



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**EVALUACIÓN DE DISPOSITIVOS DE MICROFLUÍDICA PARA LA
DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.A. OSCAR SANDOVAL VENTURA

TUTOR

**MARÍA DEL PILAR CAÑIZARES MACÍAS
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

MÉXICO, D. F. OCTUBRE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado

Presidente Dr. Arturo Navarro Ocaña

Vocal Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero

Vocal Dr. Luis Fernando Olguín Contreras

Vocal Dra. Laura A. Oropeza Ramos

Secretario Dra. Selena Gutiérrez Flores

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 211, Edificio F, Departamento de Química
Analítica, Facultad de Química, UNAM

Este trabajo se presentó en el XXVIII Congreso Nacional de Química Analítica 2015 bajo la modalidad oral y en el evento denominado QuimiUNAM 2015 bajo la modalidad de cartel.

Agradecimientos

Primeramente a Dios por permitirme vivir este momento de mi vida acompañado de mis papás, hermanos, abuelos y de mi familia más cercana.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser siempre un impulso en mi vida para ser mejor persona día con día. Siempre será mi *alma mater*.

A la Facultad de Química por demostrarme lo extraordinaria, apasionada y desafiante que es la química.

A la Coordinación del Posgrado en Ciencias Químicas.

A la Dra. María del Pilar Cañizares Macías por la orientación en la elaboración de este proyecto. Además por toda su paciencia, tiempo y apoyo brindados.

Al Dr. Arturo Navarro Ocaña, al Dr. Luis Fernando Olguín Contreras, al Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero, a la Dra. Selena Gutiérrez Flores, a la Dra. Laura A. Oropeza Ramos, integrantes del jurado asignado, por la revisión hecha a este trabajo.

A todos los integrantes del laboratorio 309 del edificio F de la Facultad de Química, en especial al I.Q. Arturo Romero García, al Q. José Eduardo Castillero Sánchez y sobretodo al Dr. Luis Fernando Olguín Contreras por el apoyo y asesorías en la construcción de los microdispositivos.

A mis compañeros del laboratorio 211 por hacer más ameno el trabajo dentro del mismo.

Al CONACYT por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría con número de CVU 555004 y número de becario 295788.

A la Dirección General de Asunto del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM Proyecto IN218415 “Diseño, construcción y evaluación de microdispositivos para aplicaciones químicas y biológicas” por el apoyo financiero para la realización de este proyecto.

Dedicatorias

Este trabajo se lo dedico a las personas que más quiero en esta vida, mis padres, los cuales, sé que me ofrecen un cariño incondicional y a los que siempre les estaré infinitamente agradecido por todo lo que han hecho por mí en todos los aspectos de mi vida. Los amo.

A mis hermanos, abuelitos, y familia en general con los que tengo el gusto de seguir compartiendo momentos inolvidables de nuestras vidas. Los quiero.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la mejor Universidad de Latinoamérica.

“Nunca consideres al estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”

Albert Einstein

“Me enseñaron que el camino del progreso no es ni rápido ni fácil”

Marie Curie

ÍNDICE

	Página
Resumen	2
Objetivos	4
1. Introducción	5
1.1 Microdispositivos	5
- Antecedentes	5
- Generalidades	6
- Métodos de fabricación	7
- Estampado en caliente	9
- Moldeo por inyección	9
- Ablación láser	9
- Litografía suave	10
- Poliéster termoestable.....	11
1.2 PDMS	11
1.3 Flujos en microfluídica	13
- Mezclado de los microfluidos	14
1.4 Métodos de detección en microdispositivos	15
- Detección óptica	15
- Absorción UV-Visible.....	16
1.5 Paso de luz a través de fibra óptica.....	16
1.6 Polifenoles	18
- Cuantificación de polifenoles. Ensayo de Folin-Ciocalteau.....	20
- Química de la reacción.....	21
1.7 Ensayos FIA en microchips	22
2. Desarrollo experimental	23
2.1 Equipo	23
2.2 Reactivos	23
2.3 Disoluciones	24
2.4 Fabricación de los microdispositivos	24
- Diseño de la forma de los microcanales	24
- Fotolitografía	25
- Litografía suave	27
- Sellado de los microcanales	28
2.5 Evaluación de dispositivos de microfluídica para la determinación de polifenoles totales expresado como ácido tánico <i>in situ</i>	30
- Evaluación del ancho de los microcanales de los microchips fabricados	30
- Inserción de fibra óptica en el microchip.....	30
- Evaluación de la determinación de polifenoles totales <i>in situ</i>	31

2.6 Validación del método	33
- Curva de calibración	33
- Precisión del valor de la pendiente y la ordenada al origen de la ecuación de la recta.....	33
- Límite de detección.....	33
- Límite de cuantificación	33
- Evaluación de la precisión del método	34
- Análisis de muestras	34
- Recobros	34
3. Resultados y discusión	35
3.1 Fabricación de los microchips.....	35
- Caracterización visual de los microchips	35
- Volumen y dimensiones del microchip	37
3.2 Optimización analítica para la determinación de ácido tánico con detección fuera del microchip.....	37
- Evaluación de parámetros hidrodinámicos y fisicoquímicos para obtener la mayor sensibilidad en la determinación de ácido tánico	37
- Longitud de onda para la determinación del producto de reacción del ensayo de Folin-Ciocalteu.....	38
- Optimización de la concentración de los reactivos con detección fuera del microchip.....	38
- Evaluación del caudal de los reactivos y volumen de muestra	41
- Curva de calibración de ácido tánico con detección fuera del microchip	43
- Evaluación del ancho de los microcanales.....	44
- Estudio del volumen de ácido tánico	46
3.3 Optimización analítica para la determinación de ácido tánico con detección <i>in situ</i> (dentro del microchip)	48
- Evaluación de las fibras ópticas y de los parámetros hidrodinámicos y fisicoquímicos.....	48
- Evaluación de las fibras ópticas en el microchip	48
- Volumen de muestra de ácido tánico.....	50
- Optimización de la concentración de los reactivos	50
- Evaluación de la longitud de paso óptico	52
- Características del método	54
- Curva de calibración	54
- Límite de detección	58
- Límite de cuantificación	58
- Repetibilidad y Reproducibilidad	58
- Análisis de muestras	60
- Recobros	60
3.4 Análisis del mezclado de los reactivos dentro del microchip	62
3.5 Conclusiones	65
3.6 Bibliografía.....	67
Anexos	71

Abreviaturas en el texto

μ TAS. micro-sistema total de análisis
ANOVA. análisis de varianza
CM. cuadrado medio
COC. copolímero de olefina cíclica
FIA. análisis por inyección en flujo
GL. grados de libertad
LIF. fluorescencia inducida por láser
LOC. lab-on-a-chip
LOD. límite de detección
LOQ. límite de cuantificación
PC. policarbonato
PDMS. polidimetilsiloxano
PET. politereftalato de etileno
PETG. politereftalato de etilenglicol
PFPE. perfluoropoliéteres fotocurables
PMMA. polimetacrilato de metilo
PS. poliestireno
PVC. policloruro de vinilo
Re. número de Reynolds
Sb. desviación estándar del blanco
SC. suma de cuadrados
Se .desviación estándar residual
TAS. sistema total de análisis
Tg. transición vítrea
TPE. poliéster termoestable
Yb. señal igual a la del blanco

RESUMEN

La microfluídica es la ciencia que se encarga del estudio de fluidos contenidos en microcanales que van desde una hasta 500 micras de ancho y/o alto de dimensión y con volúmenes de los 10^{-6} hasta los 10^{-15} L. El desarrollo de la microfluídica en años recientes ha ido creciendo de forma paralela con el desarrollo de los llamados laboratorios en un microchip (lab-on-a-chip), que son dispositivos que tienen la función integrada de analizar, mezclar reactivos y separar productos, entre otros, en un mismo y pequeño dispositivo. Las ventajas que presentan los sistemas operados por microfluídica son principalmente que reducen la cantidad de reactivos utilizados abaratando costos, las reacciones dentro de ellos son más rápidas y emiten mucho menos contaminantes. Por estas razones, la microfluídica es utilizada para ensayos biológicos y químicos miniaturizados. El elastómero polidimetilsiloxano es uno de los materiales más versátiles que se utiliza en la construcción de dispositivos de microfluidos, en particular para la creación rápida de prototipos.

El método de detección más utilizado en este tipo de prototipos es la fluorescencia inducida por láser (LIF) que ha sido la técnica de elección principalmente debido a su sensibilidad, simplicidad y la idoneidad para la detección de biomoléculas. Sin embargo, la limitada aplicabilidad de esta técnica a las especies ópticamente activas con un cromóforo ha estimulado la investigación a la medición por absorbancia con el inconveniente de que las pequeñas dimensiones de los canales de microfluidos disminuyen severamente la sensibilidad. El acoplamiento de fibras ópticas en los microdispositivos pueden ayudar a mejorar la detección por UV-Vis ya que es posible utilizar fibras de diferentes diámetros y a distintas longitudes de paso óptico.

En el presente trabajo se construyó, a través de las técnicas de fotolitografía y litografía suave, un microchip al cual se le insertaron dos fibras ópticas con una distancia entre ellas de 7 mm logrando la cuantificación de polifenoles *in situ* por espectroscopia visible.

La concentración óptima de los reactivos se obtuvo a través de un diseño factorial dando como resultado: NaOH: 0.5 M y reactivo de Folin-Ciocalteu dilución 1:10 a partir del reactivo comercial. Los valores óptimos para los parámetros hidrodinámicos y físicos fueron: caudal 34 μ L/min; volumen de muestra 3.4 μ L; ancho de los microcanales 110 μ m.

Para construir la curva de calibración se utilizó ácido tánico como estándar dando la siguiente ecuación de la recta: $y = 4.00x (\pm 0.39) + 0.17 (\pm 0.041)$ y $R^2 = 0.9905$. La

precisión del método se evaluó como repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio; obteniéndose 2.95 % y 6.84 %, respectivamente.

El método se aplicó para determinar el contenido de polifenoles totales en 6 muestras de vino blanco las cuales fueron filtradas previamente. La concentración de polifenoles fue desde 174 $\mu\text{g/mL}$ hasta 336 $\mu\text{g/mL}$ con recobros desde 87.6 % hasta 120.43 %.

