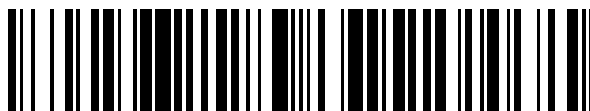


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 779 630**

51 Int. Cl.:

**G01N 27/327** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2008** E 17158596 (1)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019** EP 3193162

54 Título: **Sistema de biosensor con múltiples electrodos**

30 Prioridad:

**24.09.2007 US 974823 P**

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

**18.08.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 779 630 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Sistema de biosensor con múltiples electrodos

**Referencia a solicitudes relacionadas**

5 La presente solicitud reivindica los beneficios de la solicitud provisional estadounidense n.º 60/974.823 titulada "Multi-Potencial Biosensors, Systems, and Methods" presentada el 24 de septiembre de 2007, que se incorpora en su totalidad como referencia.

**Antecedentes**

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

20 Muchos biosensores analizan un único analito y usan diversas técnicas para mejorar la fiabilidad y/o precisión del análisis. La fiabilidad puede expresarse en cuanto al desvío de la lectura de analito del sistema de sensor en comparación con una lectura de analito de referencia, representando unos mayores valores de desvío menos fiabilidad, mientras que la precisión puede expresarse en cuanto a la difusión o varianza entre múltiples mediciones. La información de calibración puede usarse para mejorar la fiabilidad y/o precisión del análisis y puede leerse a partir del sensor de prueba con respecto al dispositivo de medición antes del análisis. El dispositivo de medición usa la información de calibración para ajustar el análisis del fluido biológico en respuesta a uno o más parámetros, tales como el tipo de fluido biológico, el/los analito(s) particular(es), y las variaciones de fabricación del sensor de prueba. 25 Los biosensores pueden implementarse usando dispositivos de medición de sobremesa, portátiles, y similares. Los dispositivos de medición portátiles pueden manipularse con las manos y permitir la identificación y/o cuantificación de un analito en una muestra. Ejemplos de sistemas de medición portátiles incluyen los medidores de Ascensia Breeze® y Elite® de Bayer HealthCare en Tarrytown, Nueva York, mientras que ejemplos de sistemas de medición de sobremesa incluyen la estación de trabajo electroquímica a disponibilidad por CH Instruments en Austin, Texas.

30 La entrada de señal eléctrica al sensor de prueba por el dispositivo de medición puede ser un potencial o corriente y puede ser constante, variable, o una combinación de los mismos, tal como cuando se aplica una señal de CA con un desvío de señal de CC. La señal de entrada puede aplicarse como un único pulso o en múltiples pulsos, secuencias, o ciclos. El analito o una especie que puede medirse experimenta una reacción de oxidoreducción cuando la señal de entrada se aplica a la muestra. La reacción de oxidoreducción genera la señal de salida que puede medirse de manera constante o periódica durante una salida transitoria y/o de estado estacionario. A diferencia de una señal de salida transitoria que es cambiante, se observa una salida de estado estacionario cuando el cambio de una señal con respecto a su variable de entrada independiente (tiempo, etc.) es sustancialmente constante, tal como dentro de  $\pm 10$  o  $\pm 5\%$ .

40 Pueden usarse diversos procedimientos electroquímicos tal como coulombimetría, amperimetría, voltamperometría, o similares. A diferencia de la coulombimetría, la amperimetría y la voltamperometría miden, generalmente, la velocidad a la que se oxida o reduce el analito para determinar la concentración de analito en la muestra. En amperimetría, una señal eléctrica de potencial constante (tensión) se aplica a los conductores eléctricos del sensor de prueba al tiempo que la señal de salida medida es una corriente. En voltamperometría, un se aplica un potencial variable a una muestra de fluido biológico. Los métodos de amperimetría seleccionado y de voltamperometría seleccionado que incluyen 45 ciclos de excitación y relajación alternos también pueden usarse.

50 El "efecto de hematocrito" es un factor que puede reducir la fiabilidad y/o precisión de un análisis realizado en una muestra de sangre completa. Además de agua, glucosa, proteínas, cetonas, y otras moléculas biológicas, las muestras de sangre completa contienen glóbulos rojos. El hematocrito es el volumen de una muestra de sangre completa ocupado por glóbulos rojos en relación con el volumen total de la muestra de sangre completa y, a menudo, se expresa como un porcentaje. Cuanto más se desvíe el porcentaje de hematocrito del % de calibración de sistema de hematocritos para una muestra de sangre completa, mayor será el desvío (error) en las lecturas de analitos obtenidas a partir del biosensor. Por ejemplo, un sistema de biosensor convencional que tiene un conjunto de constantes de calibración (pendiente e intersección para el 40% de hematocritos que contiene la muestra de sangre completa, por ejemplo) presentará tres concentraciones de glucosa diferentes para muestras de sangre completa que tienen 55 concentraciones de glucosa idénticas, pero porcentajes de hematocritos del 20%, 40%, y 60%. Por tanto, aunque las concentraciones de sangre completa-glucosa son iguales, el sistema presentará que la muestra de sangre completa con el 20% de hematocritos contiene más glucosa que la muestra de sangre completa con el 40% de hematocrito, y que la muestra de sangre completa con el 60% de hematocritos contiene menos glucosa que la muestra de sangre

completa con el 40% de hematocritos. Dado que los biosensores convencionales están configurados, generalmente, para presentar concentraciones de glucosa que suponen un contenido del 40% de hematocritos para la muestra de sangre completa, cualquier medición de glucosa realizada en una muestra de sangre que contiene menos o más del 40% de hematocritos incluirá determinado error de desvío atribuible al efecto de hematocrito.

5 El desvío de hematocritos puede expresarse mediante la siguiente ecuación:

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

en donde  $G_m$  y  $G_{ref}$  son las lecturas de glucosa medida y glucosa de referencia, respectivamente, para cualquier nivel de hematocritos. Cuanto mayor sea el valor absoluto del %-Hct-desvío, mayor será el efecto de hematocrito.

10 Además del efecto de hematocrito, las imprecisiones de medición también pueden surgir cuando la concentración de especie que puede medirse no está correlacionada con la concentración de analito. Por ejemplo, cuando el biosensor determina la concentración de un mediador reducido generado en respuesta a la oxidación de un analito, cualquier mediador reducido no generado mediante la oxidación del analito implicará una indicación de que hay más analito presente en la muestra de lo correcto debido al fondo de mediador.

15 Al conocer la señal de salida atribuible a factores no sensibles a la concentración del analito, la parte falsa de la señal de salida puede sustraerse. Los sistemas convencionales han intentado aislar las partes no sensibles de la señal de salida colocando múltiples pares de contraelectrodos y electrodos de trabajo en un depósito de muestras común. Al alterar los reactivos usados para formar los electrodos, estos sistemas intentaron separar el analito sensible y las partes no sensibles sustrayendo las dos señales de salida.

20 Por ejemplo, los sistemas de sensor convencionales pueden tener múltiples zonas de detección en una cámara de muestras no dividida, en donde cada electrodo de trabajo está orientado hacia un electrodo de referencia. En otro aspecto, estos sistemas pueden tener un único electrodo de referencia. Los sistemas de este tipo pueden proporcionar un sistema de calibración de sensor en prueba con dos estándares conocidos o pueden proporcionar sistemas de electrodo independientes para la determinación de analitos, interferencia, y hematocritos, por ejemplo. Una desventaja habitual de estos sistemas es la única cámara de muestras, en donde los sistemas de electrodo/zonas de detección adyacentes pueden estar contaminados químicamente uno con respecto a otro debido a la difusión y/o movimiento del líquido. Esta desventaja puede resultar especialmente problemática cuando un sistema de reactivos requiere un tiempo de ensayo más largo que otro y/o cuando el sensor de prueba se altera mecánicamente tras llenarse con muestras.

30 Los sensores de prueba que tienen múltiples regiones de análisis secundarias, conteniendo cada una un electrodo de trabajo y un contraelectrodo, se conocen a partir de los documentos US2004/0040866 y DE202005020335U.

Dado que, para el diagnóstico, es necesaria cada vez más información con respecto a los analitos presentes en muestras biológicas, existe una creciente necesidad de control rutinario de múltiples especies biológicas de importancia médica. Por consiguiente, existe una necesidad creciente de mejorar los biosensores, especialmente aquellos que pueden proporcionar unas mediciones de concentración cada vez más fiables y/o precisas para múltiples analitos. Los sistemas, dispositivos, y métodos de la presente invención eliminan o mejoran al menos una de las desventajas asociadas con los biosensores convencionales.

### Compendio

40 El contenido de la invención es un sensor de prueba de analitos según la reivindicación 1. El sensor de prueba comprende al menos dos sustratos que forman un depósito, incluyendo el depósito una zona principal y una pluralidad de nueve regiones de análisis secundarias que incluyen una región en el extremo de la zona principal, estando cada una de las regiones de análisis secundarias ocupada por un electrodo o conductor, siendo cada una de las regiones de análisis secundarias diferente e independientes una con respecto a otra y estando aisladas químicamente de manera sustancial de manera que el mezclado difusivo o convectorio de composiciones reactivas no se produce sustancialmente entre la pluralidad de nueve regiones de análisis secundarias durante el tiempo de uno o más análisis de una muestra, incluyendo cada una de cuatro de las regiones de análisis secundarias un electrodo de trabajo respectivo, estando los cuatro electrodos de trabajo conectados eléctricamente, formándose cada uno de los electrodos de trabajo a partir de una composición reactiva y un primer conductor, incluyendo cada una de cuatro regiones de análisis secundarias adicionales un contraelectrodo respectivo, pudiendo dirigirse a los cuatro contraelectrodos de manera independiente, estando cada uno de los contraelectrodos formado a partir de un sistema de transferencia de carga y un segundo conductor; al menos un orificio de muestras en comunicación de fluido con el depósito; y una pluralidad de respiraderos, estando cada uno de los respiraderos en comunicación de fluido con una respectiva de las regiones de análisis secundarias; en el que las cuatro regiones de análisis secundarias que incluyen los electrodos de trabajo se ubican en un lado de la zona principal, ubicándose las cuatro regiones de análisis secundarias que incluyen los contraelectrodos en un lado opuesto de la zona principal en una disposición escalonada de manera que una línea recta que pasa desde uno de los electrodos de trabajo a través de la región de análisis secundaria respectiva y a través de la zona principal no puede introducirse a través de una segunda región de análisis secundaria opuesta a un contraelectrodo opuesto respectivo, pero escalonado.

**Breve descripción de los dibujos**

- 5 La invención puede comprenderse mejor con referencia a los siguientes dibujos y descripción. Los componentes en las figuras no se realizan necesariamente a escala, enfatizando, en su lugar, la ilustración de los principios de la invención. Además, en las figuras, los números de referencia similares designan partes correspondientes en la totalidad de las diferentes vistas.
- La figura 1A representa una disposición de sensor de prueba (no según la presente invención) en donde la muestra se introduce en la parte superior de una zona principal a través de un orificio de muestras y fluye de manera sustancialmente simétrica para rellenar cuatro regiones de análisis secundarias.
- 10 La figura 1B (no según la presente invención) representa el sensor de prueba de la figura 1A con la adición de un electrodo de referencia.
- La figura 1C (no según la presente invención) representa el sensor de prueba de la figura 1A con contraelectrodos independientes.
- La figura 1D (no según la presente invención) representa el sensor de prueba de la figura 1C con la adición de un electrodo de referencia.
- 15 La figura 2A (no según la presente invención) representa una disposición de sensor de prueba en donde la introducción de muestras se produce desde un orificio de muestras en un lado del sensor de prueba al interior de una zona principal y, entonces, fluye de una manera simétrica para rellenar dos regiones de análisis secundarias.
- La figura 2B (no según la presente invención) representa un sensor de prueba que tiene la disposición de electrodos de la figura 2A, pero con una disposición diferente de las regiones de análisis secundarias.
- 20 La figura 3A (no según la presente invención) representa un diseño de sensor de prueba de canal recto en donde la muestra fluye desde una zona principal a través de una primera ubicación de electrodo potencial para alcanzar una segunda ubicación de electrodo potencial.
- La figura 3B (no según la presente invención) a la figura 3G representan diseños alternos para regiones de análisis secundarias en donde la muestra no fluye a través de más de una ubicación de electrodo potencial.
- 25 La figura 4A (no según la presente invención) muestra el voltamograma cíclico de un diseño de sensor de prueba de canal recto, tal como se representa en la figura 3A.
- La figura 4B (no según la presente invención) muestra el voltamograma cíclico de un diseño de canal en Y, tal como se representa en la figura 3E.
- 30 La figura 5A (no según la presente invención) muestra un gráfico de corriente de quimioamperimetría frente a tiempo que establece que para un sensor de prueba de canal recto del tipo usado en la Figura 4A, se observó un pico de ferrocianuro en el electrodo de trabajo en aproximadamente 5 segundos de la introducción de la muestra.
- La figura 5B (no según la presente invención) muestra un gráfico de corriente de quimioamperimetría frente a tiempo que establece que para un sensor de prueba de canal en Y del tipo usado en la Figura 4B, básicamente ningún ferrocianuro alcanzó el electrodo de trabajo después de 30 segundos de la introducción de la muestra.
- 35 La figura 5C (no según la presente invención) es un gráfico de corriente de quimioamperimetría frente a tiempo que establece que el diseño de canal en Y proporciona un aislamiento químico superior entre las ubicaciones de electrodo de potencial que un diseño de canal en T.
- La figura 5D (no según la presente invención) establece que tres diseños de canal en Y fueron resistentes a tal mezcla desde la perturbación mecánica.
- 40 La figura 6A (no según la presente invención) representa un sensor de prueba que tiene una disposición escalonada de las regiones de análisis secundarias en donde la muestra entra por un orificio de muestras a una zona principal en forma de un canal desde el que se ramifican dos regiones de análisis secundarias.
- La figura 6B (no según la presente invención) representa una disposición de sensor de prueba en donde la muestra entra por el orificio de muestras a una zona principal en forma de un canal desde el que se ramifican tres regiones secundarias.
- 45 La figura 7A y la figura 7B (no según la presente invención) representan sensores de prueba que tiene diseños de región de análisis secundaria escalonados.
- La figura 8A representa una realización de la presente invención, es decir, una variación del sensor de prueba de la figura 7A en donde múltiples electrodos de trabajo se conectan eléctricamente.

La figura 8B (no según la presente invención) representa una variación del sensor de prueba de la figura 7A en donde múltiples contraelectrodos se conectan eléctricamente.

La figura 9A representa un medidor de transferencia de un electrón que transfiere un electrón.

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

- 5 La figura 10A representa un sistema que tiene tres contraelectrodos independientemente direccionables, funcionando cada uno a un potencial diferente, y tres electrodos de trabajo conectados eléctricamente, teniendo cada uno un sistema de mediador que opera a un potencial diferente.

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

- 10 La figura 10C es un gráfico que relaciona el potencial de operación de contraelectrodo y la proporción del par conjugado reducción-oxidación.

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

- 15 La figura 10E muestra voltamogramas cíclicos que establecen los diferentes potenciales de funcionamiento que pueden proporcionarse a uno o más electrodos de trabajo mediante múltiples contraelectrodos independientemente direccionables.

La figura 11A establece que los sistemas de transferencia de carga de la figura 10E puede sustituirse por múltiples relaciones de pares conjugados de reducción-oxidación para proporcionar múltiples potenciales al sistema.

- 20 La figura 11B representa los perfiles de corriente obtenidos cuando el potencial en un electrodo de trabajo sustancialmente aislado químicamente se controla de manera repetida en secuencia por tres contraelectrodos independientemente direccionables y sustancialmente aislados químicamente, teniendo cada uno un potencial diferente proporcionado por diferentes sistemas de transferencia de carga.

La figura 12A representa una representación esquemática de un sistema de biosensor (no según la presente invención) que determina una concentración de analito en una muestra de un fluido biológico.

- 25 La figura 12B a 12F (no según la presente invención) representan múltiples variaciones potencioestáticas que pueden usarse con el generador de señal de la figura 12A.

La figura 13 representa un análisis electroquímico (no según la presente invención) para determinar la presencia y/o concentración de al menos un analito en una muestra.

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

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

- 35 La figura 15 muestra los resultados de promediar los resultados de hasta cuatro análisis independientes para el mismo analito para determinar la concentración del analito en la muestra.

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

### Descripción detallada

- 40 Se da a conocer un sensor de prueba según la reivindicación 1. Por tanto, los electrodos de trabajo y los contraelectrodos de un par de electrodos residen en ambientes sustancialmente aislados químicamente.

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

La figura 1A representa una disposición de sensor 100 de prueba (no según la presente invención) en donde la muestra se introduce en la parte superior de una zona 110 principal a través de un orificio 115 de muestras y fluye de manera sustancialmente simétrica para rellenar cuatro regiones 150 de análisis secundarias. Cada una de las regiones 150 de análisis secundarias incluye un respiradero 120 para permitir que la muestra expulse aire desde las regiones 150 de análisis secundarias durante el llenado. El respiradero 120 puede presentar cualquier forma que sea compatible con la forma de las regiones 150 de análisis secundarias, tal como circular o poligonal. El diámetro o anchura máximos del respiradero 120 pueden presentar cualquier tamaño que proporcione el flujo de muestra deseado al interior de las regiones 150 de análisis secundarias, prefiriéndose los valores desde aproximadamente 0,02 mm hasta aproximadamente 1,5 mm.

Un único contraelectrodo 130 ocupa la zona principal, mientras que un electrodo 141-144 de trabajo está presente en cada región 150 de análisis secundaria. Aunque se representa con el contraelectrodo 130 en la zona 110 principal y los electrodos 141-144 de trabajo en las regiones 150 de análisis secundarias, la colocación del electrodo de trabajo y los contraelectrodos puede invertirse de modo que múltiples contraelectrodos rodeen un único electrodo de trabajo (no se muestra). En otro aspecto, los electrodos pueden no ocupar el mismo plano. Por ejemplo, algunos electrodos pueden disponerse horizontalmente mientras que otros se disponen verticalmente. En otro ejemplo, algunos electrodos pueden colocarse más elevados que otros de modo que el fluido biológico alcanza los electrodos inferiores en primer lugar. Pueden usarse otras configuraciones de electrodos. Por ejemplo, la figura 1B (no según la presente invención) representa el sensor de prueba de la figura 1A con la adición de un electrodo 170 de referencia para proporcionar un potencial no variable.

La figura 1C (no según la presente invención) representa el sensor 100 de prueba en donde en lugar de un único contraelectrodo 130, se proporcionan cuatro contraelectrodos 131-134 independientes en la zona 110 principal central. Aunque se representa con los contraelectrodos en la zona principal y los electrodos de trabajo en las regiones de análisis secundarias, la colocación de cualquier electrodo de trabajo y cualquier contraelectrodo puede invertirse (no se muestra). Pueden usarse otras configuraciones de electrodos.

La figura 1D (no según la presente invención) representa el sensor de prueba de la figura 1C con la adición de un electrodo 170 de referencia a cada región de análisis secundaria para proporcionar un potencial no variable. Uno o más de los electrodos 170 de referencia pueden operar a uno o más potenciales para proporcionar un potencial no variable a cada análisis. A medida que varía el potencial de funcionamiento de los contraelectrodos, pueden usarse uno o más electrodos de referencia para hacer referencia al potencial en los contraelectrodos además de hacer referencia al potencial de los electrodos de trabajo tal como resulta habitual en sistemas convencionales.

Aunque no se muestra en la figura, para sensores de prueba implementados en aplicaciones de control continuo, tales como para electrodos implantados en un organismo vivo o de otro modo en contacto continuo con un fluido biológico, el uso de múltiples electrodos de referencia puede permitir un aumento de fiabilidad y/o precisión de las concentraciones de analito determinadas. El aumento puede surgir a partir de una reducción en los problemas asociados con el potencial variable de los electrodos de trabajo implantados en un organismo vivo o de otro modo en contacto continuo con un fluido biológico.

En la figura 1A y la figura 1B (no según la presente invención), los conductores 160 conducen desde cada electrodo hacia la parte trasera del sensor 100 de prueba en donde cada uno de los conductores 160 puede conectarse a un dispositivo de medición, permitiendo el direccionamiento de cada electrodo 141-144 de trabajo de manera independiente. Por tanto, cuando el conductor 160 se conecta a un único electrodo, el electrodo se direcciona de manera independiente. Los conductores 160 pueden permanecer siendo independientemente direccionables o cualesquiera de dos o más pueden conectarse eléctricamente (no se muestra). Por tanto, cuando más de un electrodo se conecta eléctricamente al mismo conductor, los electrodos no son independientemente direccionables dado que están direccionados eléctricamente en conjunto. Por ejemplo, conectando eléctricamente dos de los electrodos 141-144 de trabajo, tal como 141 y 144, el sensor 100 de prueba resultando tendría tres electrodos de trabajo y un contraelectrodo 130 independientemente direccionables.

Cuando se configura con el único contraelectrodo 130 y cuatro electrodos 141-144 de trabajo independientemente direccionables, el sensor 100 de prueba de la figura 1A y la figura 1B (no según la presente invención) pueden realizar potencialmente un análisis diferente en cada uno de los electrodos 141-144 de trabajo. El único contraelectrodo 130 puede proporcionar un único potencial al sistema a través del uso de un sistema de transferencia de carga que opera a un único potencial. Dependiendo del dispositivo de medición, el único contraelectrodo 130 puede proporcionar más de un potencial al sistema.

Si los tipos de electrodo se invirtieran para el sensor 100 de prueba de la figura 1A y la figura 1B (no según la presente invención) de modo que hubiera cuatro contraelectrodos independientemente direccionables y un único electrodo de trabajo, la electroquímica en el electrodo de trabajo podría medirse potencialmente en cuatro potenciales diferentes. La direccionabilidad independiente de los contraelectrodos permite que cada contraelectrodo esté formado con un sistema de transferencia de carga diferente, alterando, por tanto, el potencial proporcionado al electrodo de trabajo durante el análisis. Si el electrodo de trabajo incluye reactivos que interactúan con uno o más analitos en cuatro potenciales diferentes, cada interacción de analito puede medirse de manera independiente direccionando

eléctricamente el contraelectrodo apropiado. Preferiblemente, cada contraelectrodo independientemente direccionable opera a un único potencial o intervalo de potencial.

En la figura 1C y 1D (no según la presente invención), los conductores 160 conducen desde cada electrodo hacia la parte trasera del sensor 100 de prueba en donde cada uno de los conductores 160 puede conectarse a un dispositivo de medición. Esta disposición permite que cada electrodo 141-144 de trabajo y cada contraelectrodo 131-134 se dirija independientemente. Los conductores 160 pueden permanecer eléctricamente aislados o cualesquiera de dos o más pueden conectarse eléctricamente (no se muestra). Por ejemplo, conectando eléctricamente dos de los contraelectrodos, tales como 132 y 133, el sensor de prueba resultante tendría cuatro electrodos de trabajo independientemente direccionables y tres contraelectrodos independientemente direccionables. Se puede conectar eléctricamente cualquier combinación de electrodos.

