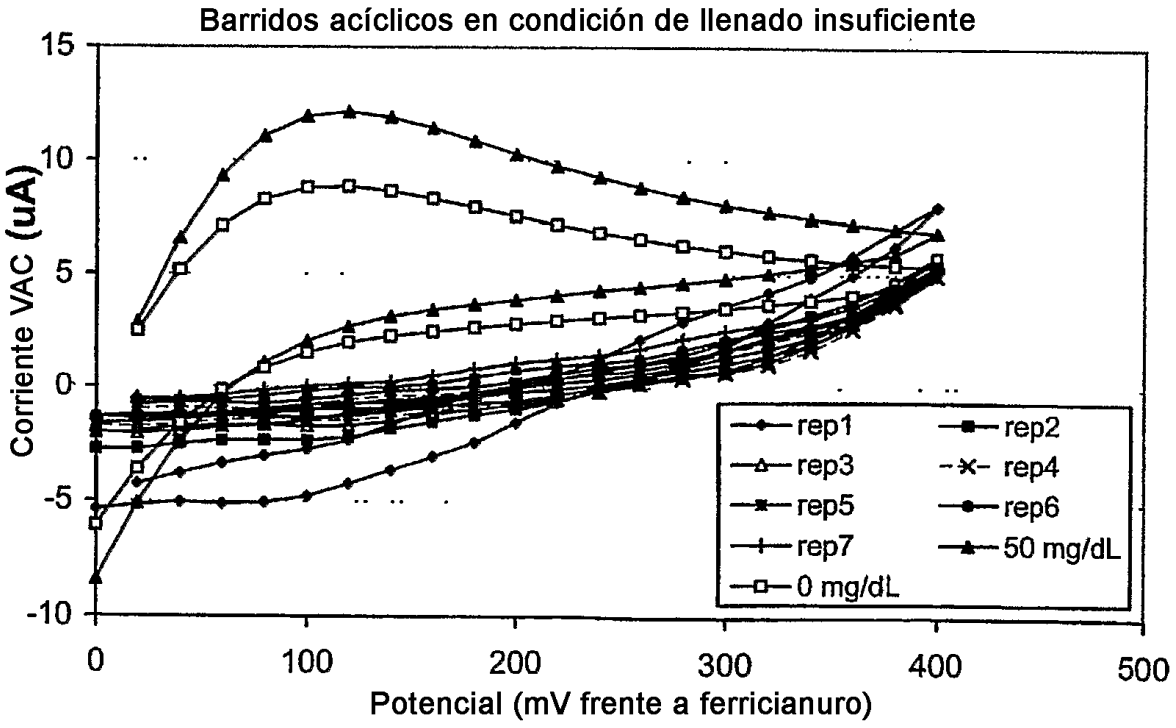
Barridos acíclicos en condición de llenado insuficiente
rep1
rep2
rep3
rep4
rep5
rep6
rep7
50 mg/dL
0 mg/dL
Corriente VAC (uA)
Potencial (mV frente a ferricianuro)
15
10
5
0
-5
-10
0
100
200
300
400
500