Los resultados muestran que el método propuesto presenta ventajas frente a otras técnicas tales como bajo consumo de reactivos y por ende, de desechos; análisis rápidos (20 s por determinación).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- ✓ Desarrollar un microdispositivo de polidimetilsiloxilano integrando fibras ópticas para la determinación *in situ* de polifenoles totales por espectroscopia visible.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conocer y emplear la técnica de fotolitografía y litografía suave como procedimientos para la fabricación de microdispositivos.
- Evaluar el desempeño del polidimetilsiloxano como material de fabricación de los microchips.
- Evaluar el caudal y el volumen de inyección en los microdispositivos como parámetros fundamentales en la optimización de la reacción de polifenoles.
- Evaluar varios diseños de microdispositivos (diámetro de los canales, configuración, longitud de los canales y profundidad de los canales) para encontrar el diseño óptimo para la determinación de polifenoles.
- Evaluar, como prueba preliminar, la determinación de polifenoles con detección fuera del microchip.
- Acoplar y evaluar diferentes fibras ópticas en los microdispositivos para la determinación *in situ* de polifenoles por espectroscopia visible.
- Establecer la curva de calibración y las características de ésta para la determinación *in situ* de polifenoles con el microdispositivo seleccionado.
- Analizar muestras de vino blanco empleando los microchips para la determinación *in situ* de polifenoles totales.
- Demostrar que los dispositivos de microfluídica son una eficaz herramienta para el análisis químico.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Microdispositivos.

Antecedentes.

Durante las últimas dos décadas, la demanda de mediciones continuas y de respuesta rápida utilizando pequeños volúmenes y muestras de baja concentración ha sido la fuerza impulsora para la investigación en muchas áreas de la química analítica. Se han propuesto dos soluciones con el fin de satisfacer estas necesidades: la primera se basa en el uso de sensores químicos selectivos o sensores microelectromecánicos y el segundo en el enfoque llamado sistema de análisis total (TAS por su siglas en inglés) (Ríos et al., 2012).

Idealmente, un TAS realiza todas las etapas que componen un análisis completo de una forma integrada y automatizada. Estas etapas pueden incluir muestreo, pretratamiento de la muestra, reacciones químicas, separaciones analíticas, detección del analito, aislamiento del producto y análisis de datos. La filosofía del TAS ha permitido mejoras en el análisis químico en línea, sin embargo, aún existen importantes inconvenientes. Estos incluyen el transporte lento de la muestra, el alto consumo de reactivo, las eficiencias pobres de separación y la necesidad de fabricar interfaces entre distintos componentes.

En 1979, la primera cromatografía de gases miniaturizada con base de silicio se presentó como un nuevo sistema de microfluidos integrado, iniciando una verdadera "revolución microfluídica", y como un importante desarrollo de los sistemas de análisis miniaturizados. Al mismo tiempo, Manz et al. propuso el concepto de microsistema de análisis total (μ TAS), abriendo una nueva era en el campo de la química analítica (Ríos et al., 2012).

Los μ TAS han crecido de manera exponencial y se han convertido en un área más general de la investigación que abarca diferentes tipos de sistemas químicos, bioquímicos y biológicos microfabricados, también conocidos popularmente como lab-on-a-chip (LOC). El objetivo de estos sistemas miniaturizados, o sistemas de análisis de microfluidos, es automatizar los procesos de laboratorio estándar y llevar a cabo análisis químicos y bioquímicos en un formato miniaturizado tal como se observa en la Figura 1 (Ríos et al., 2012; Temiz et al., 2015).

Introducción

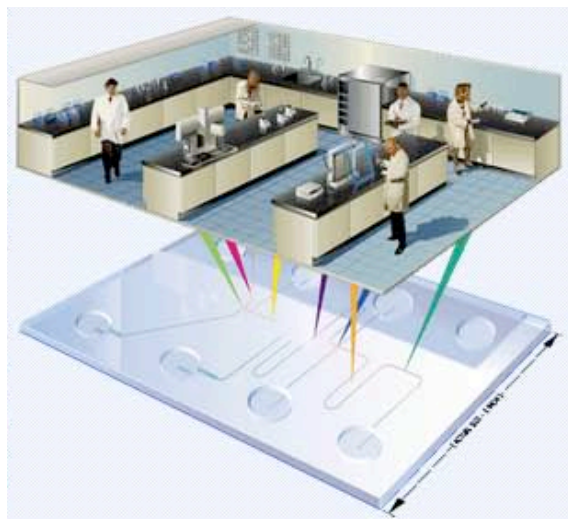


Figura 1: Ilustración esquemática de la traducción de las operaciones principales de laboratorios convencionales en LOC. Tomada de Luttge, 2011.

Generalidades.

Los dispositivos LOC son herramientas analíticas que deben ser capaces de llevar a cabo todos los pasos del análisis (pre-tratamiento de la muestra, introducción de reactivos, mezclado, separación y detección) en un formato de chip y de forma automatizada (Figura 2). La posibilidad de escalar los procedimientos analíticos tradicionales y transferirlos en un sistema operativo miniaturizado y auto portátil está abriendo camino para análisis de laboratorio en química clínica, vigilancia ambiental, análisis de alimentos, y protección en guerras biológicas (Mirasoli et al., 2014).

Con respecto a sus homólogos a gran escala, LOC ofrecen varias ventajas, tales como la integración de sistemas de preparación y detección de muestras, la portabilidad, la velocidad de análisis, bajo consumo de reactivos y muestra, una mayor capacidad para llevar a cabo el procesamiento en paralelo y un control superior de las condiciones de reacción. Sin embargo, llegar a bajos límites de detección puede ser un reto, ya que los pequeños volúmenes de muestra se traducen en pocas moléculas de analitos disponibles para la detección (Mirasoli et al., 2014).

Introducción

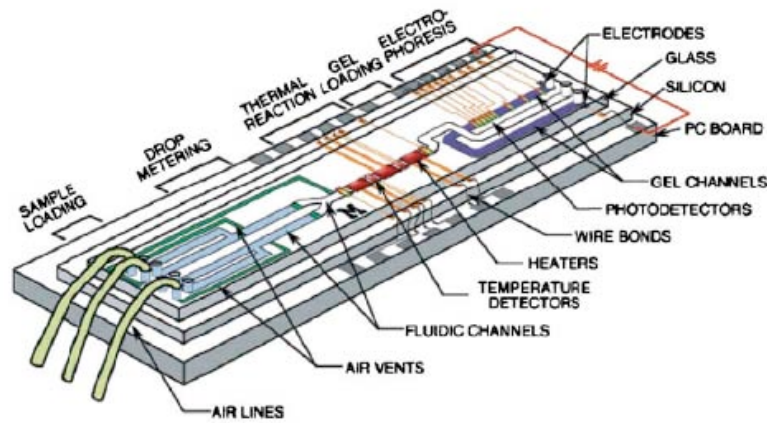


Figura 2. Representación de LOC. Tomada de Urban, Goodall, & Bruce, 2006.

Métodos de fabricación.

Dado que la tecnología para el desarrollo de estos dispositivos se adaptó inicialmente a partir de la industria de la microelectrónica convencional de semiconductores, los dispositivos iniciales fueron hechos principalmente de silicio y vidrio. Muchos dispositivos de microfluidos disponibles comercialmente se realizan utilizando esta tecnología. Sin embargo, estos materiales son caros y requieren métodos de fabricación de alto costo; por ello materiales poliméricos más nuevos han sido investigados y los procesos de fabricación se han desarrollado, especialmente en el contexto de creación rápida de prototipos y aplicaciones desechables.

Los polímeros son macromoléculas sintetizadas a partir de moléculas más pequeñas llamadas monómeros a través de una serie de reacciones químicas. Se pueden clasificar sobre la base de sus estructuras y comportamientos, pero en su mayoría se clasifican de acuerdo con su respuesta al tratamiento térmico. Tienen un bajo costo (adecuado para dispositivos desechables), pueden ser fácilmente producidos en masa mediante diversas técnicas de prototipado rápido, tienen una amplia gama de propiedades (inercia química, baja conductividad térmica, eléctrica, etc.), también se pueden adaptar (usando técnicas de modificación de superficie) apropiadamente para el analito en cuestión y, más importante, han sido ya utilizados en herramientas y equipo de laboratorio donde se han realizado ensayos biológicos y químicos convencionales. Los dispositivos hechos de polímeros son muy susceptibles de automatización de alto rendimiento (Wu et al., 2013).

En las aplicaciones de microfluidos, las propiedades del material que pueden ser de importancia fundamental incluyen maquinabilidad, carga superficial, adsorción molecular, la movilidad del flujo electroosmótico, propiedades ópticas, y muchos otros. Al elegir un

Introducción

sustrato a base de polímero, las propiedades del material son críticas tanto para el proceso de fabricación como para la aplicación con éxito del dispositivo (Becker et al., 2002).

En la Figura 3 se esquematiza la variedad de métodos para la fabricación de dispositivos de microfluidos: fotolitografía y litografía suave (A), poliéster termoestable (B), estampado en caliente (C), moldeo por inyección (D) y ablación con láser (E) (Fiorini et al., 2005).

Como regla general, la elección del método de fabricación se determina por varios factores, tales como las tecnologías y equipos disponibles, costo, velocidad, capacidad de fabricación (por ejemplo, tamaño de la característica deseada y del perfil) y el material del sustrato preferido (Fiorini et al., 2005; Becker et al., 2002).