Los electrodos de trabajo independientemente direccionables permiten potencialmente la medición de una reacción química diferente en cada electrodo 141-144 de trabajo. Tener contraelectrodos independientemente direccionables 131-134 de diferentes potenciales de funcionamiento permite que un electrodo de trabajo se pueda operar contra más de un potencial de contraelectrodo. Por tanto, pueden medirse dos químicas de transferencia de carga presentes en el mismo electrodo de trabajo de manera independiente mediante dos contraelectrodos independientemente direccionables en donde el primer contraelectrodo opera al potencial de la primera química de transferencia de carga y el segundo contraelectrodo opera al potencial de la segunda química de transferencia de carga.

El sensor 100 de prueba de la figura 1C (no según la presente invención) proporciona direccionabilidad independiente a cuatro electrodos 141-144 de trabajo y cuatro contraelectrodos 131-134. Dado que cada uno de los contraelectrodos 131-134 puede proporcionar un potencial diferente, pueden realizarse potencialmente dieciséis análisis diferentes. Por tanto, la electroquímica de un único electrodo de trabajo puede medirse en cuatro potenciales diferentes y el potencial de un único contraelectrodo puede aplicarse contra cuatro químicas de electrodo de trabajo diferentes. El sensor de prueba de la figura 1D, que tiene cuatro electrodos 170 de referencia independientemente direccionables, puede proporcionar hasta cuatro potenciales diferentes no variables al sistema. El dispositivo de medición puede usar uno o más de los potenciales no variables para controlar o determinar el potencial de funcionamiento en los electrodos 141-144 de trabajo y en los contraelectrodos 131-134.

Para el sensor 100 de prueba de la figura 1A a la figura 1D (no según la presente invención), las regiones 150 de análisis secundarias pueden tener zonas de aproximadamente 0,5 mm<sup>2</sup> y alturas de aproximadamente 0,125 mm para proporcionar volúmenes interiores de aproximadamente 62 nL cada una. Regiones de análisis secundarias preferidas tienen volúmenes interiores de 100 nL y menos, prefiriéndose volúmenes interiores de 70 nL y menos. Pueden usarse regiones de análisis secundarias más pequeñas y más grandes.

La figura 2A representa una disposición de sensor 200 de prueba (no según la presente invención) en donde se produce la introducción de muestras desde un orificio 215 de muestras en un borde 214 frontal del sensor 200 de prueba en una zona 210 principal y entonces fluye de una manera simétrica para rellenar una primera región 251 de análisis secundaria y una segunda región 252 de análisis secundaria. El flujo de muestra es asimétrico porque la segunda región 252 de análisis secundaria es mayor que la primera región 251 de análisis secundaria. Las regiones 251, 252 de análisis secundarias pueden incluir un respiradero 220 para permitir que la muestra expulse aire desde la región durante el llenado.

En la entrada, la muestra cruza un primer par de electrodos definido por el electrodo 241 de trabajo y el contraelectrodo 231. Mientras continúa atravesando el primer par de electrodos, la muestra fluye hacia los pares de electrodos segundo y tercero, definidos por el electrodo 242 de trabajo y el contraelectrodo 232 (segundo par) y por el electrodo 243 de trabajo y el contraelectrodo 233 (tercer par). La muestra que fluye a través de los pares de electrodos primero y tercero entonces continúa fluyendo hasta que cruza el cuarto par de electrodos, definido por el electrodo 244 de trabajo y el contraelectrodo 234. Por tanto, el cuarto par de electrodos cruza por la muestra después de los pares de electrodos primero y tercero. Cuando cruza por la muestra, una composición 280 reactiva proporciona conductividad eléctrica entre los pares de los electrodos de trabajo y los contraelectrodos. Una direccionabilidad independiente del par de electrodos permite que se monitorice el llenado de las regiones 251, 252 de análisis secundarias. Pueden usarse otras configuraciones de electrodos, por ejemplo, puede invertirse la colocación de cualquier electrodo de trabajo y cualquier contraelectrodo (no se muestra).

Al monitorizar el llenado de las regiones 251, 252 de análisis secundarias, el sensor 200 de prueba proporciona un sistema de detección de bajo nivel de llenado para impedir o descartar los análisis asociados con tamaños de muestras que presentan un volumen insuficiente. Dado que los valores de concentración obtenidos a partir de un sensor de prueba con bajo nivel de llenado pueden no resultar fiables, la capacidad de impedir o descartar estos análisis no fiables puede aumentar la fiabilidad de los valores de concentración obtenidos. Los sistemas de detección de bajo nivel de llenado convencionales tienen uno o más indicadores, tal como un electrodo o conductor, que detectan el llenado parcial y/o completo del depósito de muestras dentro del sensor de prueba. Al tener la capacidad de monitorizar el llenado entre múltiples regiones de análisis secundarias, son posibles unas determinaciones más fiables del estado de llenado del sensor 200 de prueba. La señal eléctrica puede usarse para indicar si una muestra está presente y si la muestra llena parcial o completamente una región de análisis específica.

La figura 2B (no según la presente invención) representa el sensor 200 de prueba que tiene la disposición de electrodos de la figura 2A, pero con una disposición diferente de las regiones de análisis secundarias. Una zona 210 principal que incluye el primer par de electrodos está dotada de las tres regiones 253, 254, 255 de análisis secundarias simétricamente llenas. En la entrada, la muestra cruza el primer par de electrodos y entonces se mueve de manera independiente para cruzar los pares de electrodos segundo, tercero, y cuarto. De manera general, el flujo de fluido permanece asimétrico debido a la ocupación del primer par de electrodos de la zona principal, llenándose, por tanto, antes que las regiones de análisis secundarias. Cada una de las regiones 253, 254, 255 de análisis secundarias puede incluir un respiradero 220 para permitir que la muestra expulse aire durante el llenado del sensor 200 de prueba.

Una única composición 280 reactiva pueden extenderse entre cada uno de los cuatro pares de electrodos de trabajo y contraelectrodos tal como se muestra. Un conductor 260 que conduce desde cada electrodo hacia la parte trasera del sensor 200 de prueba en donde puede conectarse a un dispositivo de medición, permite que cada electrodo se direcciona de manera independiente. Aunque cada electrodo se direcciona de manera independiente, cada par de electrodos comparte el mismo entorno químico debido a que la misma capa de reactivo entra en contacto tanto con los electrodos de trabajo como con los contraelectrodos de cada par. Los electrodos pueden permanecer eléctricamente aislados o cualesquiera de dos o más pueden conectarse eléctricamente (no se muestra). Pueden añadirse uno o más electrodos de referencia para proporcionar un potencial no variable (no se muestra).

Aunque se representa con los contraelectrodos agrupados de manera céntrica y los electrodos de trabajo alrededor del perímetro, la colocación de cualquier electrodo de trabajo y contraelectrodo puede invertirse. Los cuatro electrodos de trabajo independientes permiten cuatro composiciones reactivas diferentes para realizar potencialmente cuatro análisis diferentes. Aunque cada uno de los cuatro contraelectrodos independientes puede operarse a un potencial diferente para proporcionar 16 posibles análisis, la separación de 90° entre cada par de electrodos puede hacer que esto resulte impracticable.

La figura 3A (no según la presente invención) representa un diseño de sensor de prueba de canal recto en donde la muestra fluye desde la zona 310 principal a través de una primera ubicación 320 de electrodo potencial para alcanzar una segunda ubicación 330 de electrodo potencial. La figura 3B a la figura 3G (no según la presente invención) representan diseños de sensores de prueba alternativos para regiones de análisis secundarias en donde la muestra no fluye a través de más de una ubicación de electrodo potencial. La figura 3B representa un diseño de canal en T usado en algunos sensores convencionales. La figura 3C representa un diseño de múltiples canales en T en donde se encuentran presentes ubicaciones 340 y 350 de electrodo potencial adicionales. Pueden añadirse partes en "T" adicionales si se desean ubicaciones de electrodo potencial adicionales.

La figura 3H (no según la presente invención) representa un sensor 300 de prueba de múltiples canales en T que tiene tanto un electrodo 331 de trabajo independientemente direccionable como un contraelectrodo 332 independientemente direccionable en cada una de las cuatro regiones 333 de análisis secundarias. Por tanto, cada par de electrodos de trabajo y contraelectrodos comparte el mismo entorno químico, pero cada par de electrodos se aísla de manera sustancialmente química de cada par adicional. Un sistema 336 de transferencia de carga de composición reactiva combinado se deposita en cada par de electrodos. Cada uno de los electrodos 331 de trabajo y cada uno de los contraelectrodos 332 se forma a partir de un conductor 334 que termina en un contacto 335. El contacto 335a y el contacto 335b corresponden a los electrodos de trabajo y los contraelectrodos, respectivamente, de la región 333a de análisis secundaria. La anchura de cada una de las regiones 333 de análisis secundarias es de 1,2 mm, mientras que la anchura de la zona 310 principal es de 1,5 mm. La distancia en línea recta entre el par de electrodos en regiones de análisis secundarias opuestas es de 3,46 mm. Se especifica que la anchura del electrodo de trabajo de cada es de 0,50 mm separada del contraelectrodo por de aproximadamente 0,05 mm a aproximadamente 0,25 mm. Los círculos dibujados en cada uno de los electrodos 331 de trabajo es la zona de cobertura proyectada de la composición reactiva. Pueden usarse otras anchuras de región de análisis secundaria, anchuras y separaciones de electrodo, y zonas de cobertura de composición reactiva.

La figura 3I (no según la presente invención) representa un sensor 300 de prueba de múltiples canales en T que tiene un electrodo 331 de trabajo independientemente direccionable en cada uno de cuatro regiones de análisis secundarias sustancialmente aisladas químicamente y un contraelectrodo 332 independientemente direccionable en cada una de cuatro regiones 333 de análisis secundarias opuestas. Por tanto, cada electrodo está sustancialmente aislado químicamente de cada electrodo adicional. Cada electrodo está formado a partir de un conductor 334 que termina en un contacto 335.

La figura 3D (no según la presente invención) representa una desviación de los diseños de canal en T porque las regiones de análisis secundarias están escalonadas de modo que no se puede trazar una línea 370 recta que pasa a través de las regiones de análisis secundarias y una zona principal entre cualesquiera de dos ubicaciones de electrodo potencial. La posible ventaja de un diseño escalonado de este tipo es la resistencia al mezclado entre las regiones de análisis secundarias opuestas si el sensor de prueba se perturba mecánicamente al tiempo que se llena con la muestra. Perturbar mecánicamente significa aplicar una fuerza suficiente al sensor de prueba para provocar el movimiento de la muestra de fluido.

Además de no superar la prueba de la línea recta, los diseños de canal en Y de la figura 3E a la figura 3G (no según la presente invención) resisten el mezclado entre las ubicaciones de electrodo potencial que están más próximas que



para los diseños de la figura 3B y 3C porque la separación de las regiones de análisis secundarias no solo se basa en la distancia entre ubicaciones de electrodo potencial para aislamiento químico sustancial. La separación química en un canal en Y también se puede beneficiar de que la muestra tiene que fluir alrededor de la parte en “v” de la “Y” para mezclarse. Dado que los electrodos se pueden separar más próximos entre sí, pero seguir resistiéndose al mezclado de muestra, el volumen total del depósito de muestras de un diseño de canal en Y puede ser menor en relación con un diseño de canal en T que tiene una separación química similar.

Diseños de depósitos de muestras preferidos tienen regiones de análisis secundarias que se ramifican desde la zona 310 principal formando un ángulo 390 de menos de 90°, tal como se representa en la figura 3F (no según la presente invención). De esta manera, el fluido puede entrar en el sensor de prueba y alcanzar las ubicaciones de electrodo potencial sin realizar un giro de 90°. Esto puede permitir que la muestra entre rápidamente en el sensor de prueba al tiempo que se reduce el potencial de mezclado de reactivo a partir de convección de muestras debido a la vibración. Diseños más preferibles están desprovistos de la línea 370 recta tal como se representa en la figura 3B y la figura 3C (no según la presente invención) entre electrodos que pasan a través de las regiones de análisis secundarias y una zona principal y tienen regiones de análisis secundarias que se ramifican desde la zona principal formando un ángulo menor de 90°. Otros diseños, tales como aquellos que tienen uno o más curvas en la zona principal y/o regiones de análisis secundarias y aquellos en los que las regiones de análisis secundarias se ramifican desde la zona principal formando un ángulo mayor de 90° también pueden usarse; sin embargo, el aumento de los requisitos de tamaño de muestra y la disminución de las velocidades de llenado de muestra pueden ser factores limitantes.

La figura 3J (no según la presente invención) representa un sensor 300 de prueba de canal en Y que tiene tanto un electrodo 331 de trabajo independientemente direccionable como un contraelectrodo 332 independientemente direccionable en cada una de dos regiones 333 de análisis secundarias. Por tanto, cada par de electrodos de trabajo y contraelectrodos de electrodos comparte el mismo entorno químico, pero cada par está sustancialmente aislado químicamente del par opuesto. Aunque el electrodo 331 de trabajo cruza la región 333 de análisis secundaria, el contraelectrodo 332 se define por el borde de perímetro de la región 333 de análisis secundaria, que se forma, a su vez, a partir del conductor 334. Las regiones 333 de análisis secundarias se ramifican desde la zona 310 principal formando un ángulo de aproximadamente 45°. Cada uno de los conductores 334 termina en una zona 335 de contacto. Pueden usarse otros diseños de electrodo, tales como aquellos en los que se forma un único electrodo en una o más regiones de análisis secundarias. También pueden usarse otros ángulos de ramificación para las regiones de análisis secundarias.

El sustrato del sensor 300 de prueba tiene una anchura de 11,8 mm y una longitud de 30 mm. La anchura de la zona 310 principal es de 1,2 mm. La distancia entre los bordes exteriores proyectados de las dos deposiciones de composición reactiva es de 0,8 mm. Cada una de las zonas 335 de contacto tiene una anchura de 2,9 mm y el diámetro de la deposición de composición reactiva en cada una de las dos regiones 333 de análisis secundarias es de 1,8 mm. Pueden usarse otras dimensiones de sustrato, anchuras de zona principal y zona de contacto, y diámetros de deposición de composición reactiva.

Además del número y tipo de electrodos y el grado de direccionabilidad eléctrica independiente de los electrodos, el grado de aislamiento químico proporcionado por las regiones de análisis secundarias del depósito de muestras afecta al número de análisis que pueden realizarse con un sensor de prueba. Sustancialmente aislado químicamente significa que el mezclado difusivo o convectivo de los reactivos no se produce sustancialmente entre las regiones de análisis secundarias durante el tiempo del uno o más análisis.

Si un par de electrodo de trabajo y contraelectrodo está sustancialmente aislado químicamente de otros pares de electrodos de trabajo y contraelectrodos, pero no uno con respecto a otro, el par puede realizar un análisis compatible con la química presente en el par. Una configuración de este tipo puede permitir un mezclado difusivo rápido de los reactivos presentes en los electrodos de trabajo y los contraelectrodos del par. Por el contrario, si los electrodos de trabajo y los contraelectrodos se aíslan de manera sustancialmente química de otros electrodos de trabajo y los contraelectrodos y uno con respecto a otro, cada electrodo puede participar posiblemente en un análisis con cualquier otro electrodo, si son independientemente direccionables. Por tanto, si están sustancialmente aislados químicamente, pueden usarse diferentes composiciones reactivas para dotar a un electrodo de un entorno de análisis químico que es diferente de otros electrodos. En combinación, el aislamiento químico sustancial entre regiones de análisis permite el uso de diferentes reactivos en cada electrodo de trabajo y/o contraelectrodo, al tiempo que la direccionabilidad eléctrica independiente permite que cada electrodo de trabajo se mida de manera independiente.

Las regiones de análisis secundarias pueden estar sustancialmente aisladas químicamente dependiendo de la zona en sección transversal de las entradas a las regiones secundarias, las distancias entre cualesquiera de dos electrodos dentro de las regiones de análisis secundarias, la disposición física de las regiones de análisis secundarias una en relación con la otra y en relación con la zona principal, y similares. Además de estos problemas, el aislamiento químico sustancial puede perderse inicialmente debido al mezclado de reactivo a medida que la muestra fluye a través del/de los contraelectrodo(s) (figura 1A a figura 1D) o el par de electrodos en la entrada y en los lados del sensor de prueba (figura 2A y figura 2B). De esta manera, la composición reactiva puede transportarse por la muestra a múltiples pares de electrodos. Por el contrario, tal mezclado de flujo puede eliminarse sustancialmente cuando la muestra no fluye a través de más de un electrodo (figura 3B-figura 3J).

La figura 4A (no según la presente invención) muestra el gráfico de voltamperometría cíclica de un diseño de canal recto tal como se representa en la figura 3A. El primer par de electrodos más próximo al orificio de muestras usó una composición reactiva que incluye 0,5 M ferrocianuro potásico, mientras que el segundo par de electrodos más próximo al final del canal usó una composición reactiva que incluye la molécula orgánica electroactiva representada por la estructura I, a continuación. En aproximadamente siete segundos o menos, se observaron dos picos, representando el pico izquierdo oxidación del estado reducido de la molécula de la estructura I y representando el pico derecho oxidación de ferrocianuro, que se dispuso inicialmente en el primer par de electrodos. En aproximadamente 20 ciclos completos, el pico de molécula de la estructura I desapareció, sugiriendo que el ferrocianuro estaba oxidando la molécula de la estructura I.

Durante el análisis, se consideró que ferrocianuro del primer par de electrodos se oxidó en el segundo electrodo para formar ferricianuro en el segundo par de electrodos. Entonces, el ferricianuro formado oxidó químicamente la especie reducida de la molécula de la estructura I en el segundo par de electrodos. Estos resultados establecieron que la contaminación química entre el par de electrodos se produce rápidamente en un diseño de canal recto. El experimento demuestra que el agente oxidante más fuerte, tal como ferricianuro en este ejemplo, asumirá la mediación de otros mediadores, tales como la molécula de la estructura I, si los electrodos no están sustancialmente aislados químicamente. Se considera que esta contaminación es atribuible a una combinación de la muestra que cruza el contraelectrodo antes de alcanzar el electrodo de trabajo, difusión, y convección dentro del depósito de canal recto.

Por el contrario, la figura 4B (no según la presente invención) muestra los voltamogramas cíclicos de un diseño de canal en Y tal como se representa en la figura 3E. Se colocó un electrodo próximo al final de cada región de análisis secundaria. Solo se observó la oxidación de la molécula de la estructura I tras 20 ciclos completos (más de 20 minutos), que establecen que se logró un aislamiento químico sustancial durante al menos 10 minutos con el diseño de región de análisis secundaria de canal en Y. Se realizaron estos experimentos usando una estación de trabajo electroquímica de CH Instruments, modelo CHI 660A que trabaja con una versión de software 2.05, a aproximadamente 22° C y una humedad relativa de aproximadamente el 45%. La muestra era tampón fosfato con pH 7.0 que contenía fosfato de sodio 0,1 M y aproximadamente el 16% (p/p) de polímero PVP que tiene un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 2000.

Se observó un efecto similar para una prueba de quimioamperimetría, en donde se midió la corriente en función del tiempo. En la figura 5A (no según la presente invención) un gráfico de corriente frente a tiempo estableció que para un sensor de canal recto del tipo usado en la figura 4A, se observó un segundo pico con un potencial de funcionamiento de 400 mV en el electrodo de trabajo en aproximadamente 5 segundos al introducir la muestra. La introducción de muestras generó el primer pico en el gráfico. El segundo pico está correlacionado con la segunda onda voltamétrica de ferrocianuro en la figura 4A. En la figura 5B (no según la presente invención), se muestra que nada de ferrocianuro sustancialmente alcanzó el electrodo de trabajo después de 30 segundos, lo que establece que el aislamiento químico sustancial se logró con el sensor de prueba de región de análisis secundaria de canal en Y. En estos experimentos, el pico puntiagudo inicial representó estableciendo, en primer lugar, la muestra una comunicación eléctrica entre los electrodos. La prueba de amperimetría se realizó usando la estación de trabajo electroquímica de CH Instruments a aproximadamente 22° C y una humedad relativa de aproximadamente el 45%. La muestra era de tampón fosfato con pH 7.0 que contenía fosfato de sodio 0,1M y aproximadamente el 16% (p/p) de polímero de PVP que tiene un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 2000.

La figura 5C (no según la presente invención) es un gráfico de corriente amperimétrica que establece que el diseño de canal en Y proporciona un aislamiento químico superior entre ubicaciones de electrodo potencial que un diseño de canal en T. Tal como se muestra por la línea 501 de canal en Y, el aislamiento químico sustancial se observó en 1000 segundos entre las ubicaciones de electrodo potencial, tal como se representa por las posiciones 320 y 330 de la figura 3E. Por el contrario, tal como se muestra por los picos 502, 503 de canal en T el fallo de aislamiento químico y la oxidación de la molécula de la estructura I se observó después de aproximadamente 84 o después de aproximadamente 650 segundos para dos sensores de prueba de canal en T, tales como los representados en la figura 3B. La gran variabilidad entre las variables de tiempo de 84 y 650 segundos puede atribuirse a la susceptibilidad del diseño de canal en T a la mezcla por convección debido a la perturbación mecánica durante el análisis. La figura 5D establece que tres diseños de canal en Y fueron resistentes a tal mezclado debido a la perturbación mecánica. El bajo aumento de corriente observado tras aproximadamente 800 segundos puede indicar un bajo mezclado por difusión.

La figura 6A representa un sensor 600 de prueba (no según la presente invención) que tiene una disposición escalonada de las regiones 651, 652 de análisis secundarias en donde la muestra se introduce en un orificio 615 de muestras al interior de una zona 610 principal en forma de un canal desde el que se ramifican dos regiones 650 de análisis secundarias. Un conductor 690 puede extenderse al interior de la zona 610 principal para proporcionar capacidad de detección de bajo nivel de llenado al sensor 600 de prueba. De manera similar, la figura 6B representa una disposición de sensor de prueba en donde la muestra se introduce en el orificio 615 de muestras al interior de una zona 610 principal en forma de un canal desde el que se ramifican tres regiones 651-653 secundarias. Cada una de las regiones 651-653 secundarias incluye un electrodo o conductor independientemente direccionable.

En la figura 6A, la muestra llena la primera región 651 secundaria a la derecha, entonces la segunda región 652 secundaria a la izquierda. En la figura 6B (no según la presente invención), la muestra llena la tercera región 653

secundaria a la izquierda, entonces la primera región 651 secundaria a la derecha, y entonces la segunda región 652 secundaria a la izquierda.

El volumen de muestras total contenido por el sensor 600 de prueba que tiene al menos dos o tres regiones de análisis secundarias puede ser de 210 nL o menos. Cada una de las regiones de análisis secundarias y el extremo de la zona 610 principal opuesta al orificio 615 de muestras puede incluir un respiradero 620 para permitir que la muestra expulse aire durante el llenado. Al dividir el depósito de muestras definido por la zona 610 principal y las regiones 651-653 de análisis secundarias en una o más zonas principales que llenan múltiples regiones secundarias, el sensor 600 de prueba puede rellenar más rápido que un depósito de muestras sustancialmente no dividido, tal como el diseño de canal recto representado en la figura 3A, del mismo volumen o similar debido al efecto de la acción capilar llevada a cabo por la tensión de superficie. Por tanto, subdividir el depósito de muestras en regiones de análisis secundarias más pequeñas, en donde cada una puede contener un electrodo, un par de electrodos, uno o más conductores, o una combinación de los mismos, puede aumentar la tasa de llenado del sensor 600 de prueba. El aislamiento químico sustancial entre las regiones secundarias durante el llenado y durante el análisis puede proporcionarse por el llenado de las regiones secundarias desde la zona principal de esta manera.