Fig.15

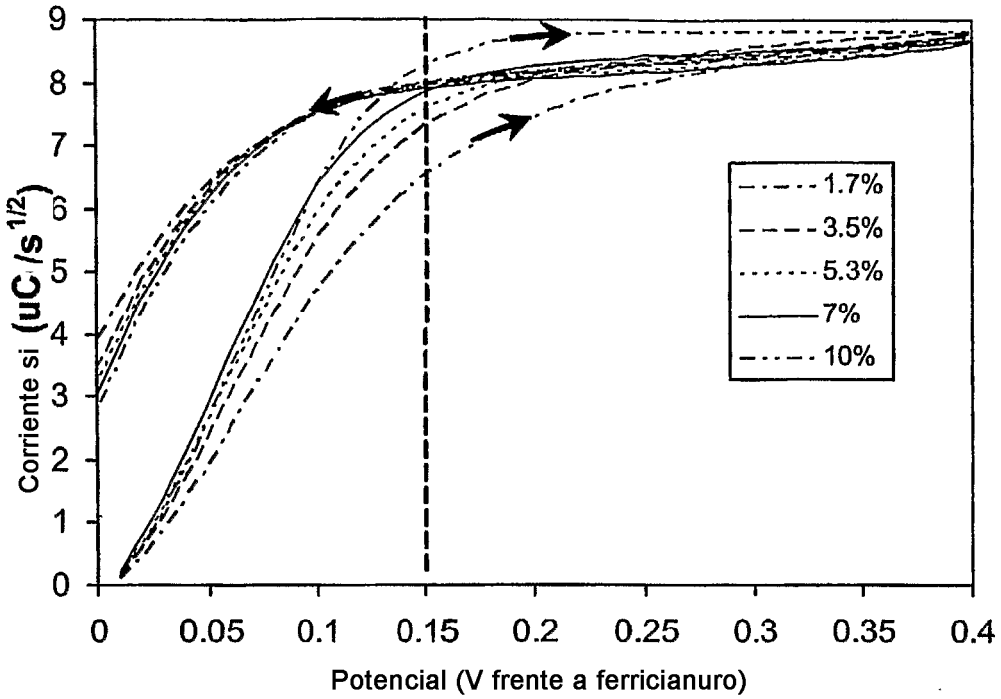

Fig.16A

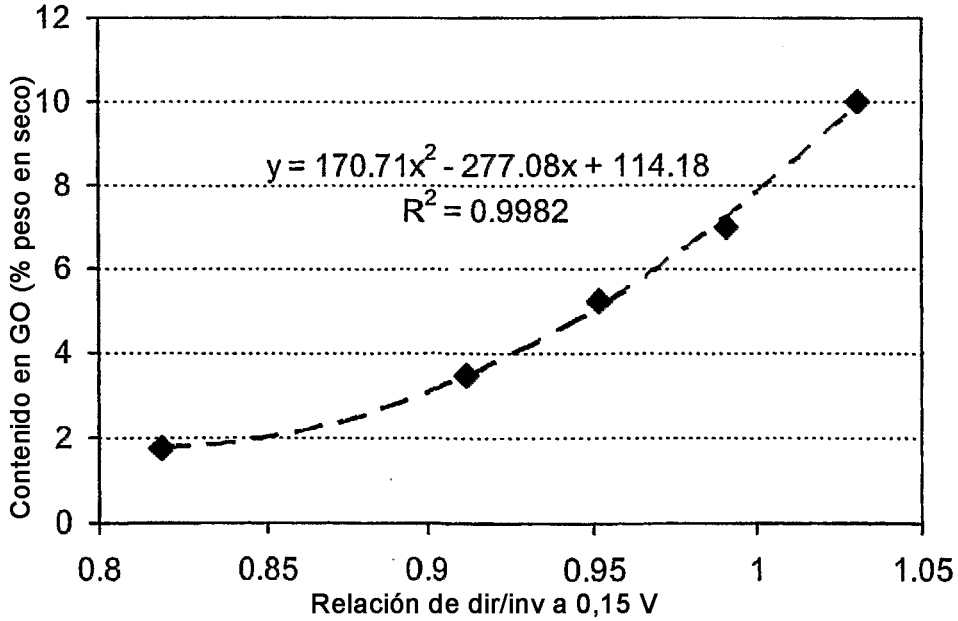

Fig.16B

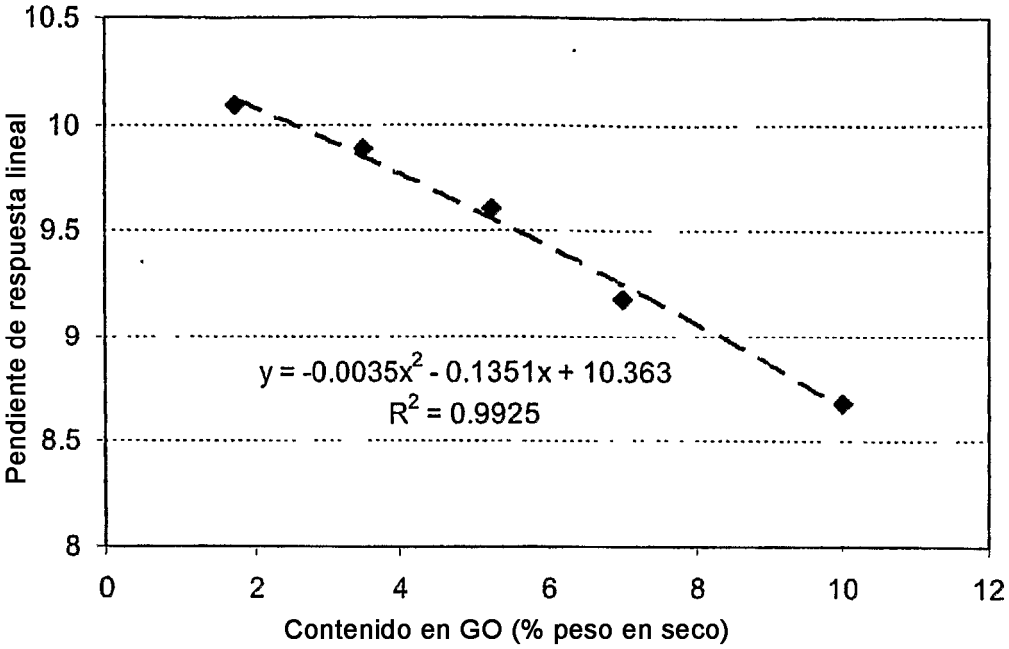

Fig.16C

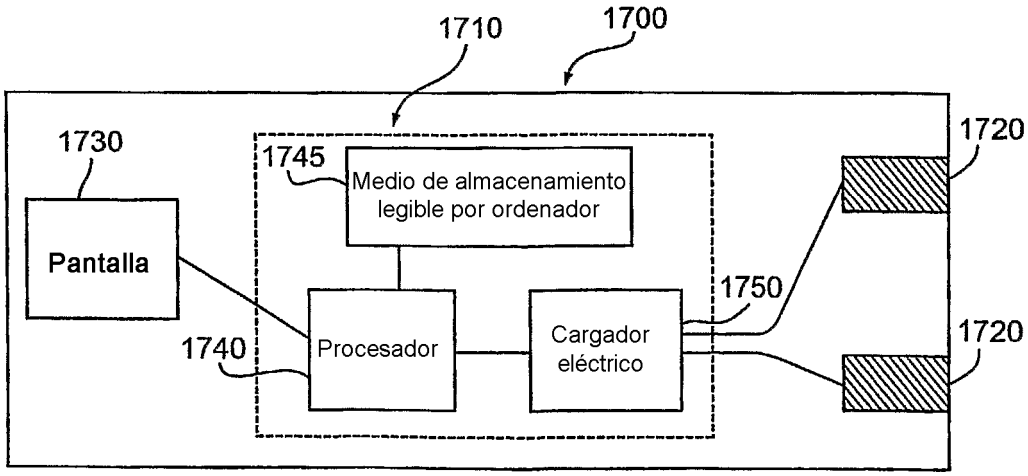

Fig.17