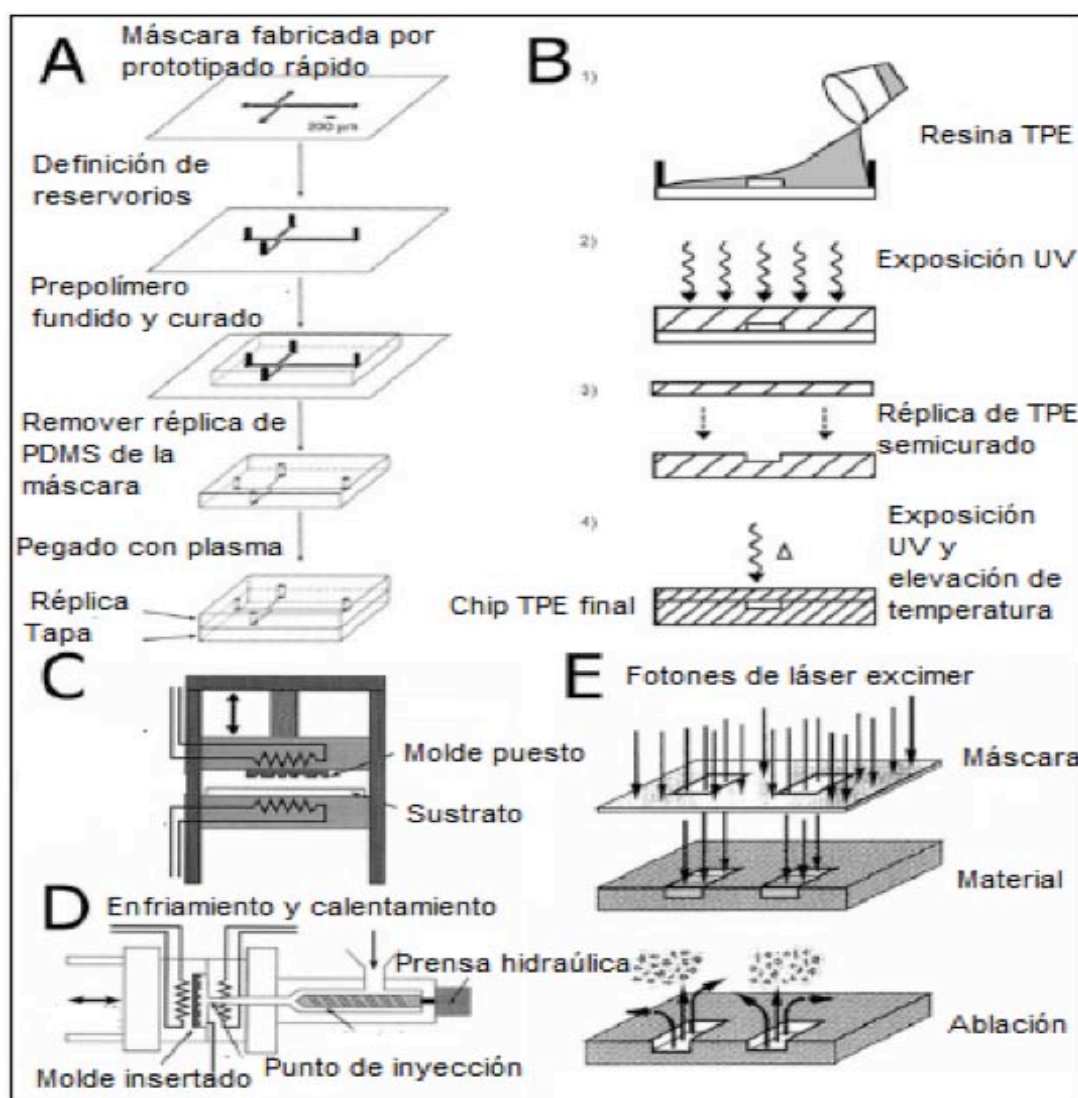


Figura 3. Principales métodos de fabricación. A: Fotolitografía y litografía suave. B: Poliéster termoestable. C: Estampado en caliente. D: Moldeo por inyección. E: Ablación con láser. Tomada de Fiorini & Chui, 2005.

Estampado en caliente.

Es una técnica que implica el uso de materiales termoplásticos, típicamente en forma de láminas planas, que se moldea contra un máscara (sello) usando presión y calor (Figura 3, inciso C). Los termoplásticos tienen la capacidad de ser remodelados cuando se calientan cerca de la temperatura de transición vítrea (T_g) del material. Ejemplos de termoplásticos utilizados en el estampado en caliente incluyen polimetacrilato de metilo (PMMA), policarbonato (PC), copolímero de olefina cíclica (COC), poliestireno (PS), policloruro de vinilo (PVC) y politereftalato de etilenglicol (PETG). Normalmente, las máscaras se hacen en silicio o metal. El estampado también puede llevarse a cabo sin calor mediante el uso de cantidades mayores de presión aplicada.

El estampado en caliente es bastante sencillo, rápido y de bajo costo, siempre y cuando haya acceso a los equipos necesarios como la prensa hidráulica y el sello a estampar. La fabricación del sello puede ser un proceso que consume tiempo, sin embargo, el estampado en caliente es ideal para situaciones que implican diseños de microfluidos de rutina (Fiorini et al., 2005; Tabeling, 2005).

Moldeo por inyección.

Es un proceso comúnmente utilizado en la industria de los plásticos para formar una variedad de objetos de uso cotidiano. Los pellets prepolimerizados de un termoplástico se funden y se inyectan a alta presión en la cavidad del molde calentado (Figura 3, inciso D). Las piezas inyectadas se enfrían por debajo del T_g del material y se liberan del molde. La naturaleza del plástico fundido durante la inyección permite un excelente contacto con las características del molde, lo que resulta en una replicación precisa. Parámetros tales como temperatura y presión de operación, así como el tiempo de residencia, afectan en gran medida el grado de contacto y por lo tanto deben ser optimizados para cada ciclo de producción. Una vez que los parámetros de funcionamiento están optimizados, la calidad de la replicación depende en gran medida de la calidad de las máscaras de molde fabricados, que se producen de manera similar a las máscaras utilizadas para el estampado en caliente (Fiorini et al., 2005; Tabeling, 2005).

Ablación láser.

La ablación con láser implica el uso de un láser pulsado de alta potencia para eliminar el material de una hoja de termoplástico (Figura 3, inciso E). Se utilizan a menudo láseres de pulsos UV-excimer, capaces de realizar pulsos del orden de 10 a 10^4 Hz debido a que la mayoría de los plásticos absorben la luz UV. Láseres excimer ArF (193 nm) se han

Introducción

utilizado para la ablación de PS, PC, acetato de celulosa, y politereftalato de etileno (PET). Láseres excimer KrF (248 nm) se han utilizado con PMMA, PETG, PVC, PC, y polimida. Un pulso de energía de unos pocos cientos de mJ por lo general puede realizar la ablación de aproximadamente 0.5 micras de material. Además del pulso de energía, la profundidad de los canales también depende de la frecuencia del pulso y las características de absorción del sustrato. La anchura mínima del canal de ablación está determinado por la óptica de enfoque utilizada para controlar la forma del haz (Fiorini et al., 2005; Tabeling, 2005).

Litografía suave.

Dos tecnologías se utilizan principalmente hoy en día para la fabricación de dispositivos de microfluidos. La primera de ellas se basa en vidrio a vidrio o unión anódica-silicio-al vidrio (Shih et al., 2004). Sin embargo, estas tecnologías de unión son a menudo laboriosas y consumen mucho tiempo. En la segunda técnica, conocida como litografía suave, los microcanales están moldeados en un bloque de polidimetilsiloxano (PDMS). Para ello, primero se prepara un molde hecho a base de foto-resina, por ejemplo SU8, teniendo como base una oblea de silicio realizándose el proceso de fotolitografía. Posteriormente, en la parte superior del molde, el PDMS se cura con el fin de replicar la red de microfluidos en el polímero. Una vez curado el polímero, éste se separa del molde y la estructura de PDMS se une a un sustrato plano para formar el dispositivo final con microcanales cerrados (Figura 4) (Plečis et al., 2007).

La litografía suave ofrece varias ventajas, incluyendo bajo costo, procesamiento rápido (<1 día para el dispositivo final), la reutilización de los moldes de SU-8, sellado fácil y unión a un número de diferentes sustratos. Además de los beneficios del proceso de fabricación, en sí el PDMS es adecuado para una variedad de aplicaciones biológicas y celulares, debido a la alta permeabilidad a gases (Fiorini et al., 2005). Un informe reciente sobre la síntesis de perfluoropoliéteres fotocurables (PFPE) con las propiedades del material y las capacidades de fabricación similares a PDMS, puede ofrecer un elastómero alternativo adecuado para las aplicaciones basadas en disolventes orgánicos (Rolland et al., 2004).

Introducción

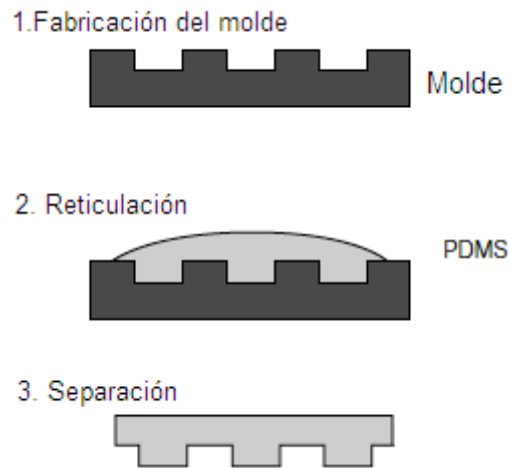


Figura 4. Litografía suave de PDMS. (1) molde hecho de un material duro; (2) vertido de la mezcla de PDMS + agente reticulante. El conjunto se lleva a la temperatura de polimerización de PDMS; (3) despegado de PDMS. Tomado de Tabeling, 2005.

Poliéster termoestable.

La réplica de moldeo usando poliéster termoestable (TPE) se lleva a cabo de una manera similar a la litografía suave con PDMS. Una resina TPE pre-curada se vierte sobre una máscara de silicio con SU-8 modelado, el curado del material contra la máscara produce el patrón deseado (Figura 3, inciso B). TPE difiere del PDMS en que primero el TPE se semicura usando luz UV, después se retira de la máscara, y luego se deja curar completamente en contra de una segunda pieza de TPE semicurada para obtener el canal definitivo. TPE, en contraste con PDMS, no es elastomérico, y cuando se cura, es un material duro, y como tal, requiere interconexiones de fluidos diferentes que los utilizados con PDMS. Además, TPE no es permeable al gas, haciéndolo adecuado para aplicaciones sensibles al oxígeno, pero probablemente inadecuadas para aplicaciones basadas en células a largo plazo (Fiorini et al., 2005).

1.2 Polidimetilsiloxano (PDMS).

El elastómero de PDMS es el más ampliamente usado y uno de los materiales más versátiles que se utiliza en la construcción de dispositivos de microfluidos, en particular para la creación rápida de prototipos. Una de las razones de la popularidad de PDMS es particularmente los métodos de fabricación sencillos. El PDMS tiene características tan esenciales tales como: elastómero, puede ser ópticamente transparente, químicamente inerte, permeable a los gases y susceptible de fabricación a través de prototipado rápido (Tabla 1). Sin embargo, a pesar de las muchas ventajas del PDMS, la superficie es naturalmente hidrofóbica (Figura 5) y limita su compatibilidad con disolventes orgánicos.

Introducción

Un número de esfuerzos se han hecho para modificar la superficie de los canales de PDMS, con el fin de mejorar la hidrofilia que limitan su aplicabilidad para dispositivos analíticos (Bodas et al., 2006; Fujii, 2002). Además, no es adecuado llevar a cabo reacciones de polimerización sensibles al oxígeno en canales de PDMS por su permeabilidad a los gases.

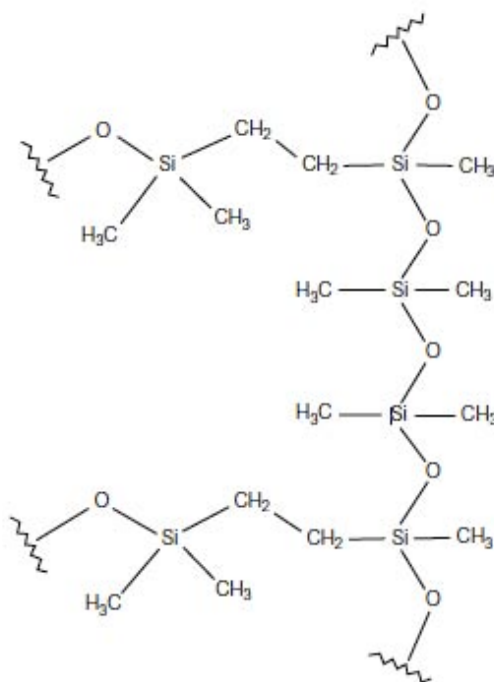


Figura 5. Semi-estructura del PDMS. Tomada de Tabeling, 2005.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de PDMS. Tomada de Tabeling, 2005.