A medida que la muestra fluye principalmente al respiradero 620 más próximo, las regiones 651-653 secundarias se llenan de una manera sustancialmente secuencial desde la zona 610 principal. Debido al llenado secuencial de las regiones 651-653 secundarias, el dispositivo de medición puede monitorizar la velocidad y el flujo de la muestra a medida que se llenan las regiones 651-653 de análisis secundarias. El flujo de la muestra también puede monitorizarse equipando el sensor 600 de prueba con un electrodo o conductor próximo al orificio 615 de muestras y/o próximo al respiradero 620 de la zona 610 principal. Por tanto, uno o más conductores y/o electrodos pueden monitorizarse por el dispositivo de medición para determinar la condición de llenado del sensor 600 de prueba. El llenado de diseños de llenado no secuenciales también puede monitorizarse de esta manera; sin embargo, el sistema puede o puede no monitorizar de manera independiente el llenado de cada región de análisis secundaria.

Aunque no se muestra en la figura, la zona 610 principal puede estar dotada de múltiples orificios 615 de muestras para permitir que la muestra se introduzca desde más de una ubicación, tal como en un perímetro y una ubicación superior. De manera similar, el sensor 600 de prueba puede estar dotado de dos o más depósitos de muestras independientes, teniendo cada uno una zona principal y dos o más regiones secundarias, para permitir el análisis de múltiples muestras. Al alterar la estructura de respiradero del depósito, pueden introducirse diferentes muestras a través de múltiples orificios de muestras en el mismo depósito, pero permanecen sustancialmente aisladas químicamente durante el análisis. Pueden usarse otras relaciones entre la zona o zonas principales y las regiones secundarias.

La zona 610 principal y/o una o más regiones 651-653 secundarias pueden incluir materiales de alteración de flujo que modifican el flujo de la muestra a medida que se distribuye a través del depósito de muestras. Por ejemplo, pueden usarse tratamientos, revestimientos, o materiales hidrófilos y/o hidrófobos para dirigir, preferiblemente, la trayectoria de flujo y/o tasa de llenado de muestras acuosas. En otro aspecto, la zona 610 principal y/o las regiones 651-653 secundarias pueden incluir características estructurales, tales como paredes, muescas, o canales, que dirigen, preferiblemente, la trayectoria de flujo y/o tasa de llenado de la muestra. En otro aspecto, los materiales que alteran química o físicamente la composición de la muestra pueden colocarse en la zona 610 principal y/o las regiones 651-653 secundarias. Por ejemplo, un material que filtra los glóbulos rojos de la muestra pueden colocarse en una parte de la zona principal para eliminar las células antes de que la muestra alcanza una región secundaria.

La figura 7A y la figura 7B representan sensores 700 de prueba (no según la presente invención) que tienen diseños de región de análisis secundaria escalonados tal como se comentó anteriormente. El diseño de la figura 7A incluye ocho regiones de análisis secundarias con ángulos de aproximadamente 90° con respecto a la zona 710 principal, mientras que la figura 7B es un diseño de canal en Y similar. El sensor 700 de prueba incluye un total de nueve regiones de análisis secundarias, que incluyen la región en el extremo de la zona 710 principal, estando cada una ocupada por un electrodo o conductor. La figura representa cuatro contraelectrodos 731-734 independientemente direccionables y cuatro electrodos 741-744 de trabajo, estando presente cada uno en una de las ocho regiones secundarias. Aunque los contraelectrodos 731-734 residen en un lado de la zona 710 principal y los electrodos 741-744 de trabajo residen en el otro lado, la disposición puede mezclarse. Por ejemplo, las primeras dos regiones de análisis secundarias llenadas por la muestra pueden ser electrodos de trabajo mientras que las segundas dos regiones de análisis secundarias llenadas por la muestra pueden ser contraelectrodos.

Un electrodo opcional, tal como un electrodo 770 de referencia, está presente en el extremo de la zona 710 principal opuesto al orificio 715 de muestras. El electrodo 770 de referencia también puede colocarse en la región secundaria más trasera en relación con donde la muestra se introduce o cerca del orificio 715 de muestras, por ejemplo. Por tanto, pueden colocarse uno o más electrodos de referencia en la zona 710 principal y/o regiones secundarias para proporcionar un potencial no variable al sistema. Al residir en un entorno sustancialmente aislado químicamente de las regiones secundarias, electrodos opcionales pueden proporcionar información de llenado o información sobre la muestra.

Un conductor 790 conectado eléctricamente a los contraelectrodo 731 se extiende en el interior de la zona 710 principal próxima al orificio 715 de muestras. Aunque no es independientemente direccionable, el conductor 790 puede

proporcionar información de llenado al dispositivo de medición. Son posibles otras configuraciones de electrodos y/o conductores. Cada región secundaria y el extremo de la zona 710 principal puede incluir un respiradero (no se muestra).

5 Los ocho electrodos 731-734 y 741-744 pueden direccionarse independientemente por el dispositivo de medición. Como las regiones secundarias están sustancialmente aisladas químicamente, cada una puede incluir una composición reactiva que proporciona una química diferente para interactuar con los componentes constitutivos de la muestra. Dado que la composición reactiva puede ser diferente para cada uno de los electrodos 741-744 de trabajo, el sistema de transferencia de carga puede ser diferente para cada uno de los contraelectrodos 731-734, y cada electrodo puede direccionarse independientemente, pueden ser posibles cuatro análisis diferentes cuando una única composición reactiva está presente en cada uno de los electrodos 741-744 de trabajo. De esta manera, cada composición reactiva de electrodo de trabajo puede usarse con un contraelectrodo dedicado. De manera similar, si cada uno de los electrodos 741-744 de trabajo estuviera dotado de dos composiciones reactivas que tienen diferentes potenciales de reducción-oxidación, puede ser posible un total de ocho análisis diferentes. Finalmente, al dotar a cada electrodo de trabajo de cuatro composiciones reactivas que tienen diferentes potenciales de reducción-oxidación se pueden proporcionar hasta dieciséis análisis diferentes, dado que cada electrodo de trabajo puede direccionarse independientemente con cada uno de los cuatro contraelectrodos. Consideraciones prácticas, tales como una interacción no deseada entre más de una composición reactiva en un electrodo de trabajo, pueden limitar el número de análisis reales que pueden realizarse por el sistema. Pueden usarse otras construcciones de depósito de muestras y configuraciones de electrodo.

20 La figura 8A representa una realización de la presente invención, es decir, una variación del sensor de prueba de la figura 7A en donde se conectan eléctricamente múltiples electrodos 841-844 de trabajo. Los contraelectrodos permanecen independientemente direccionables. De esta manera, cada contraelectrodo puede proporcionar un potencial diferente a los electrodos de trabajo conectados eléctricamente. Conectando eléctricamente uno o más de los electrodos de trabajo, el electrodo de trabajo que tiene un potencial de reducción-oxidación más próximo al del potencial del contraelectrodo seleccionado puede operar. En este modo de operación, cada electrodo de trabajo puede tener un sistema de mediador diferente, teniendo cada sistema de mediador un potencial de reducción-oxidación diferente. Al escalonar el potencial de funcionamiento del sistema de bajo a alto usando los potenciales diferentes de los contraelectrodos, el sistema de mediadores diferente de los electrodos de trabajo puede direccionarse de manera progresiva. Pueden usarse otras construcciones de depósito de muestras y configuraciones de electrodos.

30 La figura 8B (no según la presente invención) representa una variación de la figura 7A en donde múltiples contraelectrodos 831-834 se conectan eléctricamente. Los electrodos de trabajo permanecen independientemente direccionables. Conectando eléctricamente uno o más de los contraelectrodos, el contraelectrodo que tiene un sistema de transferencia de carga con el potencial más elevado puede proporcionar el potencial al sistema. De esta manera, puede medirse la electroquímica sensible al analito en cada electrodo de trabajo. Pueden usarse otras construcciones de depósito de muestras y configuraciones de electrodo.

Con respecto a los sensores de prueba anteriormente descritos, los electrodos de trabajo y los contraelectrodos presentes en las regiones de análisis secundarias pueden separarse por 1.000 micrómetros o más. También pueden usarse distancias de separación de electrodos menores de 1.000 micrómetros. El patrón de los electrodos no se limita a los mostrados en las figuras, siendo, en su lugar, cualquier patrón compatible con la zona principal y regiones de análisis secundarias del sensor de prueba. Preferiblemente, los electrodos se forman por una deposición rectangular de la composición reactiva y/o un sistema de transferencia de carga. La deposición puede realizarse mediante impresión serigráfica, inyección de tinta, micropipeteo, deposición con aguja, u otros métodos.

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

50 Además de los electrodos de trabajo y los contraelectrodos, los sensores de prueba pueden incluir electrodos de referencia que proporcionan un potencial de referencia no variable al sistema. Aunque se conocen múltiples materiales de electrodos de referencia, una mezcla de plata (Ag) y cloruro de plata (AgCl) es típica debido a la insolubilidad del metal y su sal correspondiente en el entorno acuoso de la muestra. Dado que la relación de Ag metal con respecto a Cl<sup>-</sup> no cambia significativamente en la muestra, el potencial del electrodo no cambia significativamente. Si aumenta de tamaño y/o se modifica con un metal conductor, también puede usarse un electrodo de referencia como contraelectrodo porque hará pasar la corriente. Sin embargo, un contraelectrodo puede no servir como electrodo de referencia porque está desprovisto de la capacidad para aislar la semicelda que proporciona el potencial de referencia de la disolución de muestra.

60 Los conductores que forman los electrodos pueden residir en uno o más sustratos, dependiendo de la disposición de los electrodos. El sustrato puede estar realizado de cualquier material que sea compatible con la formación y operación del biosensor. Materiales preferidos para el sustrato incluyen tereftalato de polietileno (PET), policarbonato (PC),

poliimida (PI), polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), cloruro de polivinilo (PVC), polioximetileno (POM), monómero fundido de nailon (MC), tereftalato de polibutileno (PBT), una resina polimetacrílica (PMMA), una resina ABS (ABS), y vidrio. Materiales más preferidos a partir de los que formar uno o más sustratos incluyen tereftalato de polietileno (PET), policarbonato (PC), y poliimida (PI), prefiriéndose el tereftalato de polietileno (PET) en el presente documento. Para formar un sensor de prueba, pueden combinarse dos sustratos en forma de una base y una tapa para formar un depósito de muestras que tiene al menos un orificio de muestras y al menos un respiradero. Conductores, separadores, y otros componentes pueden residir entre los sustratos.

El material o materiales usados para formar los conductores en el uno o más sustratos pueden incluir cualquier conductor eléctrico. Los conductores eléctricos preferidos no son ionizantes, de manera que el material no se somete a una oxidación neta o una reducción neta durante el análisis de la muestra. Los conductores pueden realizarse a partir de materiales tales como metales sólidos, pastas de metal, carbono conductor, pastas de carbono conductor, polímeros conductores, y similares. Los conductores incluyen, preferiblemente, una capa delgada de una pasta de metal o metal, tal como oro, plata, platino, paladio, cobre, o tungsteno. Puede depositarse un conductor de superficial en la totalidad o una parte del conductor. El material de conductor superficial incluye, preferiblemente, carbono, oro, platino, paladio, o combinaciones de los mismos. Si un conductor superficial no está presente en un conductor, el conductor se realiza, preferiblemente, de un material no ionizante.

El conductor y material de conductor superficial opcional pueden depositarse en el sustrato mediante cualquier medio compatible con el funcionamiento del sensor de prueba, lo que incluye deposición de láminas, deposición de vapores químicos, deposición de pasta líquida abrasiva, metalización, y similares. En otro aspecto, los conductores pueden formarse procesando una capa conductora para dar un patrón que usa técnicas de láser y/o máscara.

La composición o composiciones reactivas usadas para formar los electrodos pueden depositarse en forma sólida, semisólida, líquida, gel, gelular, coloidal, u otra forma y pueden incluir reactivos y opcionalmente un aglutinante. Las composiciones reactivas pueden tener viscosidades que oscilan entre aproximadamente 1 cp y aproximadamente 100 cp. Composiciones reactivas más preferidas presentan viscosidades que oscilan entre aproximadamente 1 cp y aproximadamente 20 cp o entre aproximadamente 4 cp y aproximadamente 10 cp. Pueden usarse composiciones reactivas con otras viscosidades. Las viscosidades se determinaron con un viscosímetro Brookfield modelo DV3 equipado con un conjunto ULA para medir composiciones reactivas que tienen viscosidades inferiores a 300 cp. Las mediciones de la viscosidad se realizaron a temperatura ambiente con la temperatura de instrumento configurada a 25° C. Las mediciones se realizaron con tasas de cizalladura de 50, 100, 200 y 300 cps (ciclo por segundo) para proporcionar una indicación de si la composición se cizalla delgada o gruesa. Se usó una disolución de tampón fosfato de 100 mM como control, que, normalmente, aportó lecturas de viscosidad en el intervalo entre aproximadamente 1 y aproximadamente 1,3 cp bajo diferentes tasas de cizalladura.

El aglutinante es, preferiblemente, un material polimérico que es soluble en agua al menos parcialmente. El aglutinante puede formar un material de gel o similar a gel material cuando se hidrata. Materiales poliméricos parcialmente solubles en agua adecuados para usarse como aglutinante pueden incluir óxido de polietileno (PEO), carboximetil celulosa (CMC), alcohol polivinílico (PVA), hidroxietilén celulosa (HEC), hidroxipropil celulosa (HPC), metil celulosa, etil celulosa, etil hidroxietil celulosa, carboximetil etil celulosa, polivinilpirrolidona (PVP), poliaminoácidos, tales como polilisina, sulfonato de poliestireno, gelatina y derivados de los mismos, ácido poliacrílico y derivados y sales del mismo, ácido polimetacrílico y derivados y sales del mismo, almidón y derivados del mismo, anhídrido maleico y sales del mismo, geles con base de agarosa y derivados del mismo. El aglutinante puede incluir uno o más de estos materiales en combinación. Entre los materiales de aglutinante anteriores, se prefieren PEO, PVA, CMC, y HEC, siendo CMC el más preferido en el presente documento para biosensores. Pueden usarse otros aglutinantes.

Se prefieren los aglutinantes que tienen pesos moleculares de 10.000 a 900.000, y preferiblemente de 30.000 a 300.000 (promedio en peso). Pueden usarse aglutinantes que tienen otros pesos moleculares. Los pesos moleculares pueden determinarse por cromatografía por exclusión de tamaño (SEC), y se expresan, generalmente, como promedios en peso o promedios en número.

La composición reactiva usada para formar el electrodo de trabajo incluye, preferiblemente, una biomolécula sensible al analito de interés. Las biomoléculas pueden incluir sistemas enzimáticos activos, tales como oxidoreductasas. Las biomoléculas también pueden incluir biopolímeros, tales como ácidos nucleicos, proteínas, y péptidos. Pueden usarse otras biomoléculas.

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

Tabla I

Oxidoreductasa	Analito
Glucosa deshidrogenasa	$\beta$ -glucosa
Glucosa oxidasa	$\beta$ -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
Glutación reductasa	NAD(P)H
Monóxido de carbono oxidoreductasa	Monóxido de carbono

Las biomoléculas pueden incluir grupos funcionales amina que pueden realizar interacciones por enlace de hidrógeno. Se prefieren biomoléculas que tienen pesos promedio en peso molecular de 10.000 a 500.000 y preferiblemente de 100.000 a 400.000 que mantienen la actividad biológica tras la deposición. En el caso de oxidoreductasas, pueden usarse de 0,01 a 100 unidades (U), preferiblemente de 0,05 a 10 U, y más preferiblemente de 0,1 a 5 U por sensor de prueba o análisis. En otro aspecto, se usa como máximo 1,3 U de la oxidoreductasa.

La capa de reactivo formada a partir de la deposición de la composición reactiva en el conductor puede incluir un sistema enzimático específico para el analito que puede facilitar la reacción del analito al tiempo que mejora la especificidad del sistema de sensor con respecto al analito, especialmente en muestras biológicas complejas. El sistema enzimático puede incluir una o más enzimas, cofactores, y/u otras porciones que participen en la reacción de oxidoreducción con el analito. Por ejemplo, puede usarse un alcohol oxidasa para proporcionar un biosensor que sea sensible a la presencia de alcohol en una muestra. Un sistema de este tipo puede ser útil para medir concentraciones de alcohol en sangre. En otro ejemplo, puede usarse glucosa deshidrogenasa o glucosa oxidasa para proporcionar un biosensor que sea sensible a la presencia de glucosa en una muestra. Este sistema puede ser útil para medir concentraciones de glucosa en sangre, por ejemplo, en pacientes que se conoce o que se sospecha que padecen diabetes.

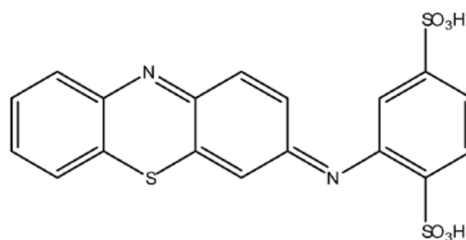
Los sistemas enzimáticos preferidos son independientes de oxígeno, por tanto, no se oxidan sustancialmente mediante oxígeno. Una de tales familias de enzimas independientes de oxígeno es la glucosa deshidrogenasa (GDH). Al usar diferentes coenzimas o cofactores, la GDH puede estar mediada de una manera diferente por diferentes mediadores. Dependiendo de su asociación con GDH, un cofactor, tal como flavina adenina dinucleótido (FAD), puede mantenerse firmemente por la enzima huésped, tal como en el caso de FAD-GDH; o un cofactor, tal como pirroloquinolinaquinona (PQQ), puede enlazarse de manera covalente a la enzima huésped, tal como con PQQ-GDH. El cofactor en cada uno de estos sistemas enzimáticos puede o bien mantenerse de manera permanente por la enzima huésped o la coenzima y la apoenzima pueden reconstituirse antes de añadir el sistema enzimático a la composición reactiva. La coenzima también puede añadirse de manera independiente a la porción de enzima huésped en la composición reactiva para ayudar a la función catalítica de la enzima huésped, tal como en los casos de nicotinamida adenina dinucleótido NAD/NADH<sup>+</sup> o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato NADP/NADPH<sup>+</sup>. Otros sistemas enzimáticos de deshidrogenasa útiles incluyen alcohol deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa,  $\beta$ -hidroxibutirato deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa, formaldehído deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, y 3-hidroxiesteroide deshidrogenasa.

La capa de reactivo también puede incluir un mediador para comunicar los resultados de la reacción de analito al conductor. Los mediadores pueden oxidarse o reducirse y pueden transferir uno o más electrones. Un mediador es un reactivo en un análisis electroquímico y no es el analito de interés, pero permite la medición indirecta del analito. En un sistema sencillo, el mediador experimenta una reacción de oxidoreducción en respuesta a la oxidación o reducción del analito. El mediador oxidado o reducido experimenta entonces la reacción opuesta en el electrodo de trabajo del sensor de prueba y puede regenerarse a su número de oxidación original. Por tanto, el mediador puede facilitar la transferencia de electrones desde el analito hasta el electrodo de trabajo.

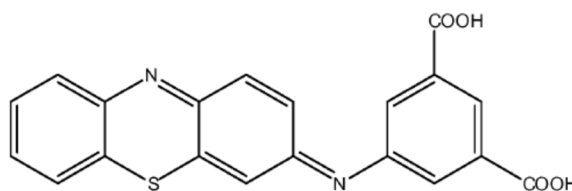
Los mediadores pueden separarse en dos grupos basándose en su actividad electroquímica. Los mediadores de transferencia de un electrón son porciones químicas capaces de aceptar un electrón adicional durante las condiciones de la reacción electroquímica. Los mediadores de transferencia de múltiples electrones son porciones químicas capaces de aceptar más de un electrón durante las condiciones de la reacción. Tal como se representa en la figura 9A, los mediadores de transferencia de un electrón pueden transferir un electrón de la enzima al electrodo de trabajo, mientras que, tal como se representa en la figura 9B, un mediador de transferencia de múltiples electrones puede transferir dos electrones.

Ejemplos de mediadores de transferencia de un electrón incluyen compuestos, tales como 1,1'-dimetil ferroceno, ferrocianuro y ferricianuro, y hexaamina de rutenio (III) y rutenio (II). Los mediadores de dos electrones incluyen las quinonas e hidroquinonas orgánicas, tales como fenantrolina quinona; derivados de fenotiazina y fenoxazina; 3-(fenilamino)-3H-fenoxazinas; fenotiazinas; y 7-hidroxi-9,9-dimetil-9H-acridin-2-ona y sus derivados. Algunos ejemplos de mediadores de dos electrones adicionales incluyen las moléculas orgánicas electroactivas que se describen en los documentos de patente estadounidense n.º 5.393.615; 5.498.542; y 5.520.786 que se incorporan en el presente documento a modo de referencia, por ejemplo.

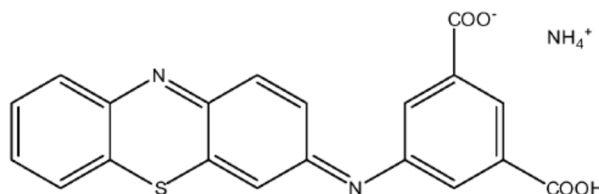
Los mediadores de transferencia de dos electrones preferidos incluyen 3-fenilimino-3H-fenotiazinas (PIPT) y 3-fenilimino-3H-fenoxazinas (PIPO). Los mediadores de dos electrones más preferidos incluyen el ácido carboxílico o una sal, tal como sales de amonio, de derivados de fenotiazina. En el presente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



Estructura I



Estructura II



Estructura III

A otro respecto, mediadores de transferencia de dos electrones preferidos tienen un potencial de reducción-oxidación que es al menos 100 mV más bajo, más preferiblemente al menos 150 mV más bajo, que el ferricianuro.

El sistema de transferencia de carga es cualquiera o una combinación de especie electroquímicamente activa que puede transferir uno o más electrones desde o hasta un contraelectrodo. Por ejemplo, si el electrodo de trabajo de un sistema transfiere electrones a un contraelectrodo a través del dispositivo de medición, el sistema de transferencia de carga del contraelectrodo acepta electrones desde el contraelectrodo para permitir la medición de flujo de corriente a

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

Dado que la reacción electroquímica con el potencial más bajo se producirá en primer lugar, al dotar a los electrodos de trabajo de uno o más biomoléculas sensibles a analitos, tal como una oxidoreductasa, y/o mediadores que transportan carga a potenciales en aumento, la electroquímica de múltiples electrodos de trabajo puede analizarse de manera secuencial desde el potencial de funcionamiento más bajo al más elevado. Si los electrodos de trabajo y los contraelectrodos pueden direccionarse independientemente, un electrodo de trabajo que tiene un potencial de reducción-oxidación específico con un analito se puede emparejar de manera selectiva con un contraelectrodo que tiene el potencial deseado. Si los potenciales de reducción-oxidación del analito, biomolécula sensible a analito, y/o el mediador en los electrodos de trabajo independientemente direccionables son diferentes, pueden medirse señales de salida independientes para análisis individuales cuando se usan contraelectrodos conectados eléctricamente. Por el contrario, si los potenciales de reducción-oxidación de la especie de transferencia de carga en los contraelectrodos independientemente direccionables son diferentes, pueden medirse señales de salida individuales para análisis individuales cuando se usan electrodos de trabajo conectados eléctricamente. Cuando múltiples contraelectrodos tienen diferentes especies de transferencia de carga, pero se conectan eléctricamente, el contraelectrodo que tiene el potencial más elevado proporcionará el potencial de funcionamiento al electrodo de trabajo hasta que el potencial del sistema cae al del siguiente contraelectrodo de potencial más elevado.

La figura 10A (no según la presente invención) representa un sistema que tiene tres contraelectrodos (CE<sub>1</sub>-CE<sub>3</sub>) independientemente direccionables, operando cada uno a un potencial diferente, y tres electrodos de trabajo conectados eléctricamente, teniendo cada uno un sistema de mediador que opera a un potencial diferente. A medida que aumenta el potencial de funcionamiento del sistema en los contraelectrodos CE<sub>1</sub> a CE<sub>3</sub>, las características de reducción-oxidación de los mediadores (Med<sub>1</sub>-Med<sub>3</sub>) en los electrodos de trabajo conectados eléctricamente pueden medirse de manera independiente. Por ejemplo, cuando CE<sub>1</sub> se acopla con el electrodo de trabajo, Med<sub>1</sub> reacciona en el electrodo. Cuando CE<sub>2</sub> se acopla con el electrodo de trabajo, Med<sub>1</sub> y Med<sub>2</sub> reaccionan en el electrodo. Finalmente, cuando CE<sub>3</sub> se acopla con el electrodo de trabajo, pueden reaccionar los tres sistemas de mediador en el electrodo de trabajo.

Pueden proporcionarse múltiples potenciales de funcionamiento al sistema alterando el sistema de transferencia de carga depositado en diferentes conductores para formar contraelectrodos. El potencial proporcionado por un contraelectrodo específico puede alterarse con sistemas de transferencia de carga que incluyen diferentes especies de reducción-oxidación (porciones que pueden oxidarse y/o reducirse) y/o diferentes relaciones de los pares de conjugados de reducción-oxidación (porciones reducidas y oxidadas de las mismas especies de reducción-oxidación) de una especie de reducción-oxidación, tales como ferrocianuro/ferricianuro. Ejemplos de diferentes especies de reducción-oxidación para su uso en sistemas de transferencia de carga incluyen especies de reducción-oxidación soluble o no solubles, en donde las especies de reducción-oxidación solubles son solubles en agua (pH 7, 25° C) a un nivel de al menos 1,0 gramo por litro y excluyen metales elementales e iones de metal solos que son insolubles o moderadamente solubles en agua. Especies de reducción-oxidación útiles incluyen moléculas orgánicas electroactivas, complejos metálicos de organotransición, y complejos de coordinación de metal de transición. A diferencia de los complejos metálicos de organotransición y los complejos de coordinación que contienen metal, las moléculas orgánicas electroactivas están desprovistas de metal que pueda experimentar oxidación o reducción. Especies de reducción-oxidación preferidas para su uso en sistemas de transferencia de carga incluyen hexaamina de rutenio (III), ferricianuro, y moléculas orgánicas electroactivas, tales como PIPT y PIPO. La figura 10B muestra voltamogramas cíclicos de hexaamina de rutenio (III), ferricianuro, y las moléculas orgánicas electroactivas representadas anteriormente en la estructura I/II/III. Tal como se observa en el gráfico, las posiciones de potencial relativo de cada especie de reducción-oxidación están separadas por aproximadamente 200 mV.

Ejemplos de diferentes relaciones de pares de conjugados de reducción-oxidación son la relación de ferrocianuro con respecto a ferricianuro en el sistema de transferencia de carga. Por ejemplo, una relación de 9,5:0,5 puede usarse para el contraelectrodo de potencial más bajo, mientras que las relaciones de 8:2, 5:5, 2:8, y 0,5:9,5 pueden usarse para proporcionar contraelectrodos que tienen potenciales de funcionamiento con aumento progresivo. El ferricianuro puro puede usarse para proporcionar un contraelectrodo que tiene el potencial de funcionamiento más elevado para los seis contraelectrodos. De esta manera, se pueden formar seis contraelectrodos independientemente direccionables usando diferentes relaciones de pares de conjugados de reducción-oxidación, proporcionando cada uno un potencial diferente al sistema. Por tanto, las diferencias de potencial menores que las obtenibles con diferentes especies de reducción-oxidación, tales como al menos 50 mV, o al menos 100 mV, pueden obtenerse usando diferentes relaciones de los pares conjugados de una especie de reducción-oxidación.

La relación de potencial de contraelectrodo de funcionamiento frente a conjugado de reducción-oxidación por relación se caracteriza por la ecuación de Nernst y se muestra en la figura 10C. Dependiendo de si la oxidación o reducción se produce en el contraelectrodo durante el análisis, el potencial deseado puede proporcionarse al contraelectrodo seleccionando el conjugado de reducción-oxidación apropiado por relación para el sistema de transferencia de carga depositado. Al seleccionar diferentes relaciones de los pares de conjugados de reducción-oxidación para los sistemas



de transferencia de carga, el potencial del sistema de transferencia de carga puede hacerse variar aproximadamente  $\pm 150$  mV para diferentes relaciones de ferrocianuro/ferricianuro. Por tanto, además del uso de diferentes especies de reducción-oxidación para proporcionar diferentes potenciales de funcionamiento a múltiples contraelectrodos, pueden usarse diferentes relaciones de los conjugados de las especies de reducción-oxidación. El aislamiento químico sustancial, tal como puede proporcionarse por la separación física entre las regiones secundarias, permite que los diferentes sistemas de transferencia de carga de cada contraelectrodo proporcionen diferentes potenciales de funcionamiento al sistema durante el análisis.

La figura 10D representa una circunstancia en la que los sistemas de transferencia de carga de múltiples contraelectrodos ( $CE_1$ - $CE_3$ ) independientemente direccionables proporcionan diferentes potenciales de funcionamiento absolutos, tales como -200 mV, 0 mV, y +200 mV, al tiempo que mantienen sustancialmente el mismo potencial de funcionamiento relativo de 0,4 V entre los electrodos de trabajo y contraelectrodos. A la pareja de reducción-oxidación central se le puede asignar de manera aleatoria un potencial fijo de cero contra un electrodo de hidrógeno convencional, un electrodo de calomelanos saturado, o similares. Por tanto, la hexaamina de rutenio tiene un potencial de reducción-oxidación que es aproximadamente 200 mV más bajo y el ferricianuro tiene un potencial de reducción-oxidación que es aproximadamente 200 mV mayor que de la molécula de la estructura I/II/III. Al operar los contraelectrodos a diferentes potenciales de funcionamiento absolutos en relación con un potencial conocido, el sistema puede analizar de manera independiente los diferentes sistemas de mediador ( $Med_1$ - $Med_3$ ) en los electrodos  $WE_1$  a  $WE_3$  de trabajo conectados eléctricamente.

La figura 10E muestra voltamograma cíclicos que establecen los diferentes potenciales de funcionamiento que pueden proporcionarse a uno o más electrodos de trabajo mediante múltiples contraelectrodos independientemente direccionables. Se fabricó un sensor de prueba que tiene un diseño de múltiples T con ocho regiones de análisis secundarias, tal como se representó anteriormente en la figura 3I. Se dotaron cuatro de las regiones de análisis secundarias de electrodos de trabajo independientemente direccionables y se dotaron cuatro de las regiones de análisis secundarias de contraelectrodos independientemente direccionables. Se formó cada electrodo de trabajo con una composición reactiva que incluye 0,5% peso/peso (p/p) de aglutinante HEC, 50 mM de la molécula de la estructura I, y 2 U/ $\mu$ L del sistema enzimático PQQ-GDH en un tampón fosfato de pH 7. Se formó el primer contraelectrodo con un sistema de transferencia de carga que incluye 0,5% (p/p) de aglutinante HEC y 100 mM hexaamina de rutenio en un tampón fosfato de pH 7. Se formó el segundo contraelectrodo con un sistema de transferencia de carga que incluye 0,5% (p/p) de aglutinante HEC y 100 mM de la molécula de la estructura I en tampón fosfato de pH 7. Se formaron los contraelectrodos tercero y cuarto con un sistema de transferencia de carga que incluye 0,5% (p/p) de aglutinante HEC y 100 mM de ferricianuro en tampón fosfato de pH 7.

Tras la introducción de una muestra que incluye 300 mg/dL de glucosa, se exploró el instrumento de CH a una velocidad de 25 mV/seg para uno de los electrodos de trabajo y cada uno de los contraelectrodos primero, segundo, y tercero. Tal como se muestra en la figura 10B, el potencial del contraelectrodo de hexaamina de rutenio, la línea 1010, presenta un pico en un potencial aproximadamente 400 mV mayor que el ferricianuro, línea 1030, presentando un pico la molécula de la estructura I aproximadamente en el medio, línea 1020. De esta manera, los resultados observados para los voltamogramas cíclicos de la figura 10B se reprodujeron en un diseño de sensor de prueba de múltiples T que tiene múltiples regiones de análisis secundarias. Por tanto, se demostró la capacidad del sensor de prueba para funcionar a múltiples potenciales usando múltiples contraelectrodos con diferentes sistemas de transferencia de carga.

La figura 11A establece que los sistemas de transferencia de carga de la figura 10E pueden sustituirse por múltiples relaciones de pares conjugados de reducción-oxidación para proporcionar múltiples potenciales al sistema. Se preparó un sensor de prueba tal como en la figura 10E, pero se formó el primer contraelectrodo con un sistema de transferencia de carga que incluye 0,5% (p/p) de aglutinante HEC y una proporción 1:9 de ferricianuro:ferrocianuro 200 mM en tampón fosfato de pH 7, se formó el segundo contraelectrodo con un sistema de transferencia de carga que incluye 0,5% (p/p) de aglutinante HEC y una proporción 1:1 de ferricianuro:ferrocianuro 200 mM en tampón fosfato de pH 7, se formó el tercer contraelectrodo con un sistema de transferencia de carga que incluye 0,5% (p/p) de aglutinante HEC y una proporción 9:1 de ferricianuro:ferrocianuro 200 mM en un tampón fosfato de pH 7, y se formó el cuarto contraelectrodo con un sistema de transferencia de carga que incluye 0,5% (p/p) de aglutinante HEC y ferricianuro 200 mM sustancialmente puro en tampón fosfato de pH 7.

Tras la introducción de una muestra que incluye 300 mg/dL de glucosa, se exploró el instrumento a una velocidad de 25 mV/seg para uno de los electrodos de trabajo y cada uno de los contraelectrodos primero, segundo, tercero, y cuarto. La figura 11A mostró que el primer contraelectrodo presentaba un pico de potencial de aproximadamente 0,149 V ( $W1$ - $C1$ ), que el segundo contraelectrodo presentaba un pico de potencial de aproximadamente 0,060 V ( $W2$ - $C2$ ), que el tercero contraelectrodo mostraba un pico de potencial de aproximadamente -0,007 V ( $W3$ - $C3$ ), y que el cuarto contraelectrodo presentaba un pico de potencial de aproximadamente -0,047 V ( $W4$ - $C4$ ). Por tanto, se demostró la capacidad del sensor de prueba para operar a múltiples potenciales usando múltiples contraelectrodos con sistemas de transferencia de carga basándose en diferentes relaciones de un par conjugado de reducción-oxidación.

La figura 11B representa los perfiles de corriente obtenidos cuando el potencial en un electrodo de trabajo sustancialmente aislado químicamente se controla de manera repetida en secuencia mediante tres contraelectrodos independientemente direccionables y sustancialmente aislados químicamente, teniendo cada uno un potencial

diferente proporcionado por diferentes sistemas de transferencia de carga. Se preparó un sensor de prueba tal como en la figura 10E, pero los múltiples electrodos de trabajo se sustituyeron por un único electrodo de trabajo. Se obtuvo un primer pico 1110 en cada una de las seis series de tres picos a partir del primer contraelectrodo, se obtuvo un segundo pico 1120 en cada una de las seis series de tres picos a partir del segundo contraelectrodo, y se obtuvo un tercer pico 1130 en cada una de las seis series de tres picos a partir del tercer contraelectrodo. Los primeros picos 1110 demostraron el nivel de corriente obtenido a partir del uso de hexaamina de rutenio como sistema de transferencia de carga en el primer contraelectrodo. Los segundos picos 1120 demostraron el nivel de corriente obtenido a partir del uso de la molécula de la estructura I como sistema de transferencia de carga en el segundo contraelectrodo. Los terceros picos 1130 demostraron el nivel de corriente obtenido a partir del uso de ferricianuro como sistema de transferencia de carga en el tercer contraelectrodo. De esta manera, para el mismo potencial, diferentes potenciales de contraelectrodo direccionarán diferentes puntos de oxidación de la misma onda de oxidación. Por tanto, además de demostrar la capacidad de los múltiples contraelectrodos para controlar el potencial de funcionamiento en el electrodo de trabajo, se estableció la capacidad del sistema para llevar a cabo tres análisis diferentes en el electrodo de trabajo con una señal de entrada con desconexión cíclica.

La figura 12A representa una representación esquemática de un sistema 1200 de biosensor (no según la presente invención) que determina una concentración de analito en una muestra de un fluido biológico usando una señal de entrada. El sistema 1200 de biosensor incluye un dispositivo 1202 de medición y un sensor 1204 de prueba, que pueden implementarse en un instrumento de análisis, que incluye un dispositivo de sobremesa, un dispositivo portátil o manipulado por las manos, o similares. El sistema 1200 de biosensor puede utilizarse para determinar concentraciones de analito, que incluyen aquellas de glucosa, ácido úrico, lactato, colesterol, bilirrubina, y similares.

Aunque se muestra una configuración particular, el sistema 1200 de biosensor puede tener otras configuraciones, que incluyen aquellas con componentes adicionales. Por ejemplo, el sensor 1204 de prueba puede adaptarse para su uso fuera, dentro, o parcialmente dentro de un organismo vivo. Cuando se usa fuera de un organismo vivo, se introduce una muestra del fluido biológico en un depósito de muestras en el sensor 1204 de prueba. El sensor 1204 de prueba puede colocarse en el dispositivo de medición antes, después, o durante la introducción de la muestra para su análisis. Cuando se encuentra dentro o parcialmente dentro de un organismo vivo, un sensor de prueba puede sumergirse de manera continua en la muestra o la muestra puede introducirse de manera intermitente en el sensor.

El sensor 1204 de prueba tiene una base 1206 que forma un depósito 1208 con una abertura 1212. El depósito 1208 puede estar formado por una tapa con un respiradero. El depósito 1208 define un volumen parcialmente cerrado, pero puede abrirse para la muestra (no se muestra). Por tanto, la muestra puede fluir de manera continua a través del sensor de prueba o interrumpirse para el análisis.

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

La superficie 1214 de contacto de muestra tiene conductores 1290 conectados a al menos un electrodo de trabajo y al menos dos contraelectrodos. Los electrodos pueden estar sustancialmente en el mismo plano o en más de un plano, tal como cuando se orientan. Los electrodos pueden disponerse en una superficie de la base 1206 que forma el depósito 1208. Los electrodos pueden extenderse o sobresalir al interior del depósito 1208. Asimismo, uno o más de los conductores 1290 puede extenderse al interior del depósito 1208 para proporcionar una funcionalidad no proporcionada por los electrodos. Una capa dieléctrica puede cubrir parcialmente los conductores y/o los electrodos. Los contraelectrodos pueden usarse para equilibrar el potencial en uno o más electrodo de trabajo durante el análisis. El potencial de equilibrio puede proporcionarse formando el contraelectrodo a partir de un material inerte, tal como carbono, e incluyendo una especie de reducción-oxidación soluble, tal como ferricianuro, dentro del depósito 1208. Alternativamente, el potencial de equilibrio puede ser un potencial de referencia logrado formando el contraelectrodo a partir de una pareja de reducción-oxidación de referencia, tal como Ag/AgCl, para proporcionar un contraelectrodo de referencia combinado. La superficie 1214 de contacto de muestra puede tener otros electrodos y conductores.

El dispositivo 1202 de medición incluye un sistema 1216 de circuitos eléctricos conectado a una interfaz 1218 de sensor y un elemento 1220 de visualización. El sistema 1216 de circuitos eléctricos incluye un procesador 1222 conectado a un generador 1224 de señal, un sensor 1226 de temperatura opcional, y un medio 1228 de almacenamiento.

El generador 1224 de señal proporciona una señal eléctrica de entrada a la interfaz 1218 de sensor en respuesta al procesador 1222. La señal eléctrica de entrada puede transmitirse por la interfaz 1218 de sensor a la superficie 1214

de contacto de muestra para aplicar la señal eléctrica de entrada a la muestra del fluido biológico. La señal eléctrica de entrada puede transmitirse a través de la totalidad o una parte de los conductores 1290 en la superficie 1214 de contacto de muestra. La señal eléctrica de entrada puede ser un potencial o corriente y puede ser constante, variable, o una combinación de las mismas, tal como cuando una señal de CA se aplica con un desvío de señal de CC. La señal eléctrica de entrada puede aplicarse como un único pulso o en múltiples pulsos, secuencias, o ciclos. El generador 1224 de señal también puede registrar una señal de salida procedente de la interfaz de sensor como un generador-registrador.

El generador 1224 de señal puede incluir el potencióstato de la figura 12B, que puede conmutar entre múltiples electrodos de trabajo independientemente direccionables y los contraelectrodos, o puede incluir los múltiples sistemas de potencióstato de la figura 12C. la figura 12D representa un potencióstato que puede implementarse en el generador de señal para conmutar entre cuatro contraelectrodos y un electrodo de trabajo conectado eléctricamente. La figura 12E representa un potencióstato implementado para conmutar entre cuatro electrodos de trabajo y un contraelectrodo conectado eléctricamente. La figura 12F representa un potencióstato implementado para conmutar entre cuatro electrodos de referencia y un electrodo de trabajo conectado eléctricamente. El uno o más potencióstatos pueden proporcionar diferentes potenciales de funcionamiento a la superficie 1214 de contacto de muestra. El generador 1224 de señal puede estar configurado de manera que un generador de función activa entradas de onda con desconexión cíclica al potencióstato. El generador 1224 de señal puede tener otras configuraciones.

El sensor 1226 de temperatura opcional determina la temperatura de la muestra en el depósito del sensor 1204 de prueba. La temperatura de la muestra puede medirse, calcularse a partir de la señal de salida, o asumirse que es igual o similar a una medición de la temperatura ambiente o la temperatura de un dispositivo que implementa el sistema de biosensor. La temperatura puede medirse usando un termistor, termómetro, u otro dispositivo de detección de temperatura. Pueden usarse otras técnicas para determinar la temperatura de la muestra.

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

El procesador 1222 implementa el análisis de analito y el tratamiento de datos usando códigos y datos de software legibles por ordenador almacenados en el medio 1228 de almacenamiento. el procesador 1222 puede comenzar el análisis del analito en respuesta a la presencia del sensor 1204 de prueba en la interfaz 1218 de sensor, la aplicación de una muestra al sensor 1204 de prueba, en respuesta a una entrada de usuario, o similares. El procesador 1222 controla el generador 1224 de señal para proporcionar la señal eléctrica de entrada a la interfaz 1218 de sensor. El procesador 1222 puede recibir la temperatura de la muestra a partir del sensor 1226 de temperatura opcional.

El procesador 1222 recibe la señal de salida procedente de la interfaz 1218 de sensor. La señal de salida se genera en respuesta a la reacción de oxidoreducción de la especie que puede medirse en la muestra. La señal eléctrica de salida procedente del sensor de prueba puede ser una corriente (generada por amperimetría o voltamperometría), un potencial (generado por potenciometría/galvanometría), o una carga acumulada (generada por coulombimetría). La señal de salida está correlacionada con la concentración de uno o más analitos en la muestra usando una o más ecuaciones de correlación en el procesador 1222. Los resultados del análisis del analito pueden emitirse al elemento 1220 de visualización y pueden almacenarse en el medio 1228 de almacenamiento.

Las ecuaciones de correlación entre las concentraciones de analito y las señales de salida pueden representarse de manera gráfica, matemática, una combinación de las mismas, o similares. Las ecuaciones de correlación pueden representarse por una tabla de número de programa (PNA), otra tabla de consulta, o similares que se almacenan en el medio 1228 de almacenamiento. las instrucciones relacionadas con la implementación del análisis del analito pueden proporcionarse por el código de software legible por ordenador almacenado en el medio 1228 de almacenamiento. El código puede ser un código de objeto o cualquier otro código que describe o controla la funcionalidad descrita en el presente documento. Los datos procedentes del análisis del analito pueden someterse a uno o más tratamientos de datos, que incluyen la determinación de tasas de decaimiento, constantes K, relaciones, y similares en el procesador 1222.

La interfaz 1218 de sensor tiene contactos 1295 que se conectan o se comunican eléctricamente con los conductores 1290 en la superficie 1214 de contacto de muestra del sensor 1204 de prueba. La interfaz 1218 de sensor transmite la señal eléctrica de entrada desde el generador 1224 de señal a través de un conector en la interfaz 1218 de sensor hasta los contactos 1295 en la superficie 1214 de contacto de muestra. La interfaz 1218 de sensor también transmite la señal de salida desde la muestra a través de los contactos 1295 hasta el procesador 1222 y/o generador 1224 de señal.

El elemento 1220 de visualización puede ser analógico o digital. El elemento de visualización puede ser una pantalla LCD adaptada para visualizar una lectura numérica.

En uso, se transfiere una muestra líquida para análisis al depósito 1208 introduciendo el líquido en el orificio 1212 de muestras. La muestra líquida fluye a través del orificio 1212 de muestras, llenando el depósito 1208 al tiempo que

expulsa el aire anteriormente contenido. La muestra líquida reacciona químicamente con los reactivos depositados en las regiones de análisis secundarias del depósito 1208.

5 El sensor 1202 de prueba se dispone adyacente al dispositivo 1202 de medición. Adyacente incluye posiciones en las que la superficie 1214 de contacto de muestra está en comunicación eléctrica con la interfaz 1208 de sensor. La comunicación eléctrica incluye la transferencia de señales de entrada y/o de salida entre contactos en la interfaz 1218 de sensor y los conductores 1290 en la superficie 1214 de contacto de muestra.

10 La figura 13 representa un análisis 1300 electroquímico (no según la presente invención) para determinar la presencia y/o concentración de al menos un analito en una muestra. Al introducir las muestras 1310, la muestra se introduce al sensor de prueba. En la reacción 1320 de oxidoreducción, una parte del analito en la muestra experimenta una reacción de oxidoreducción. En transferencia 1330 de electrones, los electrones se transfieren, opcionalmente, desde el analito hasta un mediador. En una primera aplicación 1340 de señal de entrada, se aplica una señal de entrada entre un primer contraelectrodo y un electrodo de trabajo. En la segunda aplicación 1350 de señal de entrada, se aplica una señal de entrada de un potencial diferente entre un segundo contraelectrodo y un electrodo de trabajo. En la determinación 1350 de muestras, se determina la presencia y/o concentración de una o más especies que pueden medirse en la muestra a partir de una o más señales de salida, y en la transmisión 1360 de concentración de muestra, la concentración de especie que puede medirse determinada puede visualizarse, almacenarse, procesarse adicionalmente, y similares.