Propiedad	Característica
Densidad	Aproximadamente 0.9 kg/m ³
Óptica	Transparente entre 300 nm y 2200 nm
Eléctrica	Aislante, campo de ruptura 20 kV/cm
Mecánica	Elastomérica
Térmica	Aislante, Conductividad térmica 0.2 W/m/K
Interfacial	Baja energía superficial (20 mN/m)
Permeabilidad	Permeable a gases, solventes apolares orgánicos, casi impermeable al agua
Reactividad	Inerte, oxidable por plasma
Toxicidad	No tóxico

Introducción

1.3 Flujos en microfluídica.

La alta relación superficie/volumen resultante de la reducción de escala implica que los efectos inerciales, que están relacionados con el volumen, se vuelven menos importantes que las fuerzas viscosas que resultan de la fuerza de fricción a lo largo de la pared del canal. Esta propiedad de la microfluídica está bien representada por el número de Reynolds (Re) (Ecuación 1) (Brivio et al., 2006); el cual es un parámetro adimensional que indica el comportamiento de fluidos dentro de canales. Para sistemas microfluídicos Re es típicamente menor a 2000, situación en la que el líquido es considerado esencialmente laminar, y contrasta con los fluidos en canales a macroescala (Re>40000) en donde el flujo es turbulento (Figura 6) (Castillero, 2015; Hartman et al., 2009).

$$Re = D * v * \rho / \mu$$

Ecuación 1. Número de Reynolds.

Re = Número de Reynolds.

D = Diámetro del ducto (m).

v = Velocidad promedio del líquido (m/s)

ρ = Densidad del líquido (Kg/m³).

μ = Viscosidad del líquido (Pa*s; Kg/m*s).

Re ≤ 2000 Flujo laminar

Re ≥ 40000 Flujo turbulento

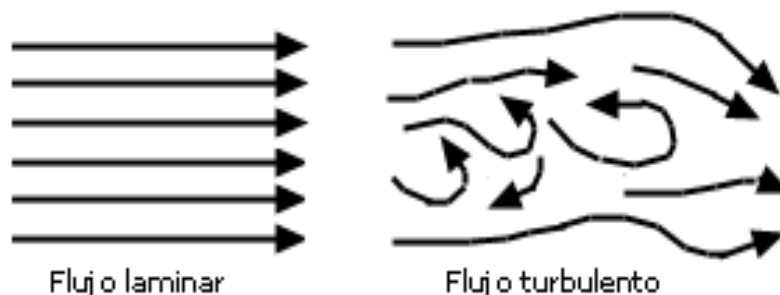


Figura 6. Diferencia de orden entre el flujo laminar y el flujo turbulento. Tomado de Castillero, 2015.

Mezclado de los microfluidos.

Los Números de Reynolds típicos encontrados en microcanales se encuentran muy por debajo de la transición entre régimen laminar y régimen turbulento ($Re = 2500$), siendo en la mayoría de los casos menor que uno (Brivio et al., 2006).

En el régimen de flujo laminar, el mezclado se logra a través de difusión (movimiento molecular aleatorio a lo largo de un gradiente de concentración), y por lo tanto depende de la naturaleza de las especies químicas que se mezclan y de la geometría del canal (Brivio et al., 2006).

Una consecuencia natural de flujo laminar en los sistemas de microfluidos es que múltiples flujos pueden fluir de lado a lado sin mezcla turbulenta (sólo mezcla difusional se produce; Figura 7), que es una ventaja en algunas aplicaciones, pero problemático para situaciones que requieren una mezcla rápida de soluciones en microcanales (Fiorini et al., 2005).



Figura 7. Mezclado por difusión. Tomada de Fiorini & Chui, 2005.

Una mezcla de reactivo eficaz y rápida es crucial para obtener una alta sensibilidad, especialmente en reacciones llevadas a cabo en dispositivos LOC. Esto no siempre es sencillo ya que la mezcla de reactivos a menudo se rige por difusión pasiva, que es demasiado lento en comparación con el tiempo de residencia de los reactivos dentro del chip (Mirasoli et al., 2014).

Se han desarrollado estrategias que se centran en mejorar el contacto interfacial de corrientes de fluido para la difusión eficiente; por ejemplo, la laminación de corrientes de microfluidos donde las corrientes se dividen en varias ocasiones y se recombinan. Otra estrategia para la mezcla es a través de la advección caótica. En este enfoque, los investigadores introducen diseños de canales únicos, donde se incluyen estructuras de bajo relieve en microcanales de serpentín de 3 dimensiones para inducir la advección caótica. En general, para la laminación o la advección caótica, se pueden requerir diseños de canal multidimensionales, por lo que los dispositivos desechables tienen una ventaja

Introducción

sobre los dispositivos de vidrio debido a la facilidad de fabricación de múltiples capas en plásticos (Fiorini et al., 2005; Tabeling, 2005).

1.4 Métodos de detección en microdispositivos.

Desde el principio de los noventa la fluorescencia inducida por láser (LIF) ha sido la técnica de elección para la detección de dispositivos μ TAS, principalmente debido a su sensibilidad, simplicidad y la idoneidad para la detección de biomoléculas. Sin embargo, la limitada aplicabilidad de esta técnica a las especies ópticamente activas con un cromóforo adecuado ha estimulado la investigación en otras direcciones (Brivio et al., 2006).

Un gran número de técnicas de detección para el análisis en microdispositivos han sido explotados durante la última década, principalmente para su aplicación en sistemas μ TAS. Estos incluyen, entre otros, métodos electroquímicos, absorción UV-Vis, medición del índice de refracción y espectrometría de masas (Brivio et al., 2006; Escarpa et al., 2007; Fernández-la-Villa et al., 2012; Fu et al., 2014; Gunasekara et al., 2014).

Detección óptica.

La detección óptica ha visto un uso extensivo en la microfluídica debido principalmente a la facilidad de aplicación y requisitos de equipo razonables. La fluorescencia es el método de detección óptica más popular y ampliamente utilizado para la microfluídica, debido a su excelente sensibilidad, que a menudo se requiere debido a los pequeños volúmenes de muestra involucradas (Fiorini et al., 2005). Por ejemplo, se han detectado y cuantificado fragmentos de ADN con alta eficiencia empleando microdispositivos (Effenhauser et al., 1997). También se reportan separaciones de 15 pM de rodamina 6G y 30 pM de rodamina B realizado en un microcanal de electroforesis con detección con ráfagas de fluorescencia a partir de moléculas individuales (Fister et al., 1998). Además, se ha monitorado con alta resolución el paso de diferentes tipos de analitos fluorescentes, cuando migran y son separados, en el canal microfluídico por electroforesis capilar dentro de un microchip (Dongre, et al., 2008).

Al considerar el uso de métodos de detección ópticos con dispositivos de microfluidos de plástico desechable se debe tener especial cuidado en la selección de un material apropiado. El material del chip debe ser transparente a la luz, especialmente en las regiones de longitud de onda equivalente a la longitud de onda de muestreo o a las longitudes de onda de excitación y emisión, para el caso de fluorescencia. La mayoría de los polímeros son adecuados para su uso con longitudes de onda visibles y UV (Fiorini et

Introducción

al., 2005), por ejemplo, se ha empleado un microdispositivo hecho de PDMS para la cuantificación colorimétrica de plaguicidas organofosforados en productos alimenticios (Meng et al. 2015), y en otro trabajo se empleó un microdispositivo hecho de PMMA para la determinación por espectroscopia visible de formaldehído (Fu et al., 2014).

Absorción UV-Visible.

Es una técnica analítica directa que a menudo se utiliza porque la mayoría de los analitos absorben la luz UV-Visible; sin embargo, el uso de detección de absorbancia en la microfluídica está por detrás de la fluorescencia. Las pequeñas dimensiones, del orden de micrómetros, de los canales de microfluidos limitan la longitud del paso óptico disponible para mediciones de absorbancia, disminuyendo severamente la sensibilidad de las mediciones de absorbancia en el chip. Por lo tanto, la mayoría del trabajo en el área de detección de absorbancia con la microfluídica gira en torno a la búsqueda de formas de aumentar la longitud del paso óptico disponible, lo que aumenta la sensibilidad, o formas de recolección de luz más eficiente, minimizando así las pérdidas (Fiorini et al., 2005).

A pesar de las limitaciones citadas existen muchas publicaciones en las que se han trabajado LOC's con detección de absorción UV-Visible. Por ejemplo, la detección de creatinina por la combinación con una solución de picrato de sodio alcalino para formar un complejo de color naranja-rojo que absorbe a 510 nm (Golonka et al., 2005). En otro trabajo se realiza la detección de fluoresceína obteniendo un límite de detección de absorbancia de 0.001 UA (Ro et al., 2005), y en el trabajo reportado por (Ueno et al., 2001) se fabricó un dispositivo de microfluidos para la detección óptica de benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos en el aire. Cabe destacar que en los trabajos anteriores se hace uso de fibra óptica para la detección.

1.5 Paso de luz a través de fibras ópticas.

Las fibras ópticas están diseñadas para transmitir la luz desde un extremo de la fibra a la otra con una mínima pérdida de energía (Figura 8). El principio de funcionamiento en una fibra óptica es la reflexión total interna. Cuando la luz pasa de un material a otro, cambia su dirección. De acuerdo con la ley de Snell, el nuevo ángulo del rayo de luz se puede predecir a partir de los índices de refracción de los dos materiales. Cuando el ángulo es perpendicular (90°) a la interfaz, la transmisión en el segundo material es máximo y la reflexión es mínimo. La reflexión aumenta a medida que el ángulo se acerca

Introducción

a la interfaz paralela. En el ángulo crítico y por arriba de éste, la transmisión es 0% y la reflexión es 100% (Figura 9).

Hay muchos tipos de fibras disponibles, con una variedad de aperturas numéricas. Una fibra con una apertura numérica mayor recogerá más luz que una fibra con una apertura numérica más pequeña, por lo que es importante tener en ambos extremos del sistema fibras con la mayor apertura numérica posible (<http://oceanoptics.com/product-category/numerical-aperture/>).