20 En la introducción 1310 de muestras, la muestra se introduce a la parte de sensor del sistema, tal como un sensor de prueba. El sensor de prueba incluye al menos un electrodo de trabajo y al menos dos contraelectrodos. Los electrodos pueden incluir una o más capas de composición reactiva. El electrodo de trabajo puede incluir una capa de barrera de difusión que es solidaria con una capa de composición reactiva o que es diferente de la capa de composición reactiva. La capa de barrera de difusión proporciona un espacio poroso que tiene un volumen interno en el que puede residir una especie que puede medirse. Los poros de la capa de barrera de difusión pueden seleccionarse de modo que la especie que puede medirse puede difundirse en la capa de barrera de difusión, al tiempo que componentes constitutivos de la muestra físicamente más grandes, tales como glóbulos rojos, se excluyen sustancialmente. Cuando el electrodo de trabajo incluye una capa de barrera de difusión diferente, la capa de reactivo puede o puede no disponerse en la capa de barrera de difusión. Dependiendo de la naturaleza del análisis 1300, los conductores pueden servir de electrodos. En este aspecto, los reactivos pueden estar presentes en la muestra, tal como si se depositaran adyacentes a los electrodos.

30 En la reacción 1320 de oxidoreducción de la figura 13, una parte del analito presente en la muestra es oxida o reduce química o bioquímicamente, tal como mediante una oxidoreductasa o especie similar. Esta reacción de oxidoreducción se produce cuando la muestra hidrata los reactivos. Tras la oxidación o reducción, opcionalmente, los electrones pueden transferirse entre el analito y un mediador en la transferencia 1330 de electrones. Por tanto, se forma una especie que puede medirse ionizada, tal como a partir del analito o un mediador, que tiene una concentración de muestra sensible al analito. Puede resultar beneficioso proporcionar un retardo de tiempo inicial, o "período de incubación" para que los reactivos reaccionen con el analito.

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

45 Además de la primera aplicación 1340 de señal de entrada, puede introducirse un potencial de sondeo inicial antes de la primera aplicación 1340 de señal de entrada para determinar la presencia de la muestra. Asimismo, puede aplicarse un potencial entre cualquier par de electrodos y/o conductores para eliminar material del electrodo y/o superficie de conductor, para alterar la química de un electrodo, o para oxidar o reducir una parte del sistema de transferencia de carga. Un potencial de este tipo puede aplicarse antes del análisis.

50 En la segunda aplicación 1350 de señal de entrada de la figura 13, el sistema aplica una segunda señal de entrada a un potencial diferente a la muestra usando un segundo contraelectrodo. La capacidad de seleccionar el potencial funcionamiento de múltiples electrodos de trabajo y/o la capacidad de seleccionar el potencial de funcionamiento de múltiples contraelectrodos dota al sistema de biosensor de la capacidad de realizar múltiples tipos de análisis. Durante un análisis, puede medirse el potencial entre cualquier par de múltiples electrodos de referencia, contraelectrodos y/o electrodos de trabajo para proporcionar una información útil. Al dotar al depósito de muestras de múltiples regiones de análisis secundarias llenadas de manera secuencial, el avance de llenado del depósito mediante la muestra puede monitorizarse usando las dos o más aplicaciones 1340, 1350 de señal de entrada.

55 En la determinación 1360 de muestra, el dispositivo de medición analiza señales de salida sensibles a las dos señales de entrada para determinar la presencia y/o concentración de al menos una especie que puede medirse en la muestra en cada potencial. Si la oxidoreductasa o especie similar usada en la reacción 1320 de oxidoreducción reacciona con un único analito, puede proporcionarse especificidad a una parte de la señal eléctrica generada. Dado que más de

una especie que puede medirse puede ionizarse por diferentes porciones de la señal de entrada, puede determinarse la presencia, y/o concentración de múltiples analitos, mediadores, interferentes, y similares. También pueden analizarse la corriente, tiempo, y/u otros valores adicionales. Por ejemplo, las corrientes determinadas para un analito, mediador, o interferente pueden modificarse con las corrientes determinadas para otro analito, mediador, o interferente para aumentar el rendimiento de medición del sistema.

Las señales de entrada con desconexión cíclica, tales como amperimétrica con desconexión cíclica, voltimétrica con desconexión cíclica, y/o las combinaciones de las mismas, pueden usarse para direccionar el potencial de un mediador específico y resolver el conjunto de ecuaciones lineales. Cuando se usa un sensor de prueba que tiene contraelectrodos independientes eléctricamente y electrodos de trabajo conectados eléctricamente, por ejemplo, pueden determinarse las concentraciones de tres especies que pueden medirse diferente resolviendo las ecuaciones (1) a (3):

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

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

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

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

La figura 14A representa la señal de entrada procedente de una secuencia de pulso amperimétrico con desconexión cíclica secuencial usada en combinación con un sensor de prueba que tiene electrodos de trabajo independientemente direccionables y contraelectrodos ( $WE_1$ - $WE_4$ ). En este ejemplo, un electrodo de trabajo opera a un tiempo, y la señal de entrada se introduce de manera secuencial en cada par de electrodos. De esta manera, no se requiere un potenciostato de múltiples potenciales para determinar la señal de salida de múltiples pares de electrodos. La figura 14B representa la señal de entrada procedente de una secuencia de pulso amperimétrico con desconexión cíclica simultánea usada en combinación con un sensor de prueba que tiene electrodos de trabajo independientemente direccionables y contraelectrodos ( $WE_1$ - $WE_4$ ). En este ejemplo los cuatro pares de electrodos se operan simultáneamente al mismo potencial para cada excitación. Aunque no se muestra en la figura, la señal de entrada puede aplicarse simultáneamente a dos o más de los electrodos al tiempo que se aplica de manera secuencial a otros electrodos.

Al conectar múltiples contraelectrodos independientemente direccionables a un conversor de corriente/tensión, las corrientes de salida resultantes de los análisis pueden medirse de manera independiente. Esta operación puede combinarse con una señal de entrada con desconexión cíclica en la que un contraelectrodo está desconectado, mientras que un segundo contraelectrodo está conectado. La cascada resultante de corrientes de medición de los contraelectrodos independientes proporciona una manera de analizar múltiples analitos y otros componentes de la muestra. Se pueden resolver combinaciones de ecuaciones lineales para determinar la concentración y/u otros parámetros de analitos individuales.

Las señales de entrada aplicadas pueden tener tensiones de 0,05 a 1,0 V, preferiblemente de 0,1 a 0,8 V, y más preferiblemente de 0,2 a 0,5 V. Las señales de entrada pueden proporcionarse durante una duración de desde 0,01 segundos hasta 3 minutos, dependiendo del analito o analitos de interés. Por ejemplo, un análisis de glucosa puede completarse en menos de 5 segundos mientras que otros analitos pueden beneficiarse de señales de entrada de mayor duración. Si la señal de entrada incluye múltiples excitaciones y relajaciones, la duración de cada excitación puede encontrarse de 0,01 a 7 segundos, preferiblemente de 0,5 a 3 segundos, y más preferiblemente de 0,1 a 2 segundos para la glucosa, por ejemplo. Pueden usarse otras duraciones de señal de entrada y de excitación.

En la transmisión 1370 de concentración de muestra de la figura 13, el dispositivo de medición convierte al menos una concentración de especie que puede medirse en una concentración de analito de muestra y puede visualizar, almacenar para referencia futura, para procesamiento adicional, y/o para su uso una o más de las concentraciones de especies que pueden medirse determinadas para cálculos adicionales. Por ejemplo, el valor determinado para un analito, mediador, o interferente puede modificarse con el valor determinado para otro analito, mediador, o interferente para aumentar el rendimiento de medición del sistema.

También puede usarse un contraelectrodo que tiene una especie oxidable presente en el sistema de transferencia de carga como electrodo de trabajo desprovisto de oxidoreductasa, proporcionando, por tanto, la capacidad de analizar el hematocrito y determinar el componente de fondo de la señal de salida. La concentración de analito puede modificarse con esta información e información adicional para aumentar la fiabilidad y/o precisión. Un contraelectrodo puede usarse como electrodo de trabajo durante un circuito abierto para medir uno o más parámetros de hematocrito.

En otro aspecto, una o más señales de salida pueden estar correlacionadas con una curva de calibración o tabla de consulta para determinar el desvío de hematocrito o el desvío atribuible a un interferente.

Dependiendo de la naturaleza del analito, la concentración de un analito puede usarse para alterar la lectura de otro analito. Por ejemplo, cuando la concentración de un primer analito interfiere de manera positiva con la concentración de un segundo analito, la concentración del primer analito puede restarse de la concentración del segundo analito para aumentar la fiabilidad y/o precisión del valor de concentración determinado para el segundo analito.

5 La figura 15 muestra los resultados de promediar los resultados de hasta cuatro análisis independientes para el mismo analito para determinar la concentración del analito en la muestra. Tal como se muestra en el gráfico, al aumentar el número de análisis independientes realizados de uno a tres, el 98% de los valores de concentración obtenidos se encuentran dentro del límite de desvío del  $\pm 15\%$  cuando se compara con un instrumento YSI de referencia. Aunque los datos subyacentes al gráfico se obtuvieron a partir de sensores de prueba independientes, los sensores de prueba  
10 que tienen dos o más regiones de análisis secundarias pueden configurarse para realizar el mismo análisis en más de una región secundaria además de analizar diferentes analitos. Por tanto, múltiples regiones de análisis secundarias sustancialmente aisladas químicamente pueden proporcionar los beneficios de promedio de señal a partir de un único sensor de prueba.

15 La capacidad de realizar el mismo análisis múltiples veces en un único sensor de prueba puede aumentar significativamente la fiabilidad y/o precisión de la concentración de analito determinada. Por tanto, el promedio de señal facilitado al realizar el mismo análisis múltiples veces en el mismo sensor de prueba puede proporcionar una mejora en la relación señal con respecto a ruido para el sensor de prueba reduciendo el ruido aleatorio (caracterizado por el valor  $sd$  de desviación estándar) a la velocidad de  $1/\sqrt{n}$  en relación con los sistemas de sensor convencionales.

20 La figura 16 representa el decaimiento de corriente obtenido cuando una señal de entrada amperimétrica con desconexión cíclica se aplica simultáneamente a ocho electrodos sustancialmente aislados químicamente e individualmente direccionables. Los electrodos se configuraron en un diseño de múltiples T con cuatro electrodos de trabajo opuestos a cuatro contraelectrodos a través del canal principal, tal como se representó anteriormente en la figura 3I. Cada electrodo de trabajo se formó con una composición reactiva que incluye 0,5% (p/p) aglutinante de HEC,  
25 50 mL de la molécula de la estructura I, y 2 U/ $\mu$ L del sistema enzimático PQQ-GDH en un tampón fosfato de pH 7. Cada contraelectrodo se formó con un sistema de transferencia de carga que incluye 0,5% (p/p) aglutinante HEC y ferricianuro sustancialmente puro 100 mM en tampón fosfato de pH 7.

Para llevar a cabo el experimento, se introdujo una muestra que incluye 100 mg/dL de glucosa en tampón fosfato de pH 7 en el sensor de prueba y una señal de entrada amperimétrica con desconexión cíclica se aplicó simultáneamente a través de cada uno de los cuatro pares de electrodos opuestos. La señal de entrada con desconexión cíclica incluyó  
30 dos excitaciones iniciales que tienen anchuras de pulso variables seguidas por siete excitaciones que tienen una anchura de pulso de 0,375 segundos. Las últimas siete excitaciones estuvieron separadas por periodos de relajación de un segundo. Hacia el final de la excitación aplicada en el punto de tiempo de dos segundos, por ejemplo, se promediaron los cuatro valores de corriente correspondientes a cada par de electrodos ( $W_1-C_1$ ,  $W_2-C_2$ ,  $W_3-C_3$ , y  $W_4-C_4$ ). A partir de este promedio de los cuatro valores de corriente, pudo determinarse la concentración de analito de la muestra usando una o más ecuaciones de correlación o un método similar. De esta manera, los beneficios de fiabilidad  
35 y/o precisión anteriormente comentados obtenidos a partir del promedio de múltiples análisis pudieron obtenerse a partir de un único sensor de prueba.

**REIVINDICACIONES**

1. Un sensor (700) de prueba de analitos, comprendiendo el sensor (700) de prueba:
- 5 al menos dos sustratos que forman un depósito, incluyendo el depósito una zona (710) principal y una pluralidad de nueve regiones de análisis secundarias que incluyen una región en el extremo de la zona (710) principal, estando cada una de las regiones de análisis secundarias ocupada por un electrodo o conductor, siendo cada una de las regiones de análisis secundarias diferente e independientes una con respecto a otra y estando aisladas químicamente de manera sustancial de manera que el mezclado difusivo o convectivo de composiciones reactivas no se produce sustancialmente entre la pluralidad de nueve regiones de análisis secundarias durante el tiempo de uno o más análisis de una muestra,
- 10 - cada una de cuatro de las regiones de análisis secundarias incluye un electrodo (841-844) de trabajo respectivo, estando los cuatro electrodos (841-844) de trabajo conectados eléctricamente, estando cada uno de los electrodos (841-844) de trabajo formado a partir de una composición reactiva y un primer conductor,
- 15 - cada una las cuatro regiones de análisis secundarias adicionales incluye un contraelectrodo (731-734) respectivo, siendo los cuatro contraelectrodos (731-734) independientemente direccionables, estando cada uno de los contraelectrodos (731-734) formado a partir de un sistema de transferencia de carga y un segundo conductor;
- al menos un orificio (715) de muestras en comunicación de fluido con el depósito; y
- una pluralidad de respiraderos, estando cada uno de los respiraderos en comunicación de fluido con una respectiva de las regiones de análisis secundarias;
- 20 en el que las cuatro regiones de análisis secundarias que incluyen los electrodos (841-844) de trabajo se ubican en un lado de la zona (710) principal, incluyendo las cuatro regiones de análisis secundarias los contraelectrodos (731-734) que están ubicados en un lado opuesto de la zona (710) principal en una disposición escalonada de manera que no puede trazarse una línea recta que pasa desde uno de los electrodos (841-844) de trabajo a través de la región de análisis secundaria respectiva y a través de la zona (710) principal a través de una segunda región de análisis secundaria opuesta a un contraelectrodo (731-734) opuesto, pero escalonado, respectivo.
- 25 2. El sensor (700) de prueba según la reivindicación 1, en el que al menos una de las regiones de análisis secundarias se ramifica desde la zona principal formando un ángulo menor de 90°.

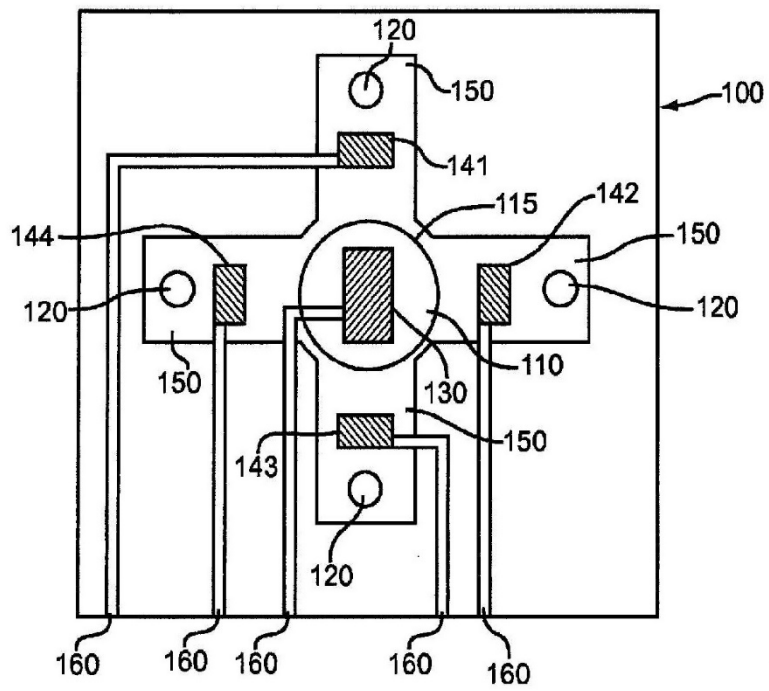


Fig. 1A

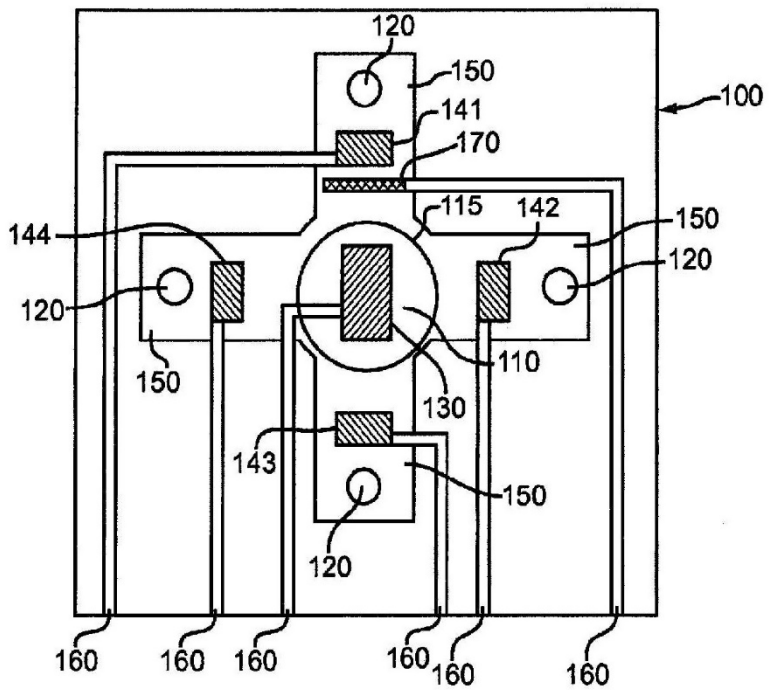


Fig. 1B



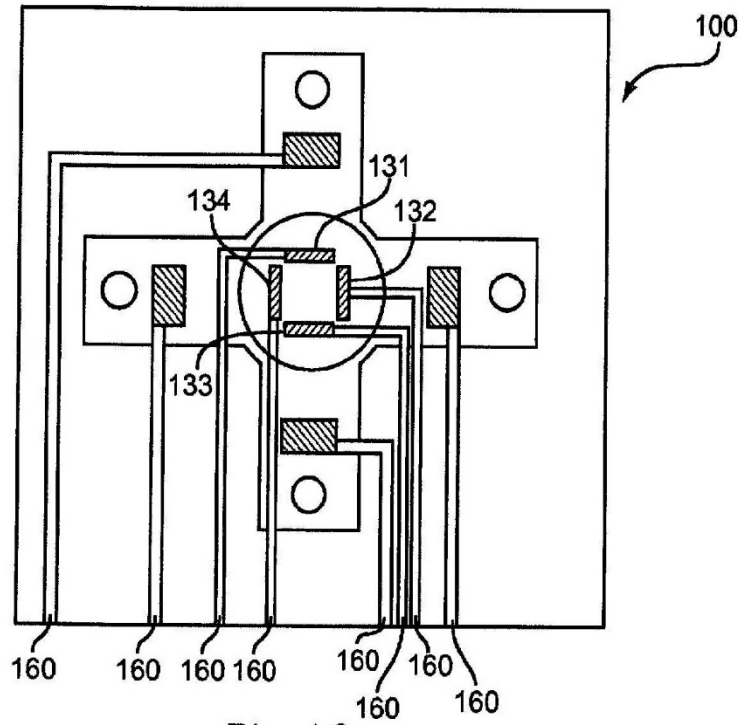


Fig.1C

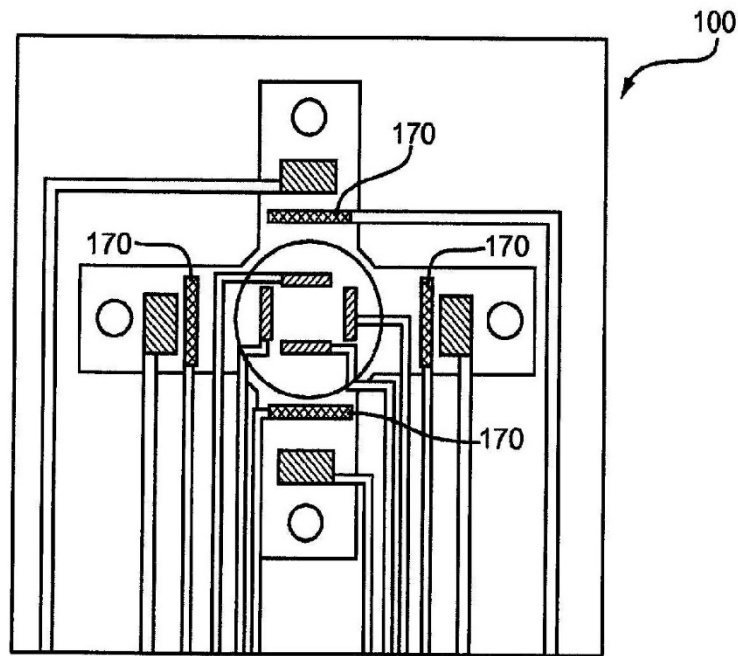


Fig.1D

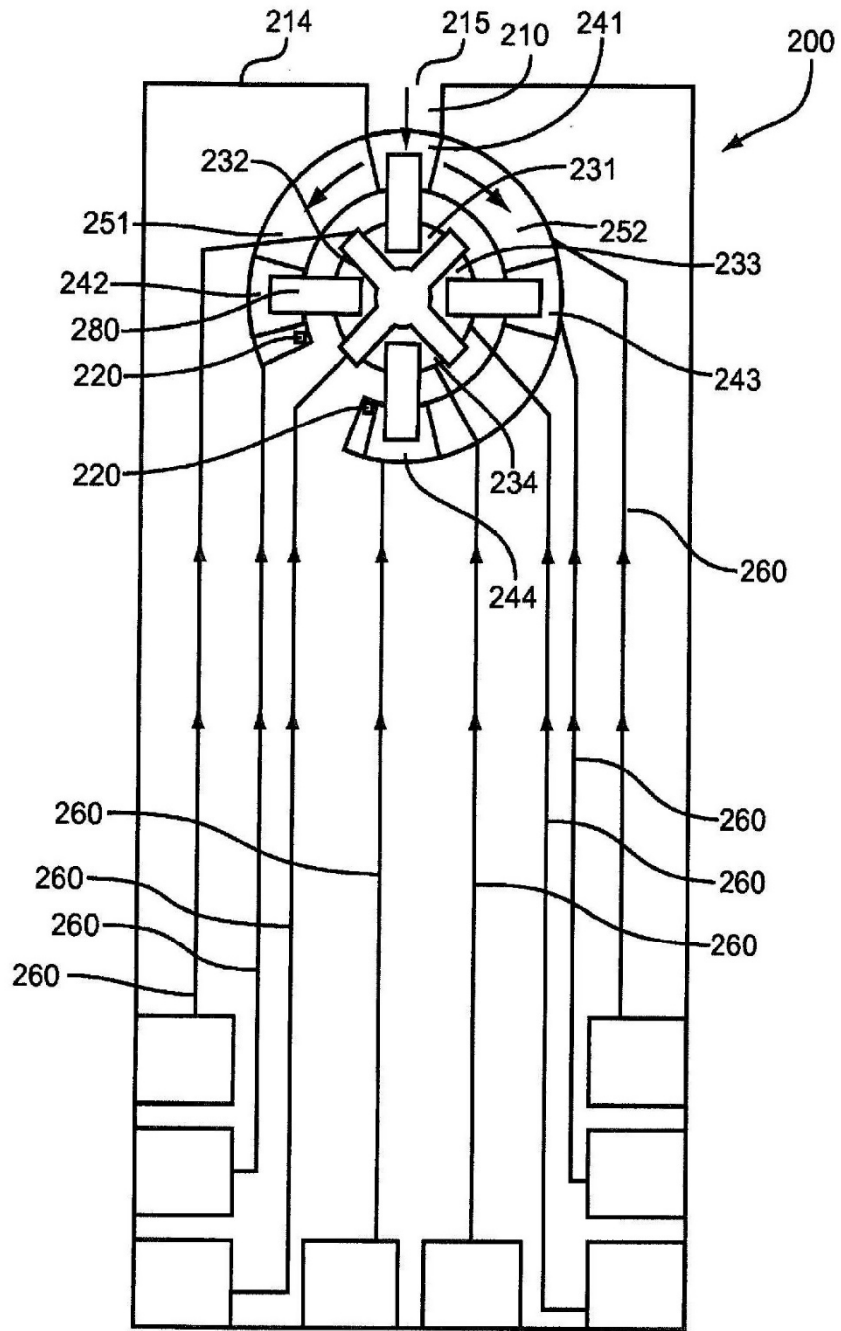


Fig. 2A

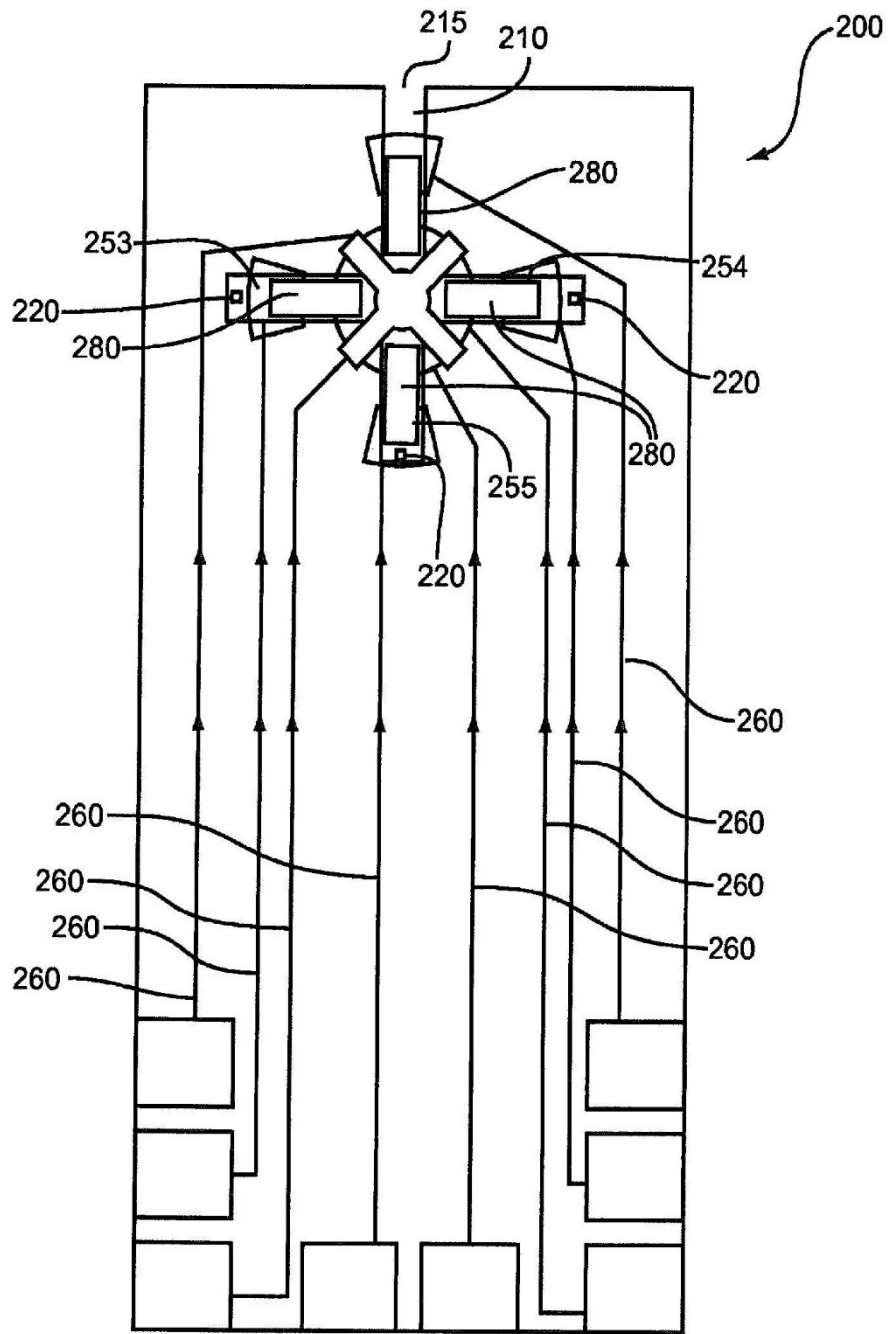


Fig. 2B

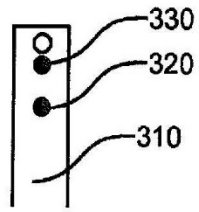


Fig. 3A

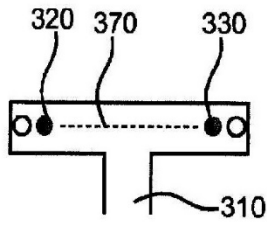


Fig. 3B

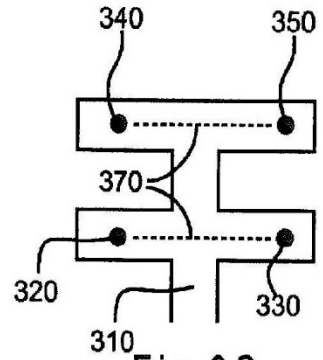


Fig. 3C

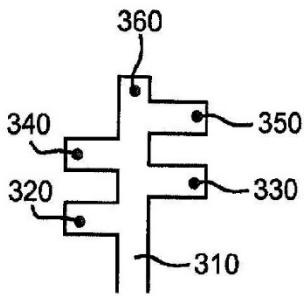


Fig. 3D

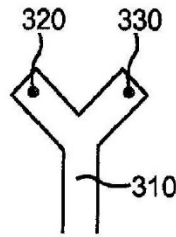


Fig. 3E

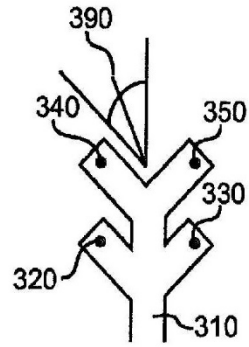


Fig. 3F

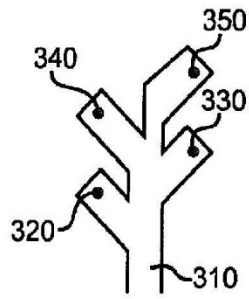
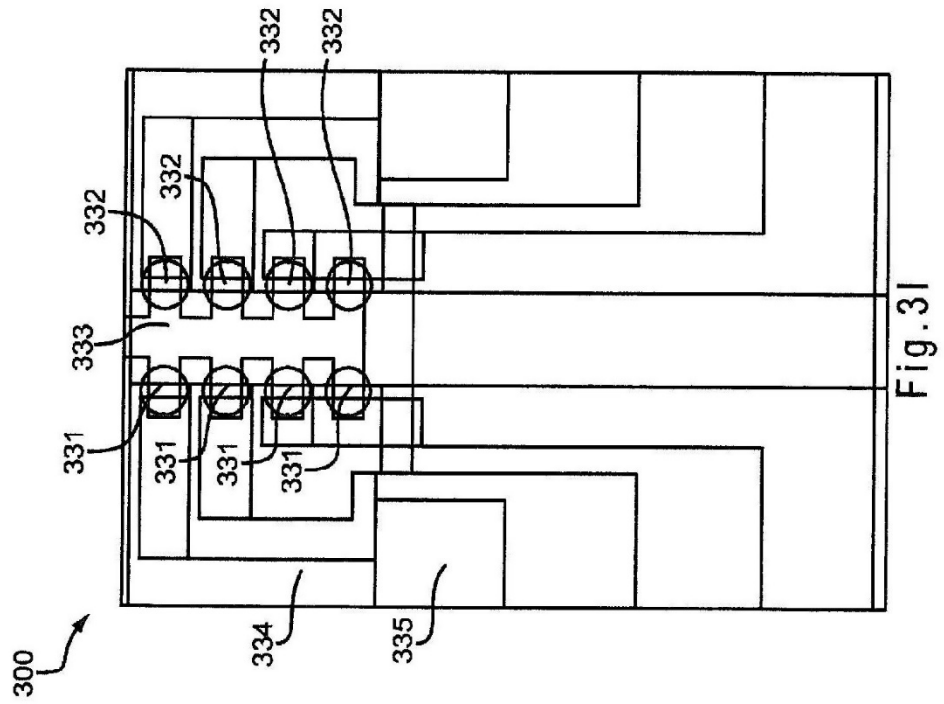
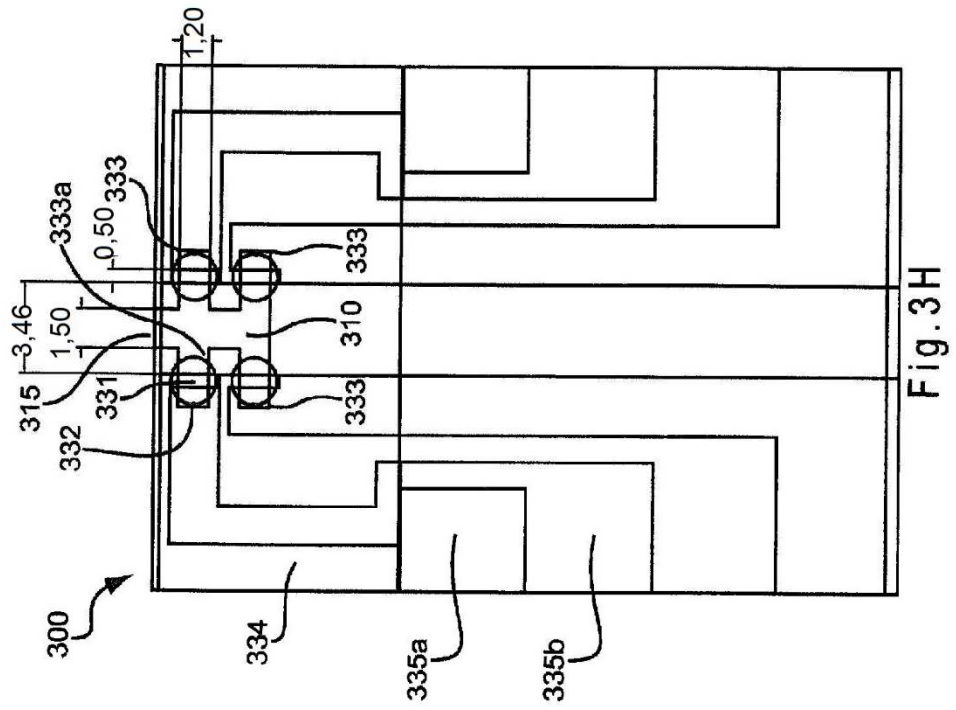