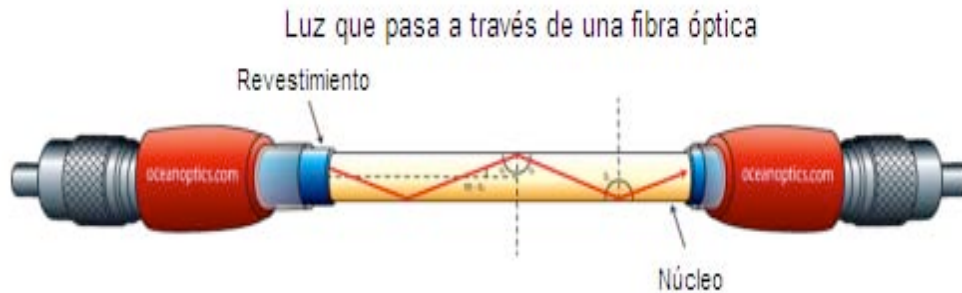


Figura 8. Luz que pasa a través de fibra óptica. Tomada de <http://oceanoptics.com/product-category/numerical-aperture/>

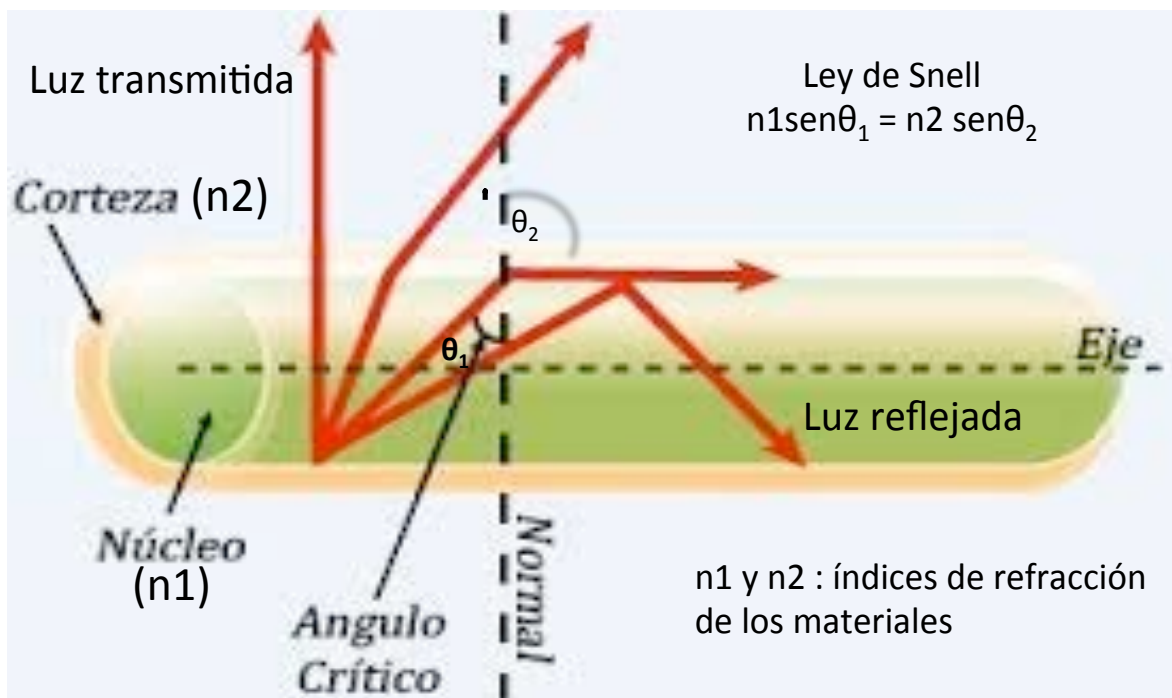


Figura 9. Ilustración de la Ley de Snell. Tomada de <http://iriartevega-fibraoptica.blogspot.mx/2009/08/conclusiones-tyndall-reflexion-total.html>

Introducción

1.6 Polifenoles.

El término polifenoles engloba a todas aquellas sustancias con varios grupos hidroxilo, que es el nombre común del hidroxibenceno (Escutia, 2011).

La clasificación más común de estos compuestos (Figura 10), está basada en su estructura química y se divide en los siguientes grupos:

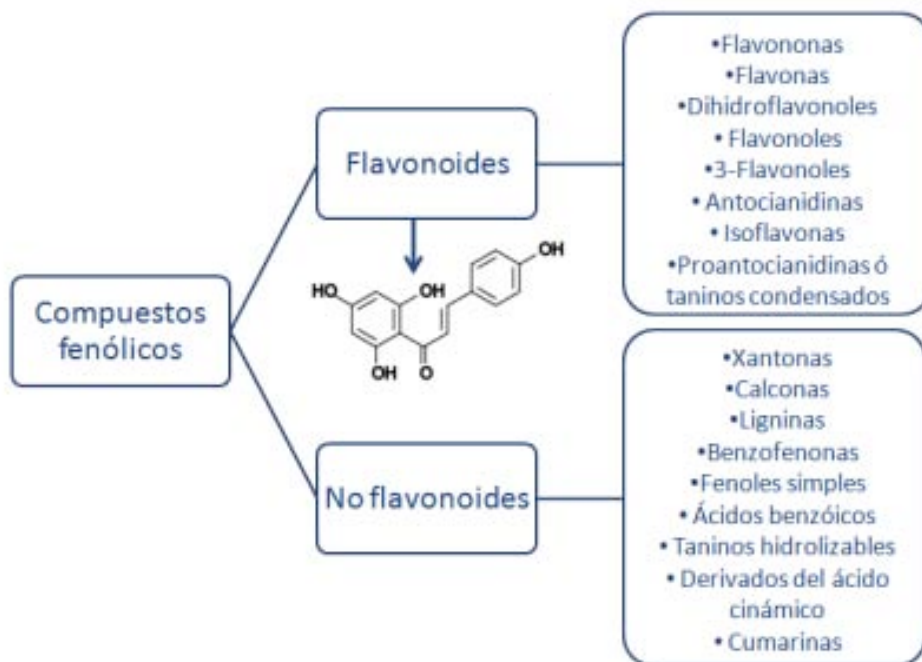


Figura 10. Clasificación de los compuestos fenólicos con base en su estructura. Tomada de Escutia, 2011.

En la Figura 11 se muestran la estructura química de algunos polifenoles.

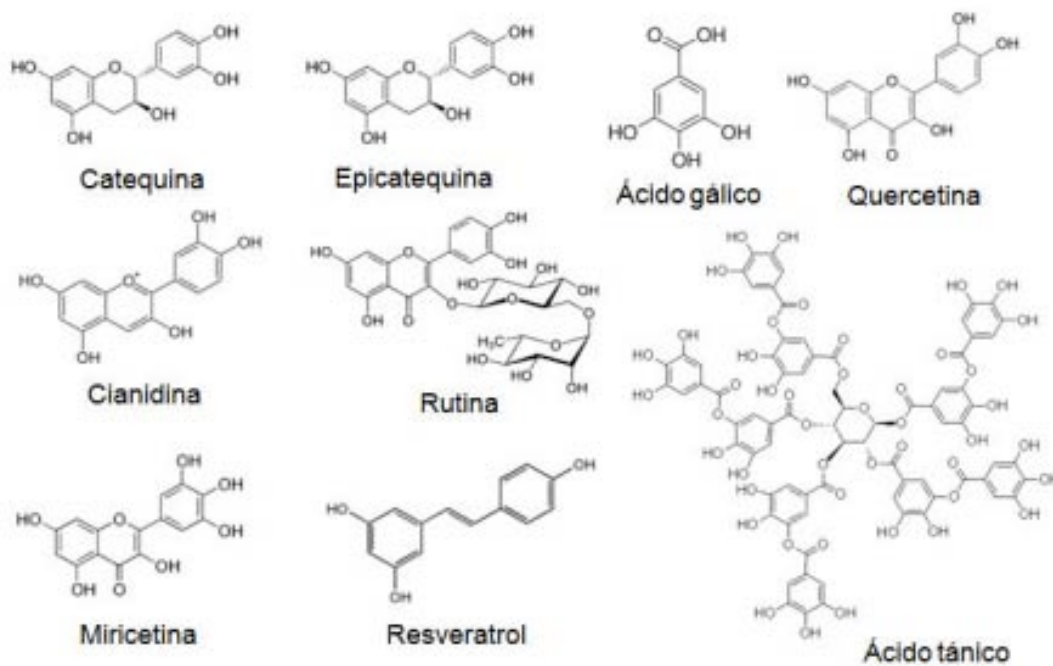


Figura 11. Estructuras químicas de algunos polifenoles. Tomada de Escutia, 2011.

Introducción

Varios estudios han demostrado constantemente que el consumo de frutas y verduras se asocia inversamente con el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas, como las enfermedades cardiovasculares, ciertas formas de cáncer y enfermedades neurodegenerativas (McKay et al., 2014). Los componentes fitoquímicos de estos alimentos parecen contribuir sustancialmente a este beneficio porque tienen una amplia gama de acciones biológicas, incluyendo la capacidad de actuar como antioxidantes, disminuir la inflamación, modular la actividad enzimática y regular la expresión génica (McKay et al., 2014; Quiñones et al., 2012).

A las frutas y verduras se les han atribuido propiedades en contra del cáncer, al menos en parte, a su alto contenido en polifenoles. Los polifenoles son parte integral de la dieta humana con flavonoides y ácidos fenólicos que representan la mayoría de los polifenoles presentes en los alimentos. Además de frutas y verduras, hojas, frutos, semillas, cortezas y flores también son fuentes ricas en polifenoles (Fresco et al., 2010; Quiñones et al., 2012).

Los compuestos fenólicos que se encuentran en los distintos alimentos constituyen una fracción muy compleja formada por un número muy grande de compuestos, algunos de los cuales aún no han sido identificados. La concentración de polifenoles de cualquier alimento también es muy variable ya que depende de varios factores como la especie y el grado de maduración del vegetal o fruto (Escutia, 2011).

Los polifenoles de la dieta se consumen principalmente a través de frutas y bebidas (jugo, vino, té, café, chocolate y cerveza), además de verduras, cereales y derivados de la oliva, componentes de los alimentos asociados principalmente a la dieta mediterránea (Fresco et al., 2010).

Específicamente hablando de vino, los compuestos fenólicos, tales como ácidos fenólicos, catequinas, y algunos flavonoides juegan un papel importante en la calidad de los vinos, que contribuye a las propiedades de sabor y color, especialmente en vinos tintos (Franquet-Griell et al., 2012).

Los polifenoles tienen una gran interés en enología no sólo por ser responsables de muchas de las propiedades organolépticas del vino, fundamentalmente el color y la astringencia, sino porque también se les asocian algunos de los efectos fisiológicos beneficiosos derivados del consumo moderado de vino, especialmente su poder antioxidante cardioprotector y vasodilatador, entre otros (Jiménez, 2015).

La concentración de compuestos fenólicos en el vino está condicionada por diversos factores relacionados con la uva (variedad, calidad de la vendimia, suelo, clima, etc.) y las prácticas enológicas. Durante la vinificación, factores como el tiempo y la temperatura de

Introducción

maceración, la fermentación en contacto con hollejos y pepitas (lugar donde se encuentran los polifenoles en la uva), la adición de enzimas, la concentración de SO₂, el prensado, afectan a la extracción de los compuestos fenólicos de la uva al mosto/vino. Durante el envejecimiento en botella, los antocianos (pigmentos rojos de las uvas tintas y naturalmente del vino tinto) del vino descienden, aunque el contenido de polifenoles totales sufre menos variaciones. Todo ello hace que el contenido total de polifenoles se sitúe alrededor de 150-400 µg/mL para los vinos blancos y de 800 hasta 4000 µg/mL para los vinos tintos. En cuanto a la cantidad de compuestos fenólicos presentes en los vinos analizados depende de su cuantía en la uva y del proceso de vinificación (Jiménez, 2015).

Cuantificación de polifenoles. Ensayo de Folin-Ciocalteu.

El método más usado y sencillo para la determinación del contenido total de polifenoles en alimentos es el ensayo de Folin-Ciocalteu en el que se utiliza un reactivo del mismo nombre, que consiste en una disolución de iones complejos provenientes de los heteropoliácidos fosfotúngstico (H₃PW₁₂O₄₀) y fosfomolibdico (H₃PMo₁₂O₄₀) en los cuales el molibdeno y el tungsteno se encuentran en estado de oxidación 6+. Los constituyentes metálicos de estos iones complejos son reducidos por el grupo hidroxilo de los polifenoles formando un producto de color azul (Figura 12). La absorbancia de este producto se mide a λ = 730 nm y mediante la ley de Lambert-Beer (Ecuación 2), es posible relacionarla con la concentración de polifenoles totales frecuentemente referida como equivalente de ácido gálico o ácido tánico (Chen et al., 2015; Friedman et al., 2000).

$$A = l \cdot C \cdot \epsilon$$

Ecuación 2. Ley de Lambert-Beer

A = Absorbancia

l = Longitud de paso óptico (cm).

C = concentración de disolución (M).

ε = Coeficiente de absortividad molar (1 / cm*M)

El ensayo de Folin-Ciocalteu es un método conveniente y simple porque no requiere ningún equipo especial y puede ser útil en la caracterización y estandarización de muestras botánicas. Una ventaja importante del ensayo es que tiene una respuesta equivalente a diferentes sustancias fenólicas en vinos, lo que es adecuado para medir con

Introducción

precisión los compuestos fenólicos totales. En consecuencia, la determinación total de contenidos fenólicos basado en el ensayo de Folin-Ciocalteu se ha utilizado ampliamente para caracterizar vinos y licores, zumos de frutas, tejidos vegetales, grano de sorgo y otros productos similares.

El ensayo de Folin-Ciocalteu depende de la oxidación selectiva de sustancias similares fácilmente oxidables que contribuyen al contenido de fenoles totales aparente. Sin embargo, todavía hay algunas desventajas de utilizar este ensayo, ya que puede carecer de especificidad, porque aunque el ensayo de Folin-Ciocalteu produce resultados predecibles en una amplia gama de compuestos fenólicos, los resultados pueden verse afectados por otras moléculas reductoras no fenólicas, tales como azúcares, aminas aromáticas, dióxido de azufre, ácido ascórbico, ácidos orgánicos y hierro (II), además de otros enedíoles y reductoras (Chen et al., 2015).

Química de la reacción.

La química pertinente de tungstos y molibdatos es muy compleja. Los isopolifotungstos son incoloros en el estado de valencia 6+ del metal que está totalmente oxidado, por otra parte los compuestos análogos de molibdeno son de color amarillo. Ellos forman heteropoliácidos fosfo tungstato-molibdato mixtos que existen en solución de ácido en forma de complejos octaédricos hidratados con los óxidos metálicos coordinados alrededor de un fosfato central. Secuencias de uno o dos reducciones reversibles conducen a especies azules tales como $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$. En principio, la adición de un electrón a un orbital no enlazante formalmente reduce unidades nominales MoO^{4+} a especies azules MoO^{3+} isoestructurales. Las estructuras moleculares y electrónicas detalladas de los productos azules de reducción no son claros y es probable que lo sigan siendo en vista de su naturaleza compleja (Singleton et al., 1999).

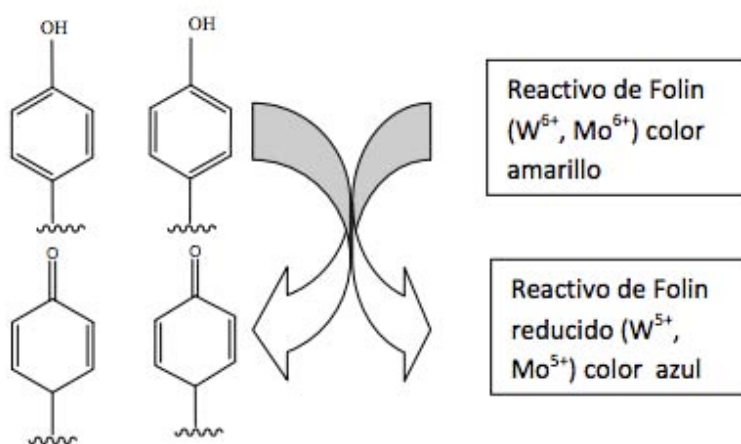


Figura 12. Ensayo de Folin-Ciocalteu.

Introducción

Existen ejemplos del uso de microchips para determinar polifenoles con detección electroquímica (Goldbach et al., 2006); sin embargo, el análisis consume mucho tiempo. Por ello en el presente trabajo se emplea espectroscopia visible con ayuda de fibra óptica.

1.7 Ensayos FIA en microchips.

El ensayo de análisis por inyección en flujo (FIA) se basa en la medición de una señal analítica transitoria producida tras la inyección automatizada de un volumen bien definido de muestra en una corriente portadora que fluye y que contiene al reactivo. Los productos de la reacción se miden antes de que se establezcan condiciones de "estado estacionario" y el tiempo de contacto de la muestra y los reactivos en el sistema es constante, proporcionando así tiempos de ensayo cortos y alta reproducibilidad. FIA con detección de quimioluminiscencia y/o quimioluminiscencia electrogenerada son ampliamente utilizados en la actualidad en el campo farmacéutico, proporcionando un alto rendimiento de la muestra, automatización, alta detectabilidad, y condiciones reproducibles para el análisis. FIA en formato microchip (μ FIA) tiene la capacidad potencial de reducir el consumo de muestra y reactivos, además de reducir los tiempos de análisis (Mirasoli et al., 2014). Esto creó una demanda para el desarrollo de sistemas de análisis por inyección en micro-flujo comerciales (Luttge, 2011). Un ejemplo es el trabajo desarrollado por Ferreira et al., (2013) en el que se describe el desarrollo de un sistema microfluídico que tiene como componente principal un reactor enzimático constituido por un microcanal hecho de PMMA conectado a un detector amperométrico. El sistema propuesto se aplicó a la determinación amperométrica de contenido de glucosa en bebidas gaseosas.

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 Equipo.

- Balanza analítica Ohaus modelo E12140
- Bomba peristáltica ISMATEC de 4 canales
- Válvula de inyección Up Church Scientific V-451 6 port inj valve
- Tubería tygon
- Tubería de teflón 0.51 mm ID
- Parrilla Cimarec modelo sp46925
- Horno Heating Incubator. Prolab DHP-9032
- Microscopio Leica DM IL LED
- Cámara Phantom modelo Miro M110 Mono
- Balanza Scout Ohaus 200 x 0.01 g
- Lámpara de UV Black Ray B-100AP, UVP
- Fibra óptica multimodal $50 \pm 5 \mu\text{m}$, $100 \pm 3 \mu\text{m}$ y $200 \pm 4 \mu\text{m}$ UV. Apertura numérica 0.22.

Ocean Optics

- Lámpara de halógeno OSRAM 6V 10W 64225
- Software spectrasuite
- Detector Ocean Optics USB 4000
- Celda de flujo SMA-Z con fibra óptica
- Spin Coater WS-650. Laurell Technologies
- Equipo generador de plasma. Laboratory Corona Treater (BD-20AC, Electro-Technic Products)

2.2 Reactivos.

- Reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck).
- Hidróxido de sodio (Fermont).
- Ácido tánico (Sigam Aldrich).
- Oblea de Silicio de 3 pulgadas de diámetro, grosor $381 \pm 25 \mu\text{m}$. Silicon Valley Microelectronics, E.U.
- Resina fotosensible SU-8 2025. Microhem Inc.
- 1-propanol (J.T. Baker).
- Revelador de Su8. Microchem, E.U.
- Monómero de PDMS. SYLGARD 184 Silicone elastomer base, Dow corning.
- Agente curante. SYLGARD 184 Silicone elastomer base, Dow corning.

Desarrollo experimental

2.3 Disoluciones.

- Disolución de Reactivo de Folin-Ciocalteu.

Se tomó un volumen de 2.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y se colocó en un matraz volumétrico de 25 mL, se llevó a la marca de aforo con agua destilada. Se realizó una dilución 1:10.

- Disolución de Hidróxido de sodio 0.5 M.

Se pesaron 0.5 g de hidróxido de sodio y se disolvieron en aproximadamente 10 mL de agua destilada previamente hervida. Se transfirió cuantitativamente la disolución a un matraz volumétrico de 25 mL y se llevó a la marca de aforo con agua destilada.

- Disolución madre de ácido tánico 0.29 mM.

Se pesaron 0.025 g de ácido tánico y se disolvieron en aproximadamente 30 mL de agua destilada. Se transfirió cuantitativamente la disolución a un matraz volumétrico de 50 mL y se llevó a la marca de aforo con agua destilada.

- Estándares para la curva de calibración de ácido tánico.

De la disolución madre de ácido tánico, se prepararon estándares de concentración a partir de 0.0059 mM hasta 0.237 mM.

2.4 Fabricación de los microdispositivos.

La fabricación de los microdispositivos involucra los siguientes pasos:

- El diseño de la forma de los microcanales que posteriormente se imprimen en un negativo en acetato (máscara).
- Fotolitografía, proceso en el que se construye el molde para replicar los microchips.
- Litografía suave, proceso por el cual se construyen los microdispositivos.
- Sellado de los microchips, proceso en el que se sellan los microcanales.

Diseño de la forma de los microcanales.

El diseño de los microcanales (Figura 13) se realizó con el software de diseño Adobe Illustrator CS6 acomodándolos dentro de una circunferencia de 65 mm de diámetro debido a que es el espacio disponible para un molde en la oblea de silicio. Se imprimieron en negativo en un acetato (Grupo Grafiscanner Addisa), la cual es la máscara con la que se transfieren los diseños al molde.