Fig. 3G



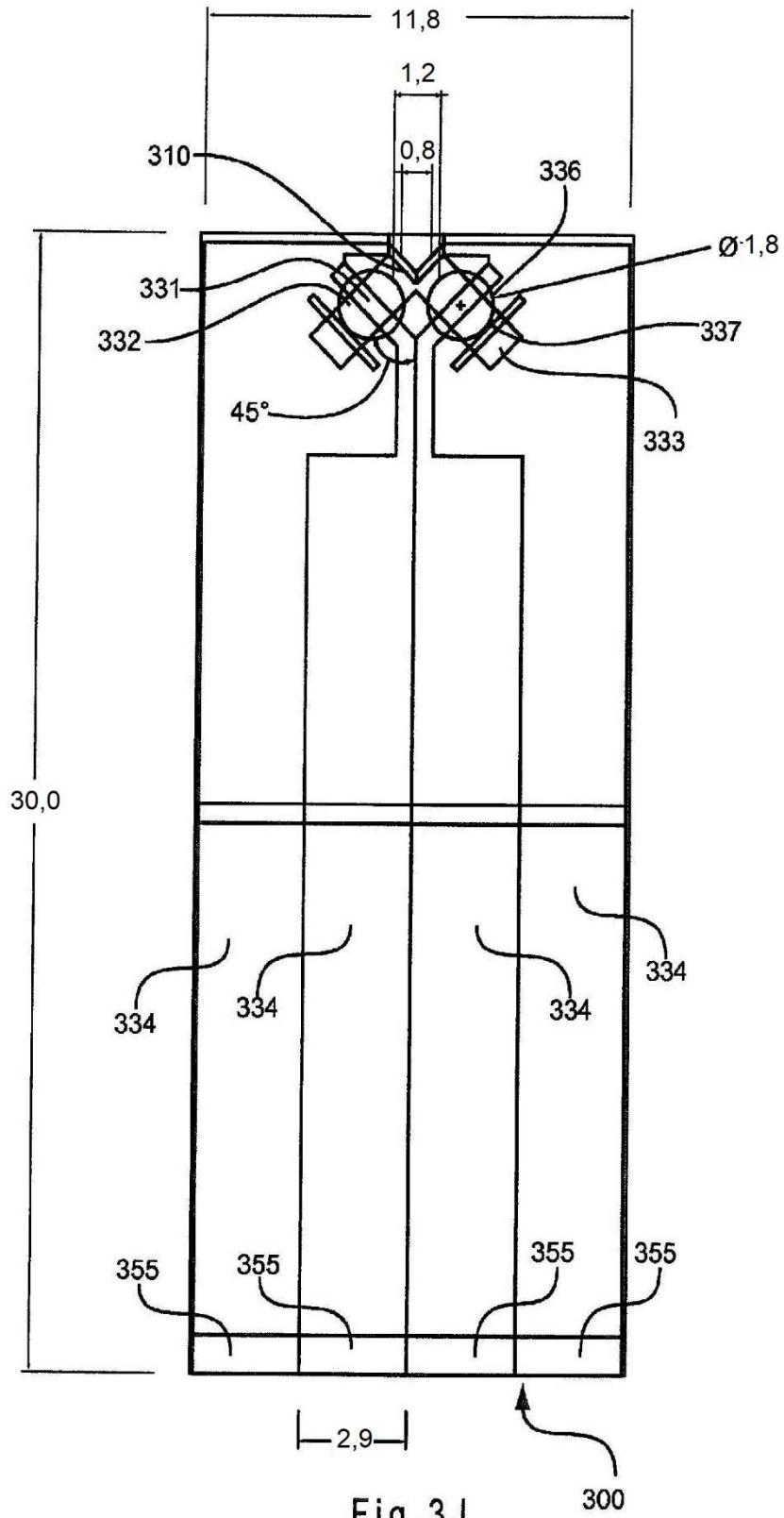


Fig. 3J

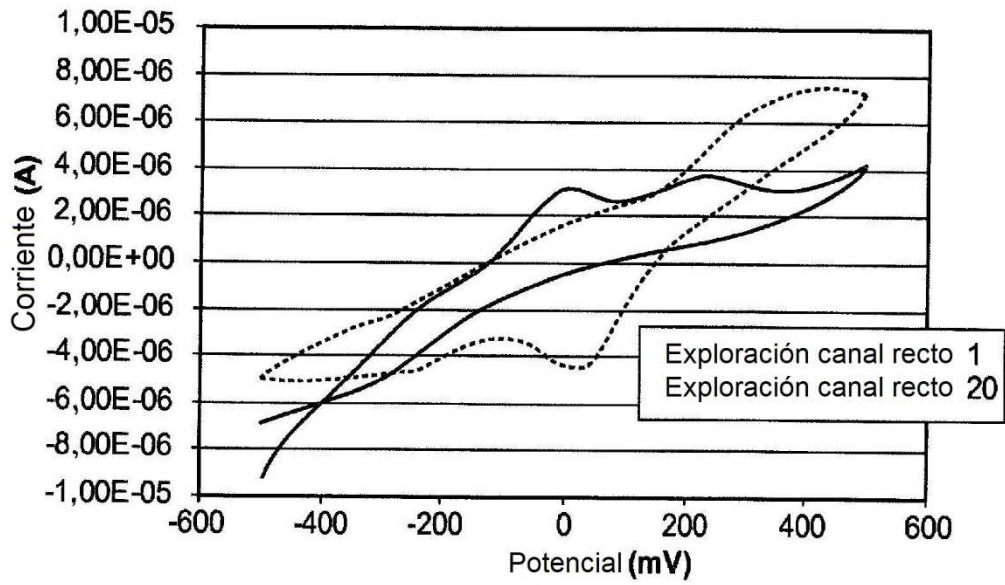


Fig.4A

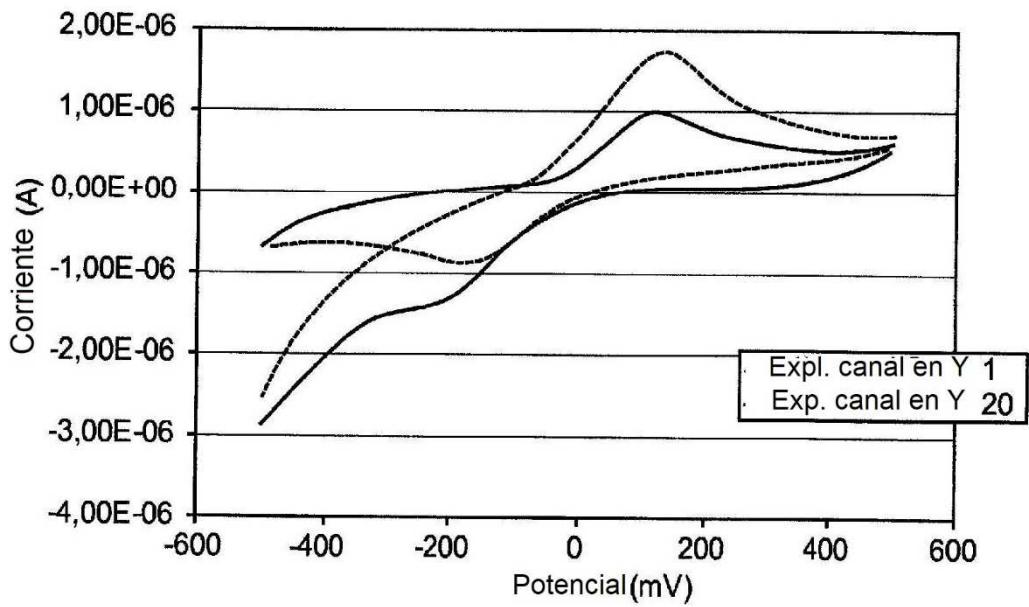


Fig.4B

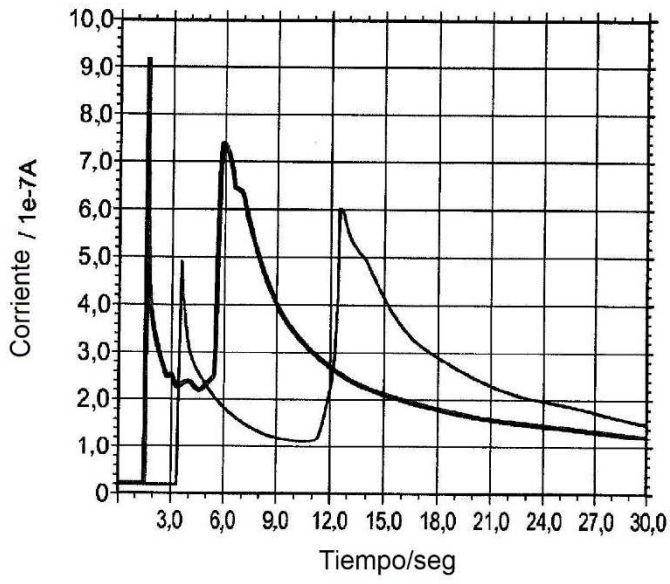


Fig. 5A

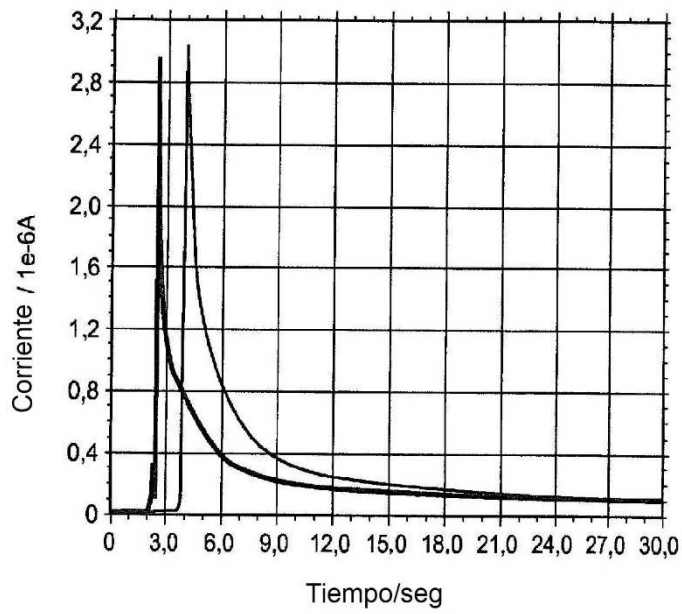


Fig. 5B



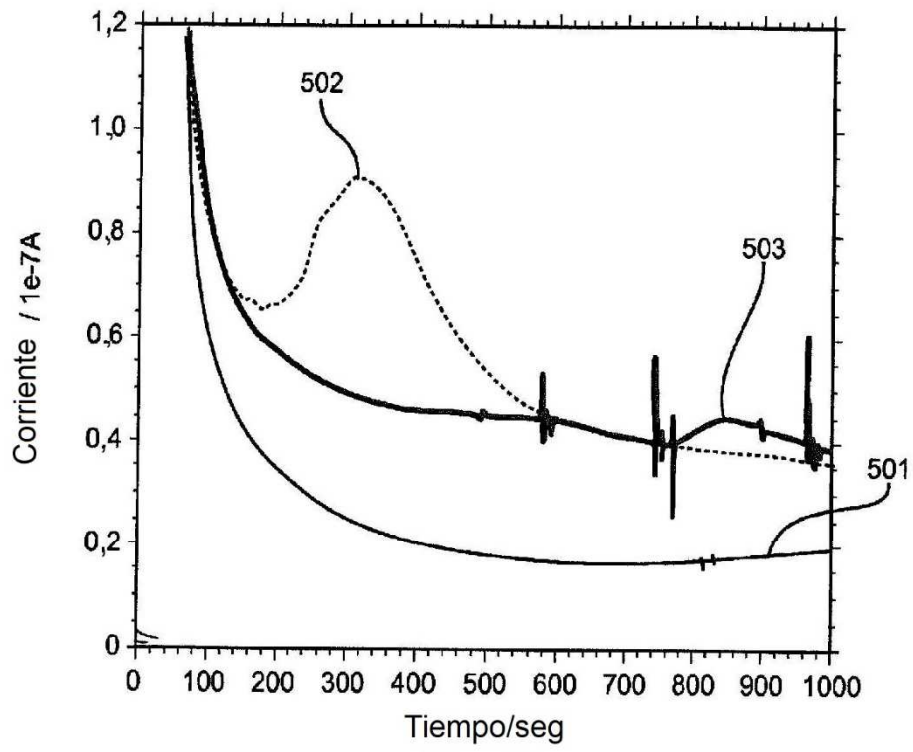


Fig.5C

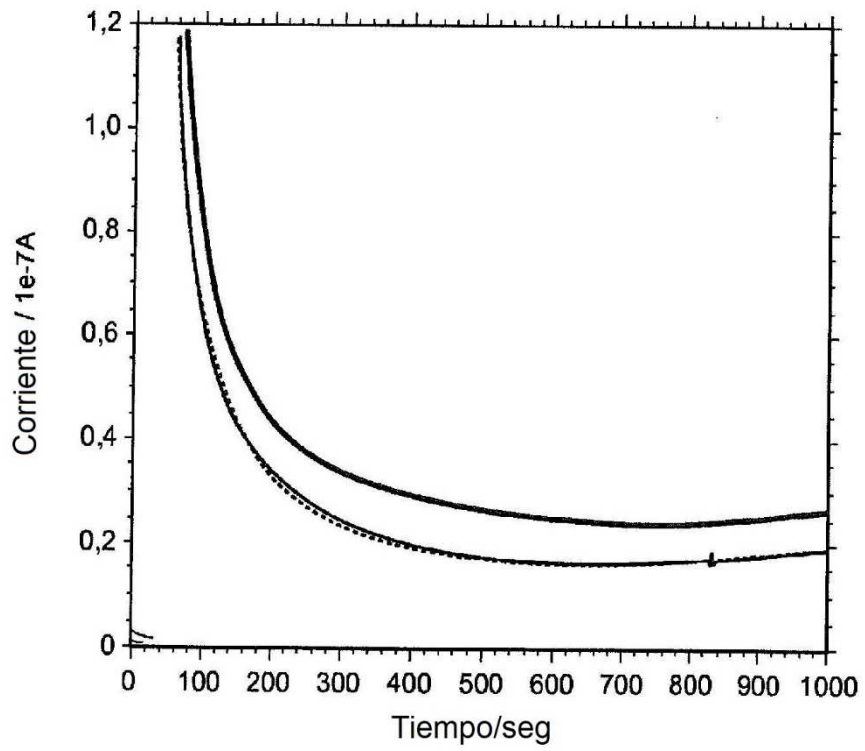


Fig.5D

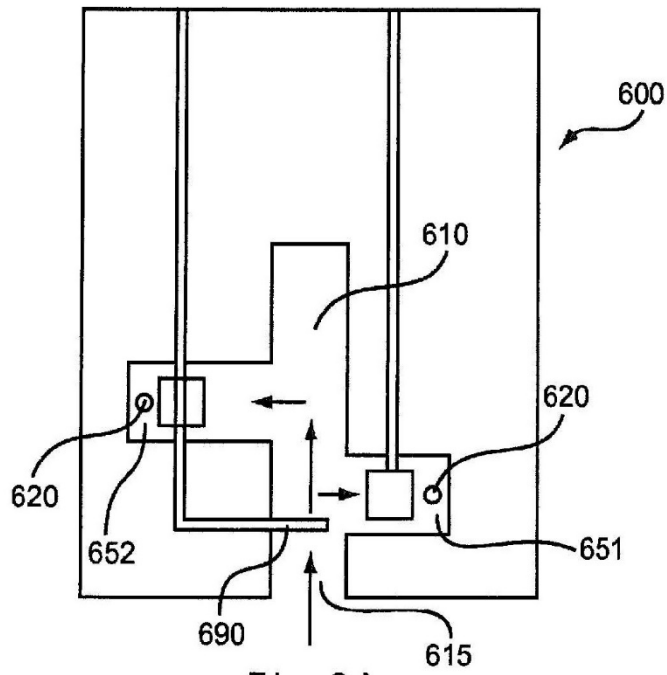


Fig. 6A

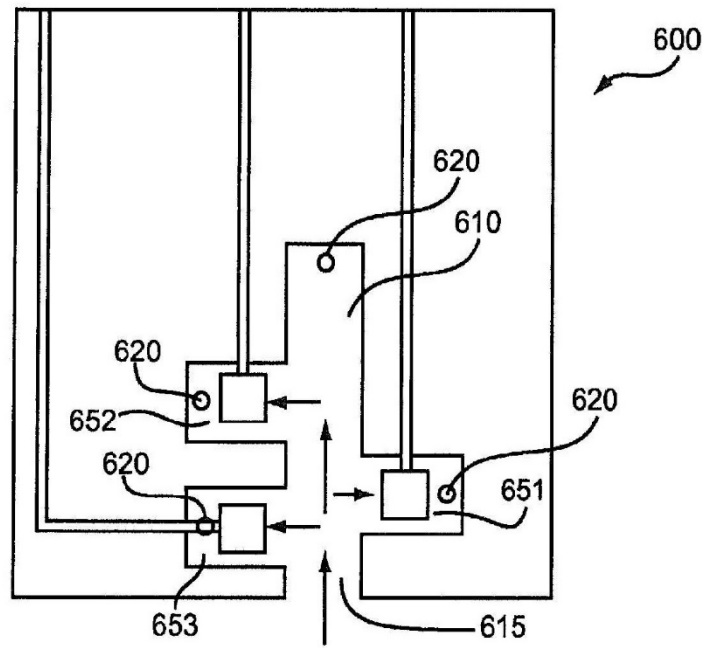


Fig. 6B

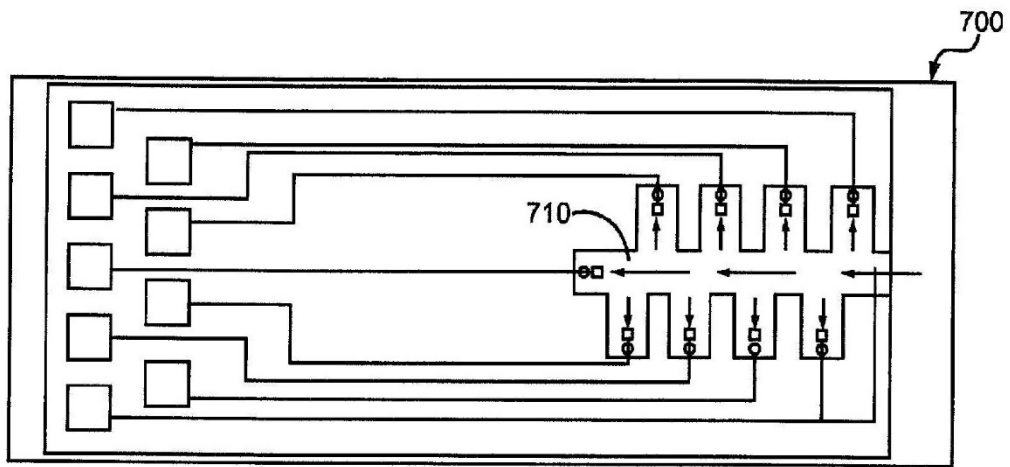


Fig. 7A

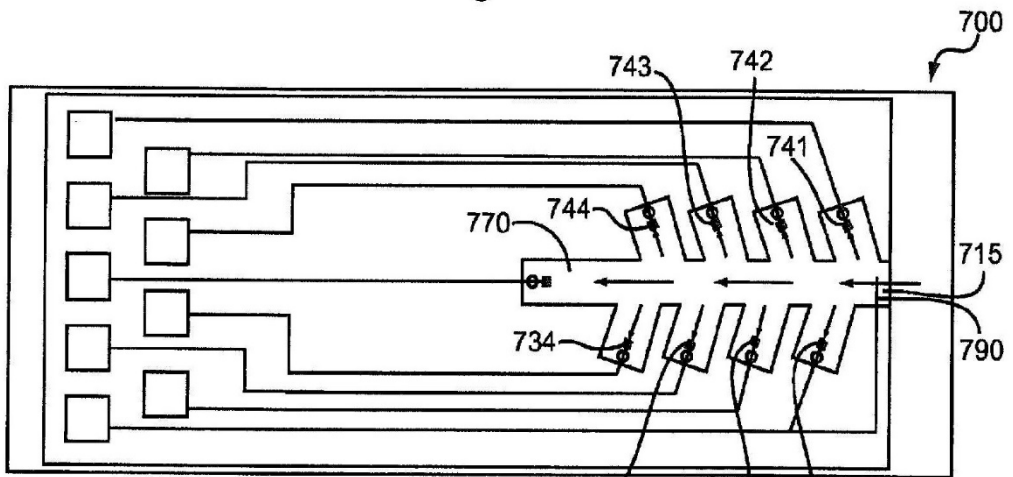


Fig. 7B

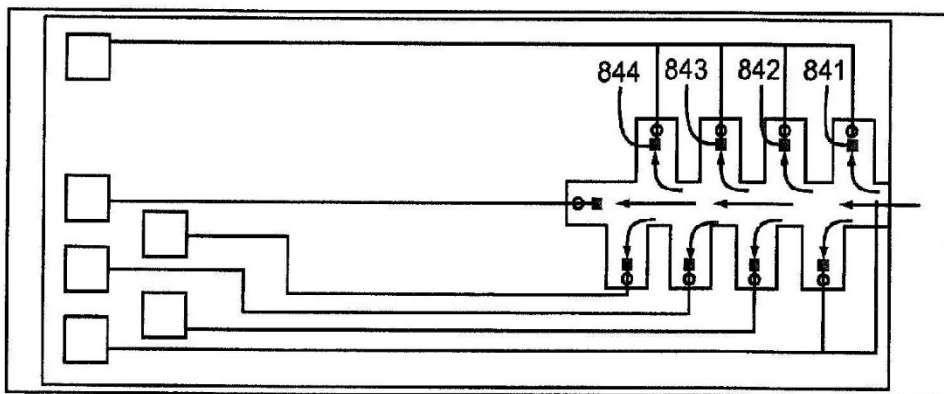


Fig. 8A

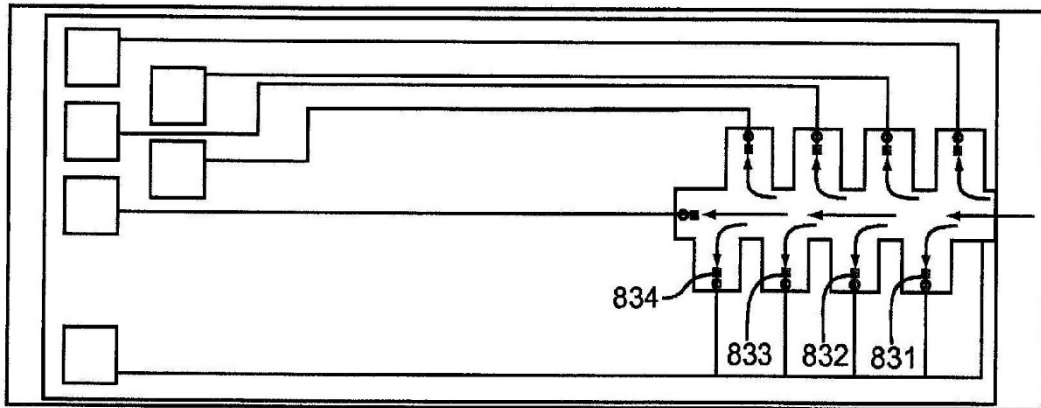


Fig.8B

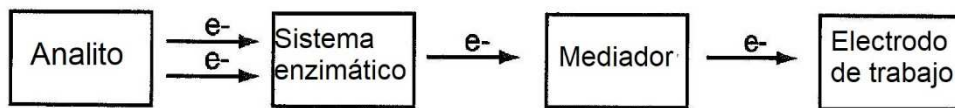


Fig.9A

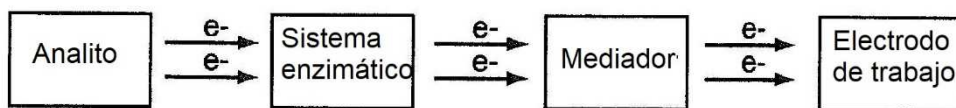


Fig.9B

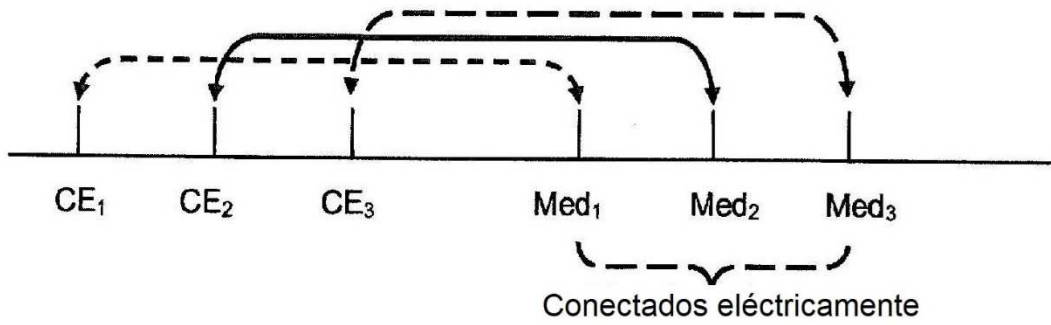


Fig.10A

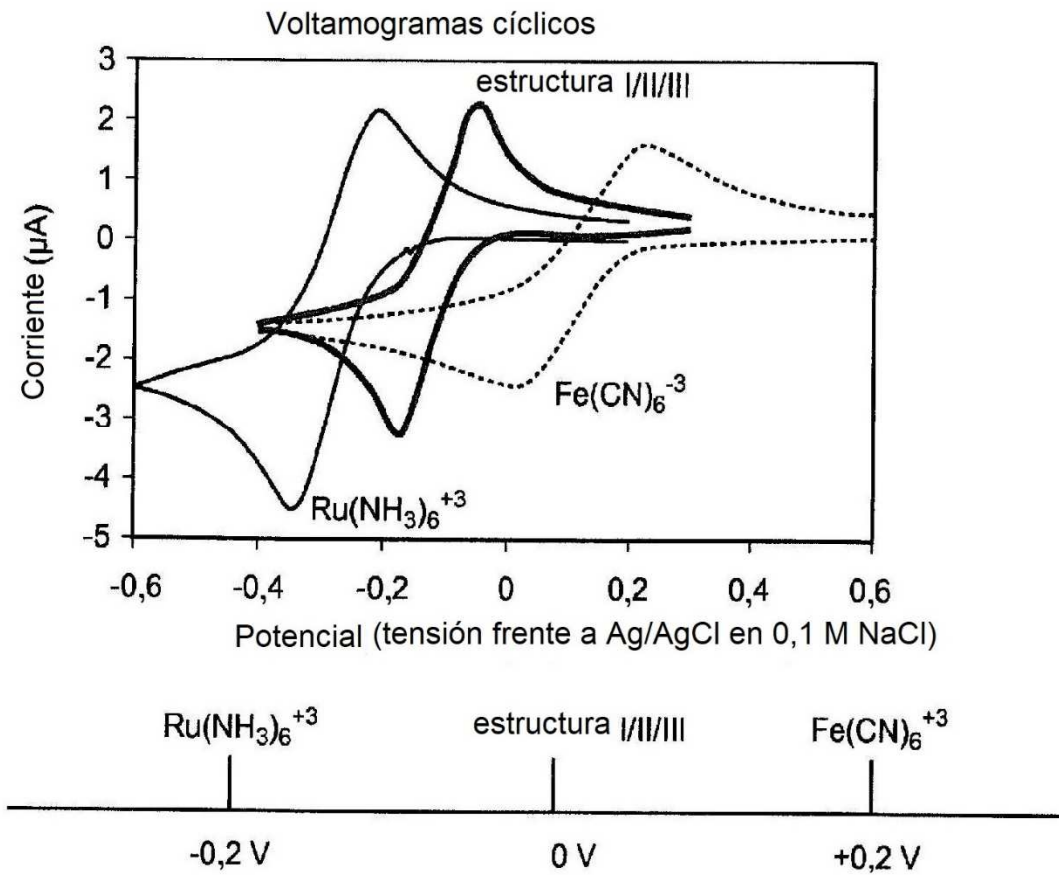
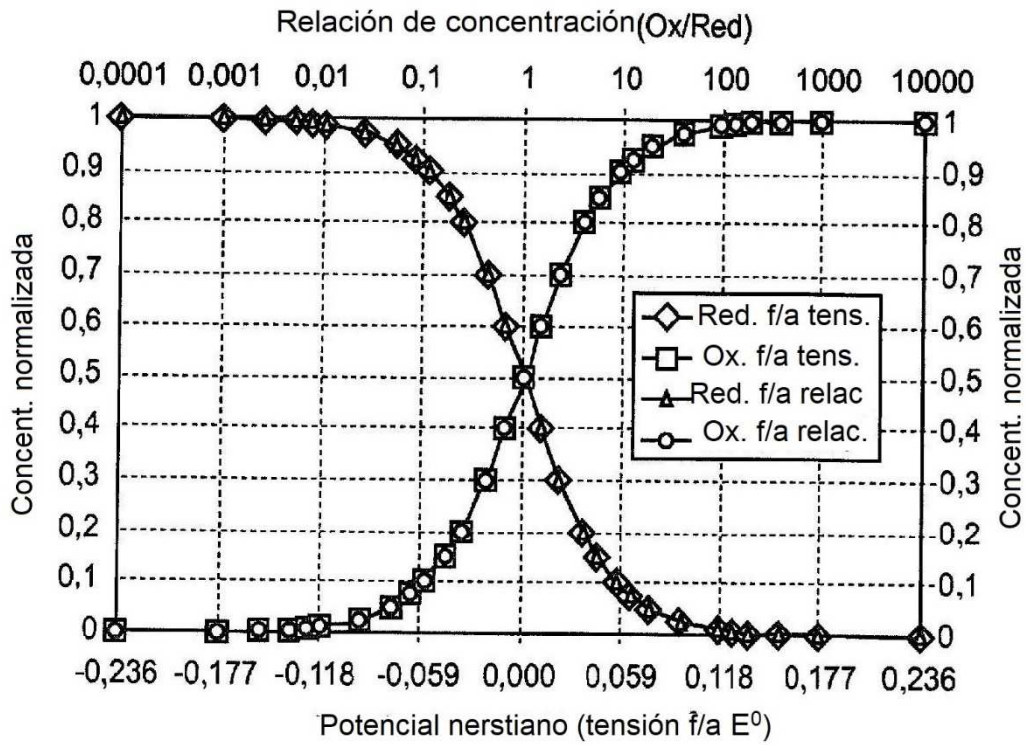


Fig.10B



Ecuación nerstiana :  $E = E^{0'} + 0,059 \log \frac{[Ox]}{[Red]}$

Fig.10C

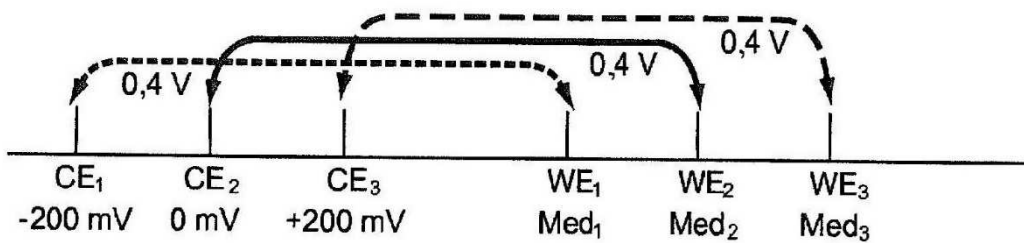


Fig.10D

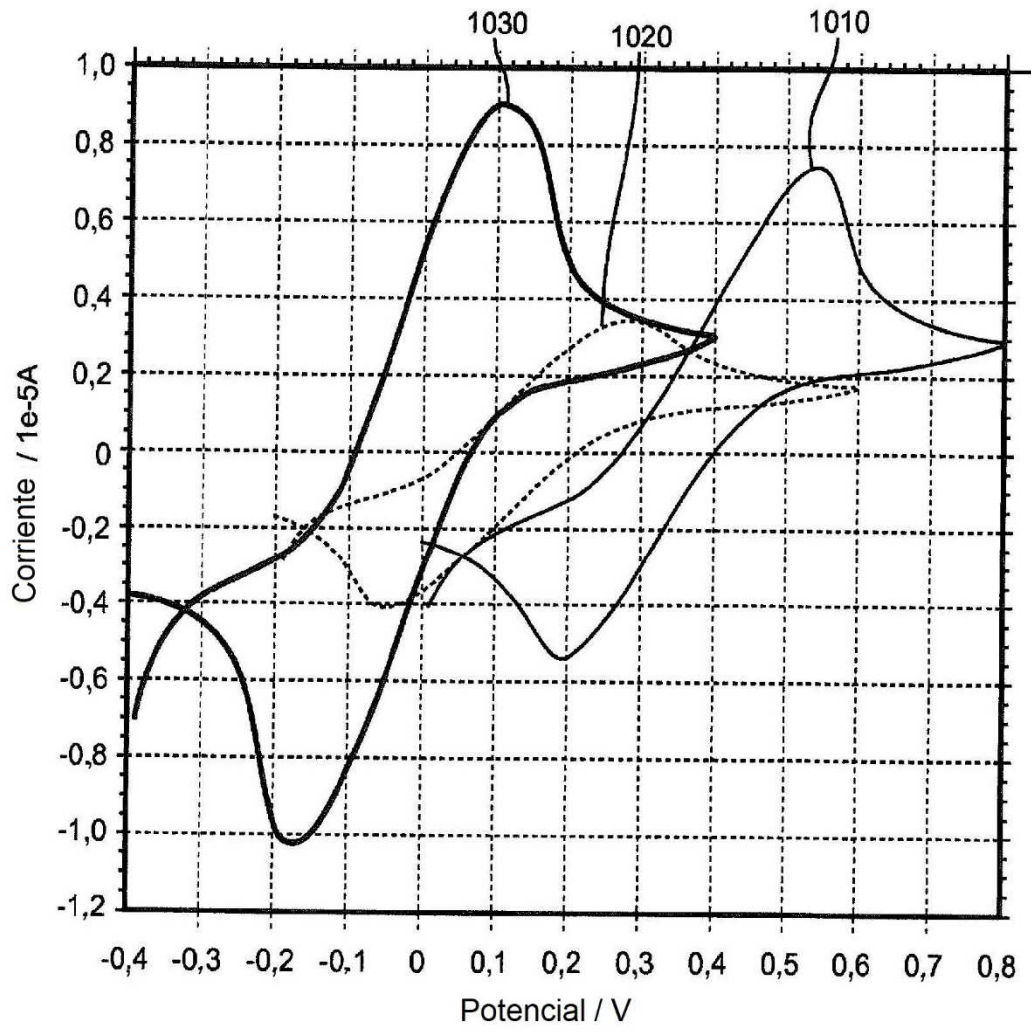


Fig.10E

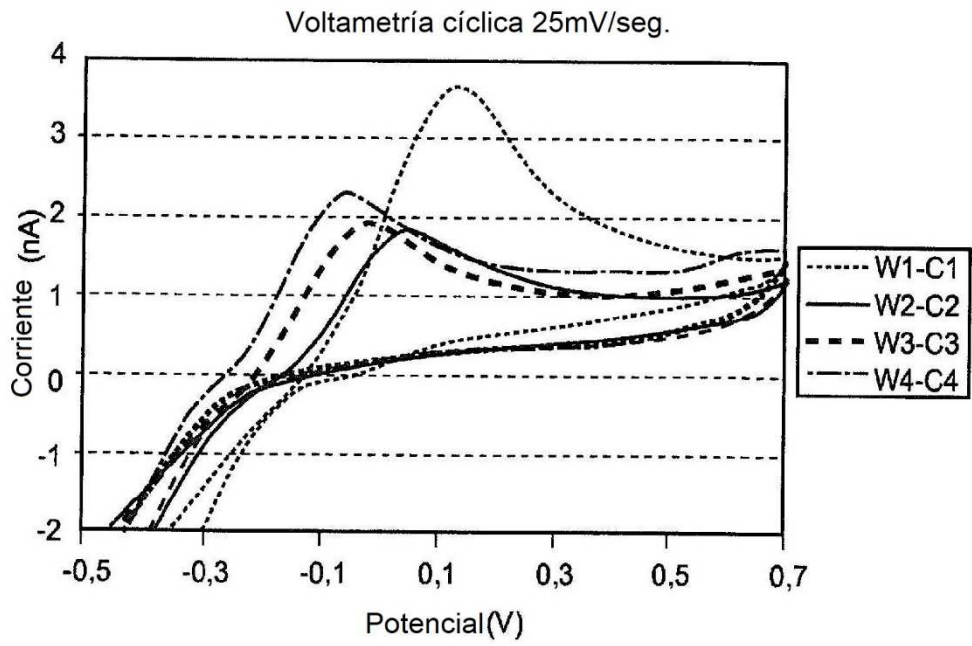


Fig.11A

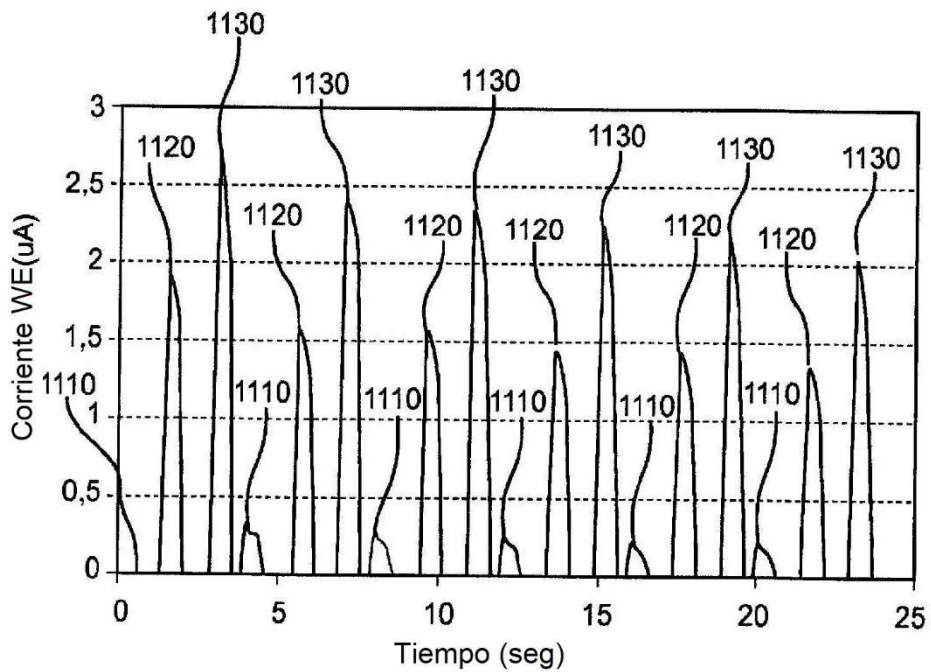


Fig.11B



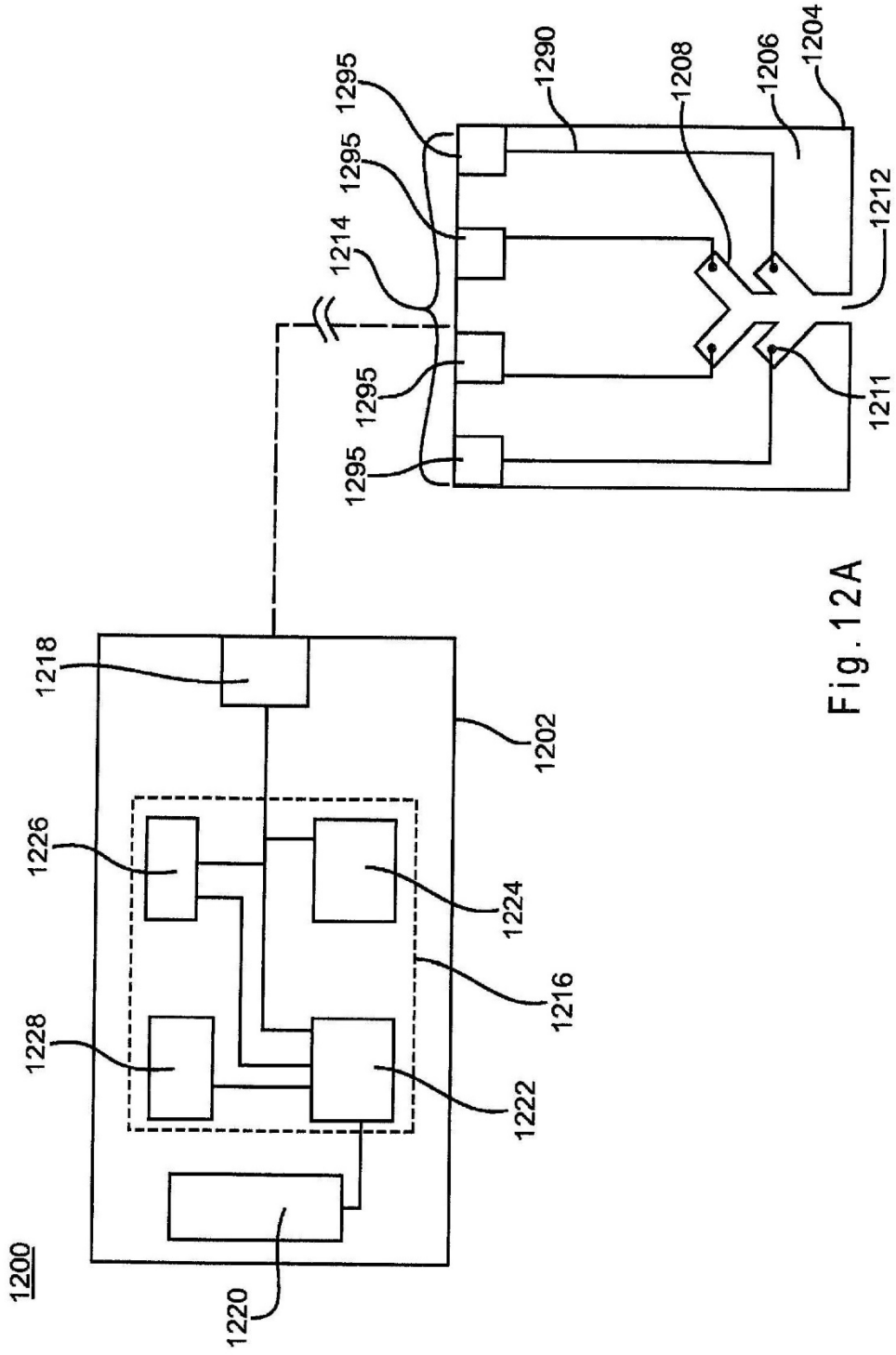


Fig. 12A

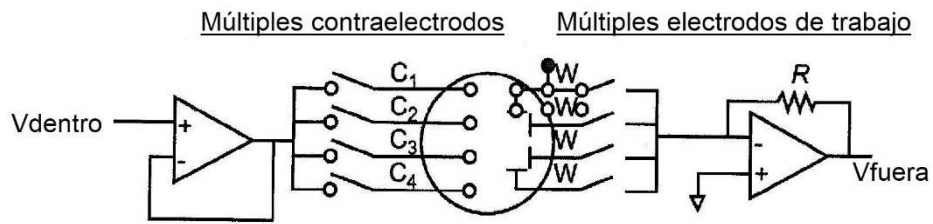


Fig.12B

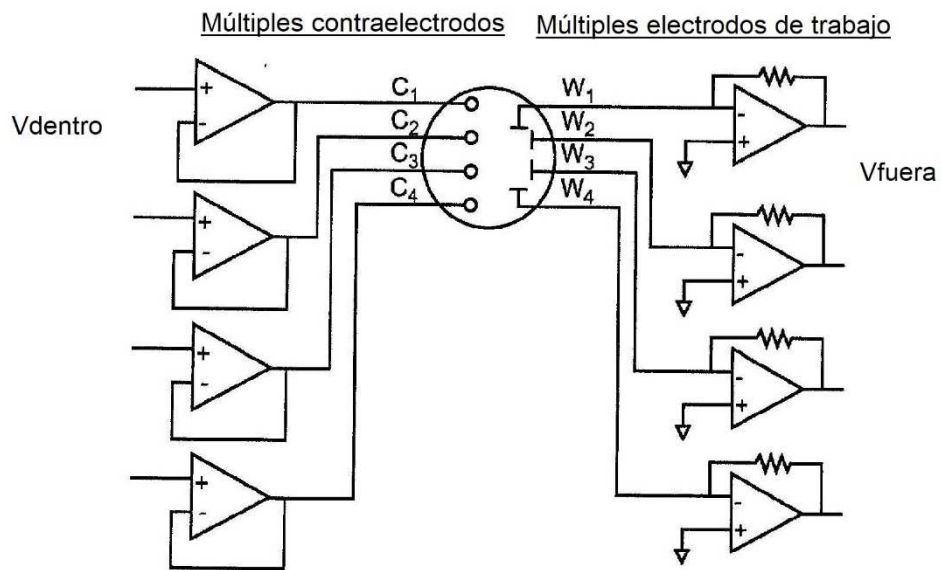


Fig.12C

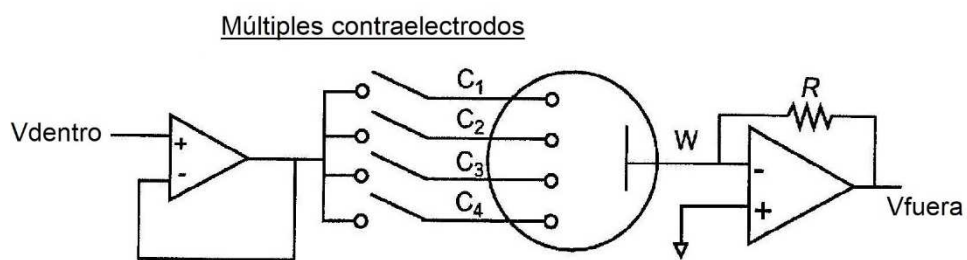


Fig.12D

Múltiples electrodos de trabajo

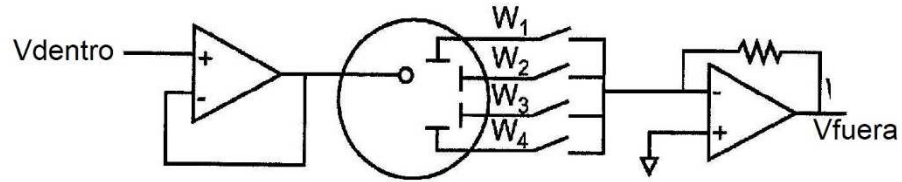


Fig.12E

Múltiples electrodos de referencia

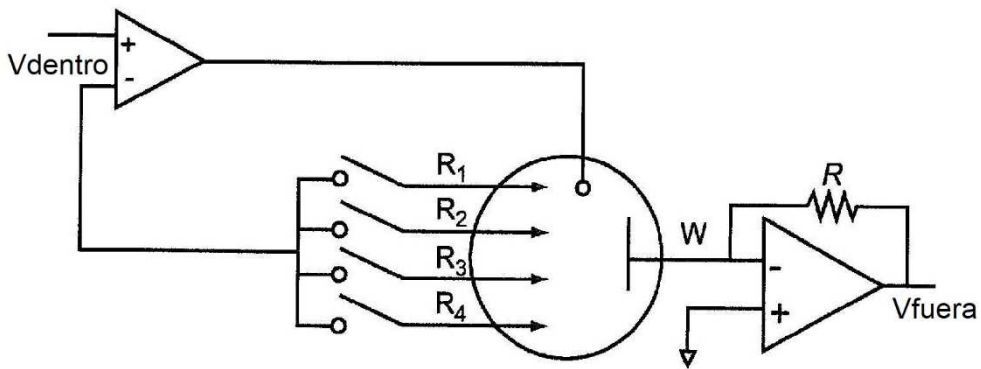


Fig.12F

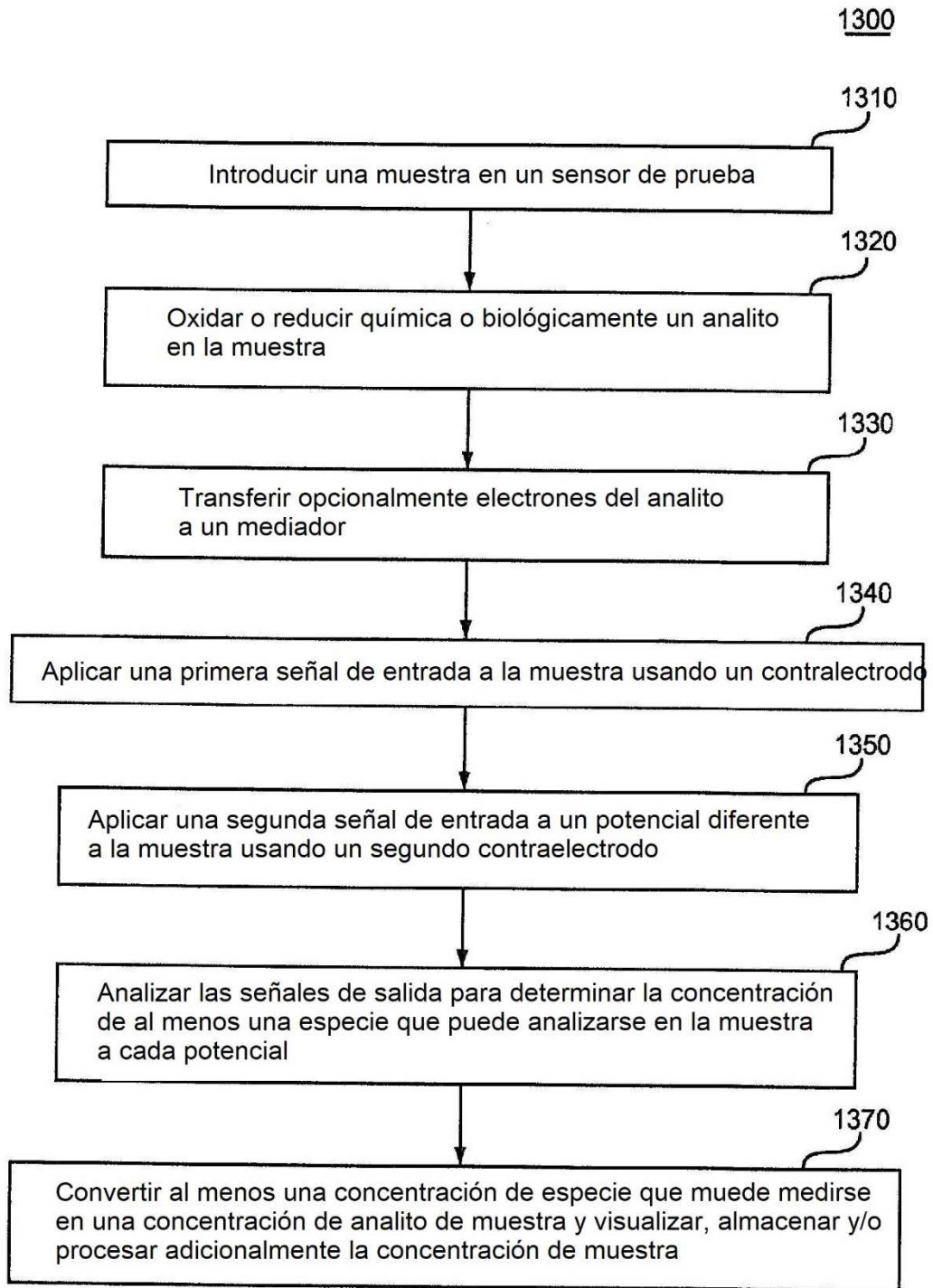


Fig.13

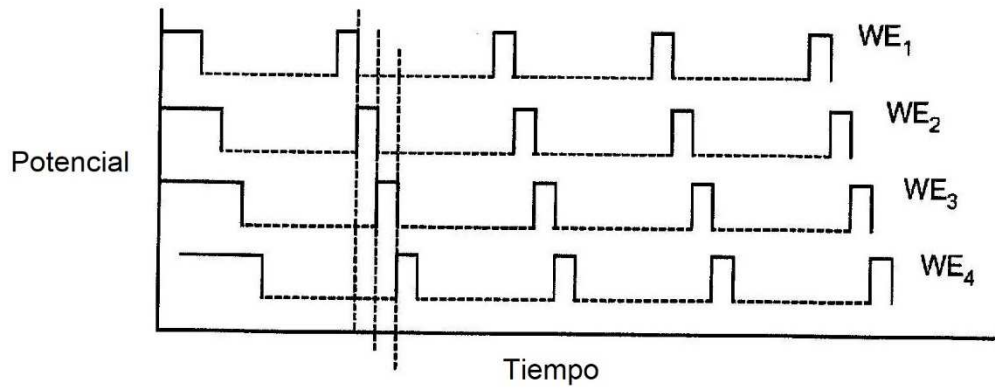


Fig.14A

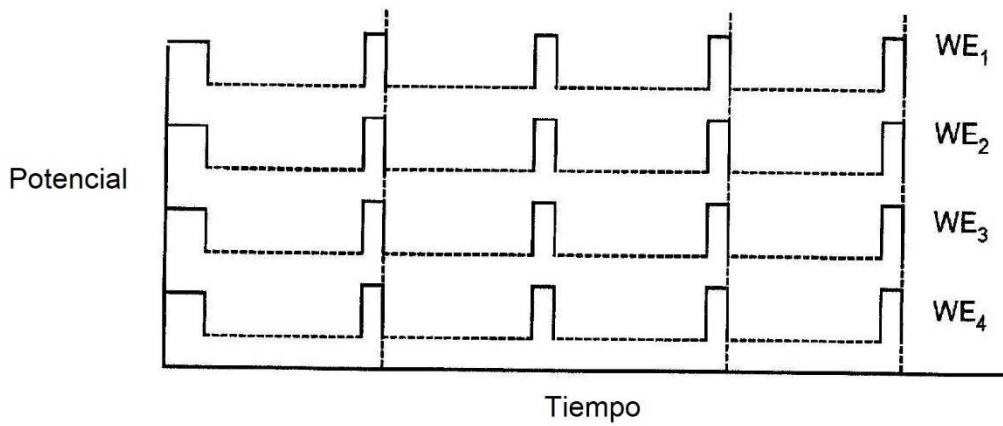


Fig.14B

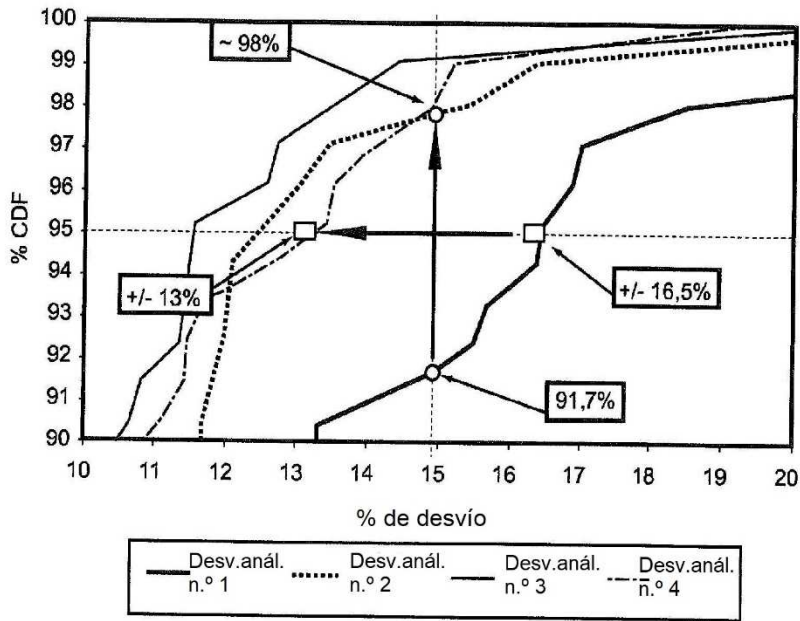


Fig.15

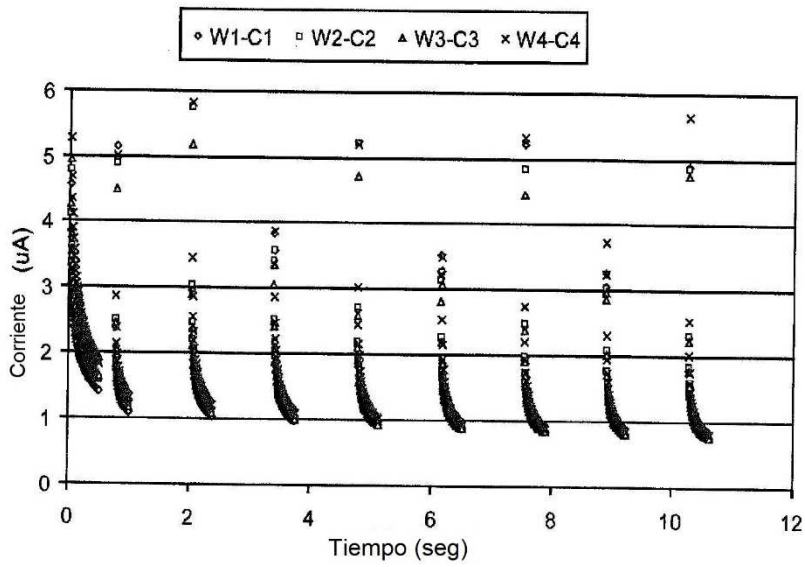


Fig.16