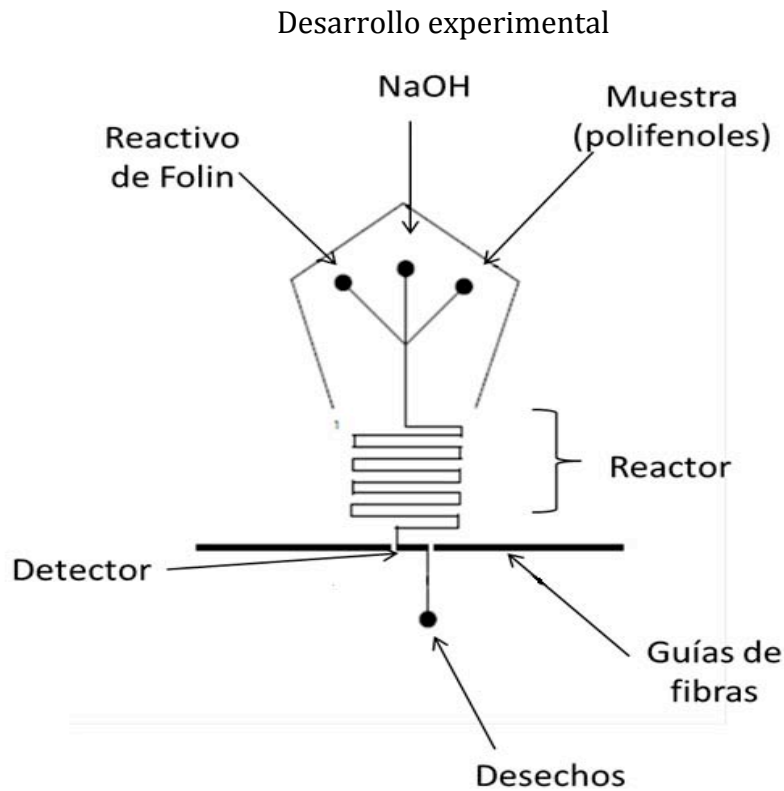


Figura 13. Diseño de la forma de los microcanales.

Fotolitografía (Castillero, 2015).

A través de la técnica de fotolitografía se hizo el molde para la fabricación de las réplicas de los microdispositivos.

La elaboración de los micromoldes hechos por fotolitografía con resina SU-8 se describe a continuación:

1.- Se retiró del empaque la oblea de silicio y se colocó en una parrilla a 210 °C por 5 minutos para remover toda humedad remanente, después se metió a un horno por 10 minutos a 70 °C para disminuir su temperatura. Pasado este periodo de tiempo la oblea de silicio se sacó del horno y se dejó que alcanzara la temperatura ambiente antes de ponerla en el Spin-coater.

2.- La oblea se centró en el Spin coater y se vertieron aproximadamente 3 mL de resina SU-8 sobre ella.

Desarrollo experimental

3.- Se comenzó el programa de rotación, primero 10 segundos a 500 rpm con una aceleración de 100 rpm/s para homogenizar la distribución de la resina en la oblea y después 40 segundos a 550 rpm con una aceleración de 300 rpm/s para establecer la altura de los microcanales deseada (100 μm).

4.- Una vez depositada la resina, se pasó la oblea con la resina a un proceso de calentamiento en parrilla con el fin de ir evaporando el disolvente presente en la resina. El proceso de calentamiento (*Softbake*) consta de 5 minutos a 75 °C y posteriormente 20 minutos a 105 °C.

5.- Una vez que la oblea alcanzó la temperatura ambiente, se colocó sobre ella la máscara con el diseño deseado y un vidrio de 4 mm de espesor. La máscara con la oblea se colocó bajo la radiación de la lámpara de rayos UV por 45 s a 30 cm de distancia para permitir la óptima polimerización de la resina.

6.- Después de la radiación de rayos UV, se retiró la máscara de la oblea y se procedió a hacer un segundo proceso de calentamiento (*Post exposure bake*). Primero se calentó la oblea durante 5 minutos a 75 °C y posteriormente a 105 °C por 10 minutos.

7.- Una vez que la oblea alcanzó la temperatura ambiente, se sumergió en 15 mL de disolvente revelador por 10 minutos, esto con el fin de retirar el exceso de resina que no polimerizó en el proceso de irradiación. Pasados los 10 minutos, se le dio un enjuague final con 1-propanol para asegurar que no hubiera exceso de resina no polimerizada, y se secó la oblea en el horno a 70 °C por algunos minutos.

Desarrollo experimental

El esquema de la Figura 14 resume los pasos para la construcción del molde.

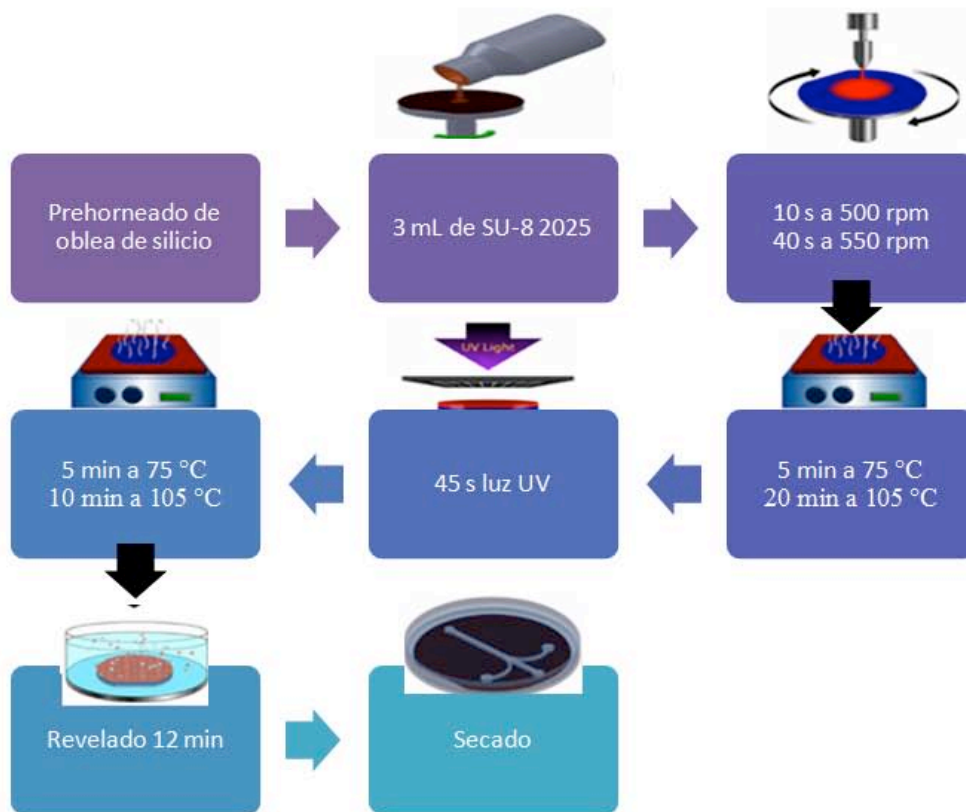


Figura 14. Proceso de la técnica de fotolitografía para la construcción del molde para la fabricación de los microdispositivos. Tomada de Castellero, 2015.

Litografía suave (Castillero, 2015).

Se puso el micromolde en una caja Petri de 9 cm de diámetro y se agregan 23 g de la mezcla de monómero de PDMS con agente curante (relación 10:0.9) recién preparado.

Una vez que se tuvo hecho el micromolde con el diseño deseado, se pueden hacer réplicas de microchips en PDMS. El proceso de fabricación de microchips se describe a continuación.

- 1.- Primero se limpió, de polvo y partículas, el área de trabajo, los micromoldes y los vasos con aire comprimido.
- 2.- Se mezcló, en un vaso, el monómero de PDMS con agente curante en proporción en peso 10:0.9, se mezcló vigorosamente la mezcla por 1 minuto y se vació en el micromolde.
- 3.- El micromolde con el PDMS se introdujo a una cámara de vacío por 25 minutos para eliminar todas las burbujas formadas durante el mezclado.

Desarrollo experimental

4.- Una vez que el PDMS no tuvo burbujas, se introdujo en un horno a 70 °C por al menos 3 horas para acelerar el polimerizado.

5.- Una vez que el PDMS ha polimerizado y tiene una consistencia flexible y firme, se corta el diseño del microchip con un bisturí y se retira del micromolde (Figura 15). El microchip de PDMS es perforado en las entradas destinadas a la entrada de líquidos con un horador de 0.75 mm de diámetro.



Figura 15. Molde con PDMS.

Sellado de los microcanales.

Algunas consideraciones previas al pegado de los microchips son:

- Se debe de hacer en un cuarto limpio.
- Las dos superficies tienen que estar perfectamente limpias para lo cual se retira con cinta mágica cualquier partícula de polvo que pudiera estar presente.

Los microchips perforados son pegados a otra capa de PDMS a través de una descarga de plasma:

1.- Primero se incidió la descarga de plasma uniformemente en la capa que tiene el relieve de los microcanales por 15 segundos y, posteriormente a la otra capa lisa por otros 15 segundos (Figura 16).

2.- Una vez que ambas superficies han sido activadas por la descarga de plasma, se procedió a juntarlas y presionarlas un poco con las yemas de los dedos, esto con el fin de evitar burbujas. Una vez hecho el pegado, se dejan reposar por al menos una noche antes de su uso.

Desarrollo experimental



Figura 16. Tratamiento de PDMS con plasma.

Los procesos de fotolitografía, litografía suave y sellado de los microcanales se presentan en la Figura 17.

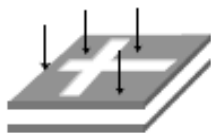
(1) Oblea de silicio



(2) Recubrimiento con la resina fotosensible



(3) Exposición UV



(4) Revelado



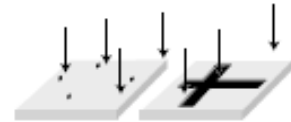
(5) Moldeo y reticulación



(6) Desmoldeo



(7) O₂ Plasma



(8) Adhesión permanente



Figura 17. Esquematización de los procesos de fotolitografía, litografía suave y sellado de los microcanales.

Tomada de Tabeling, 2005.

2.5 Evaluación de dispositivos de microfluídica para la determinación de polifenoles totales expresado como ácido tánico *in situ*.

Evaluación del ancho de los microcanales de los microchips fabricados.

Se fabricaron microdispositivos con diferente ancho de microcanales para evaluar el efecto que presenta en la determinación de polifenoles totales. Para ello, se replicó el diseño de la Figura 13 modificando el ancho de los microcanales. Los valores de ancho evaluados fueron 70, 77, 110 y 120 μm . La evaluación se efectuó a través de una comparación estadística de la sensibilidad obtenida por cada microchip.

Se evaluaron valores de 250 y 500 μm para el ancho de las guías de las fibras que presenta el diseño. La evaluación consistió en la facilidad con que podían ser insertadas las fibras ópticas al microchip y por lo tanto observar que tan ajustadas quedaban en el espacio destinado. Otro punto importante en la evaluación consistió en observar (a través del Software spectrasuite) la intensidad de luz transmitida de la fibra conectada a la lámpara de halógeno hacia la otra fibra.

Inserción de fibra óptica en el microchip.

Una vez construido el microchip, se insertó fibra óptica de diferentes diámetros por las guías que presenta el diseño para la determinación de polifenoles totales *in situ* (Figura 12). Para ello, el PDMS es un buen material porque no absorbe en la región del visible. (Bodas et al., 2006; Fiorini et al., 2005; Delamarche et al., 1998). La inserción se realizó colocando un extremo de la fibra en el orificio situado a los costados del microchip, y se empujó hasta el otro extremo de la guía hasta que estuviera lo más cercano al microcanal que forma el paso óptico; del mismo modo se insertó la segunda fibra. Los extremos de las fibras que quedan fuera del microchip, uno se pone en contacto directo con la lámpara de halógeno y el otro se conecta al detector Ocean Optics USB 4000 (Figura 18). De esta manera se construyó el detector. Se evaluaron diferentes distancias de paso óptico desde 0.11 mm hasta 7 mm.

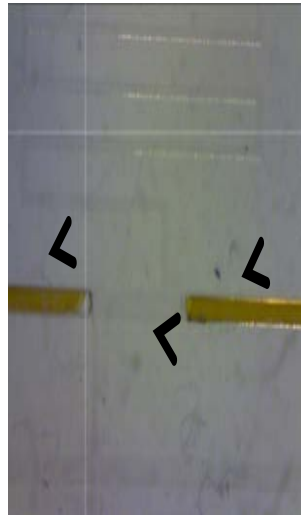
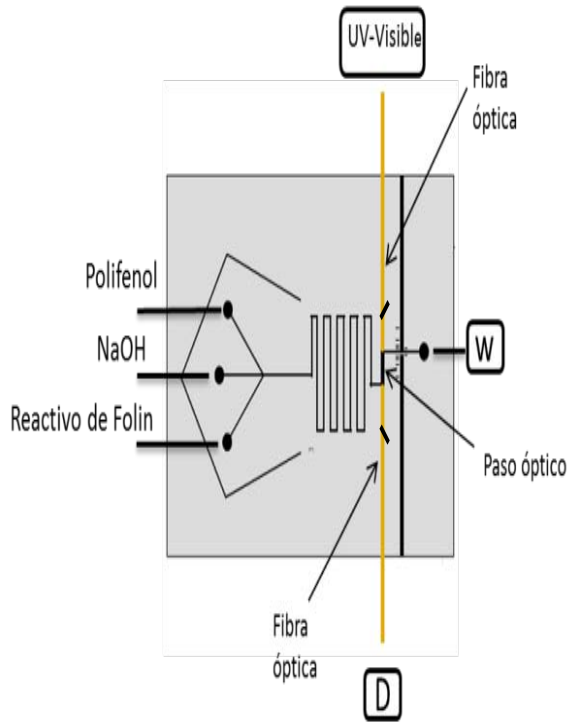
Desarrollo experimental

Evaluación de la determinación de polifenoles totales *in situ*.

La Figura 18 muestra el microdispositivo utilizado para la determinación de polifenoles. Éste se acopla a un sistema de propulsión, inyección y detección (Figura 19). Todos los reactivos son introducidos al microchip a través de tubería tygon y de teflón. Estos últimos se insertaron en los orificios hechos al microchip simplemente haciendo un poco de presión. El hidróxido de sodio y el reactivo de Folin-Ciocalteu son introducidos directamente al microchip con ayuda de una bomba peristáltica de 4 canales, mientras que la tubería que transporta la muestra de polifenoles se conecta a la válvula de inyección, la cual presenta dos posiciones; en una, la muestra pasa hacia el microdispositivo (posición 1) y en la otra el caudal de muestra se dirige hacia desechos (posición 2). De esta manera, teniendo la válvula de inyección 6 segundos en posición que permita el paso hacia el microchip, se aspiran 3.4 μL de estándar de ácido tánico a un caudal de 34 $\mu\text{L}/\text{min}$; el reactivo de Folin-Ciocalteu y el hidróxido de sodio presentan el mismo caudal. Dentro del microchip los reactivos se mezclan en el reactor de serpentín para dar lugar al producto de reacción, que es detectado por espectroscopia visible por medio de las fibras ópticas. Finalmente tiene una salida para los desechos. Las señales analíticas obtenidas forman una señal transiente con un máximo de absorbancia que es proporcional a la concentración de ácido tánico.

Para cambiar de una disolución de diferente concentración de ácido tánico, teniendo la válvula de inyección en posición 1, se cambia la manguera de teflón a la disolución de ácido tánico con la concentración deseada permitiendo que el nuevo líquido pase a través del microchip durante al menos 5 minutos. Esto se hace para realizar un lavado y tratar de asegurar que la manguera que transporta a la muestra tenga sólo la nueva concentración de ácido tánico y así comenzar a introducir el volumen de 3.4 μL al microchip.

Desarrollo experimental



Fibras
ópticas

Paso óptico de
7 mm

Figura 18. Microchip para la determinación de polifenoles *in situ*. D: detector de luz. W: desechos. UV-Visible: Lámpara de halógeno.



Figura 19. Sistema montado para la determinación de polifenoles totales. a) Válvula de inyección (sistema de inyección), b) Detector de luz, c) Bomba peristáltica (sistema de propulsión), d) Lámpara, e) Microchip.

2.6 Validación del método.

Curva de calibración.

Se prepararon estándares de ácido tánico en el intervalo de concentraciones de 0.0059 hasta 0.237 mM. Cada estándar se inyectó mínimo 6 veces. Con los valores de absorbancia obtenidos se obtuvo la ecuación de la recta del intervalo lineal a través del método de mínimos cuadrados. Ver Anexo 1.

Precisión del valor de la pendiente y la ordenada al origen de la ecuación de la recta.

Con los datos obtenidos de la ecuación de la recta se realizó el cálculo de la desviación estándar residual (Se) y empleando la distribución T de student se obtuvieron los intervalos de confianza de la pendiente y la ordenada al origen. Ver Anexo 1.

Límite de detección.

El límite de detección de un analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la señal del blanco o ruido de fondo, de esta manera es la concentración de analito que proporciona una señal igual a la del blanco (Y_b) más tres veces la desviación estándar del blanco (S_b). (Miller et al., 2002). Para calcularlo se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Límite de detección (LOD)} = y_b + 3 s_b$$

donde: Y_B es la señal del blanco y S_B es la desviación estándar del blanco.

Límite de cuantificación.

El punto de cuantificación es considerado como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas, como opuesto a la detección cualitativa. Para calcularlo se emplea la siguiente ecuación:

$$\text{Límite de cuantificación (LOQ)} = y_b + 10 s_b$$

Cabe resaltar que el cálculo de límite de detección y el límite de cuantificación no se realizó directamente con una disolución blanco, ya que estos valores se determinaron con la ecuación de la recta obtenida.

Desarrollo experimental

Evaluación de la precisión del método.

Se evaluó la precisión del método como repetibilidad y reproducibilidad dentro del laboratorio. Para ello, a partir de la disolución madre de 0.29 mM, se prepararon dos estándares de ácido tánico de 0.13 mM que se midieron por triplicado utilizando el microchip. El procedimiento se repitió por 7 días. Al final de cada día se lavó el microchip haciéndole pasar agua destilada por al menos 10 minutos al caudal de trabajo. Para conocer el resultado de la precisión, se empleó un análisis de varianza (ANOVA).

Análisis de muestras.

Se analizó el contenido de polifenoles totales en 6 muestras de vino blanco las cuales fueron filtradas y sonicadas previamente a su introducción al microchip. Las muestras utilizadas fueron:

- Casa Madero/Chenin Blanc 2013 (M1).
- F. Chauvenet/Chenin/Sauvignon Blanc 2013 (M2).
- Márques de Dospalacios 2012/ Chardonnay 2013 (M3).
- Las Moras/Sauvignon Blanc 2012 (M4).
- Chardonnay 2011 (M5).
- California. Valle Redondo (M6).

Recobros.

Para evaluar la exactitud del método se hicieron estudios de recobros (evaluación de la cercanía de un resultado al valor considerado como verdadero) a un 1 nivel, es decir, sólo se añadió una concentración de ácido tánico a las muestras, siendo ésta de 0.029 mM (50 µg/mL) para tratar que la lectura de absorbancia obtenida estuviera alrededor de la mitad de la curva de calibración y así disminuir errores en la lectura de la señal analítica. Para realizar los recobros, se tomaron 2 mL del vino filtrado y 1 mL de la disolución madre de 0.29 mM de ácido tánico y se aforó a un volumen final de 10 mL. Para calcular el recobro obtenido se realizó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Recobro} = (\text{Concentración obtenida} / \text{Concentración teórica}) * 100$$

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Fabricación de los microchip.

El diseño final, mostrado en la Figura 20 presenta una zona donde se introducen los reactivos (NaOH, reactivo de Folin-Ciocalteu y polifenoles), los cuales se mezclan por difusión en el reactor de serpentín dando lugar al complejo color azul que es cuantificado, por espectroscopia visible, utilizando las fibras ópticas insertadas al microchip.

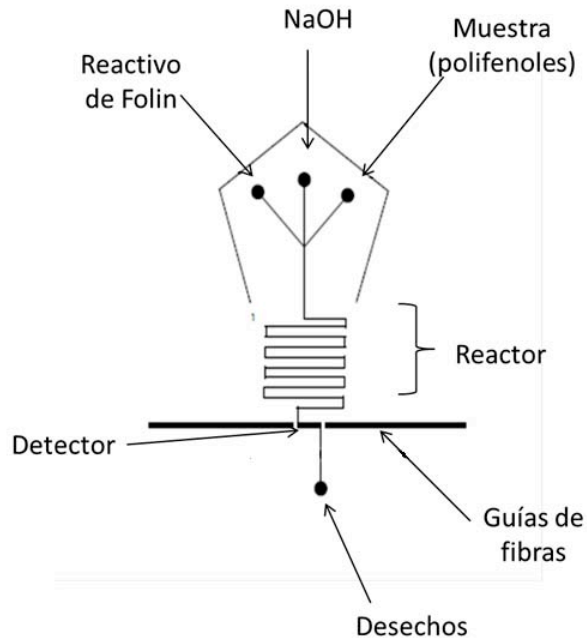


Figura 20. Diseño final de los microcanales de los microdispositivos fabricados.

Caracterización visual de los microchips.

Se examinaron los microcanales del microdispositivo fabricado con ayuda del microscopio Leica Microsystems CMS Gmb H para verificar que tuvieran la forma del diseño de la Figura 20. Se observa que los trazos de los microcanales impresos en negativo en el acetato presentan irregularidades como algunos orificios sobre y en los bordes (Fotos superiores de la Figura 21). Esto se debe a la impresión del acetato en negativo ya que el equipo con el que se realizó dicha impresión no tiene la suficiente resolución para trazos menores a 110 micras. Esas mismas irregularidades se transfirieron a los microcanales de los microchips fabricados (Fotos inferiores de la Figura 21), sin embargo, se pudo trabajar con ellos porque al introducir los reactivos no hubo

Resultados y discusión

fuga, o alguna obstrucción, además que se obtuvo el producto colorido de la reacción esperado.

Al presentar los microcanales estas imperfecciones no se puede controlar el flujo laminar provocando que se pierda en ocasiones pero que se recupera debido a la longitud y profundidad de los canales, esto puede ocasionar que no todas las moléculas sufran la misma dispersión y por lo tanto difieran un poco en el punto de medición.

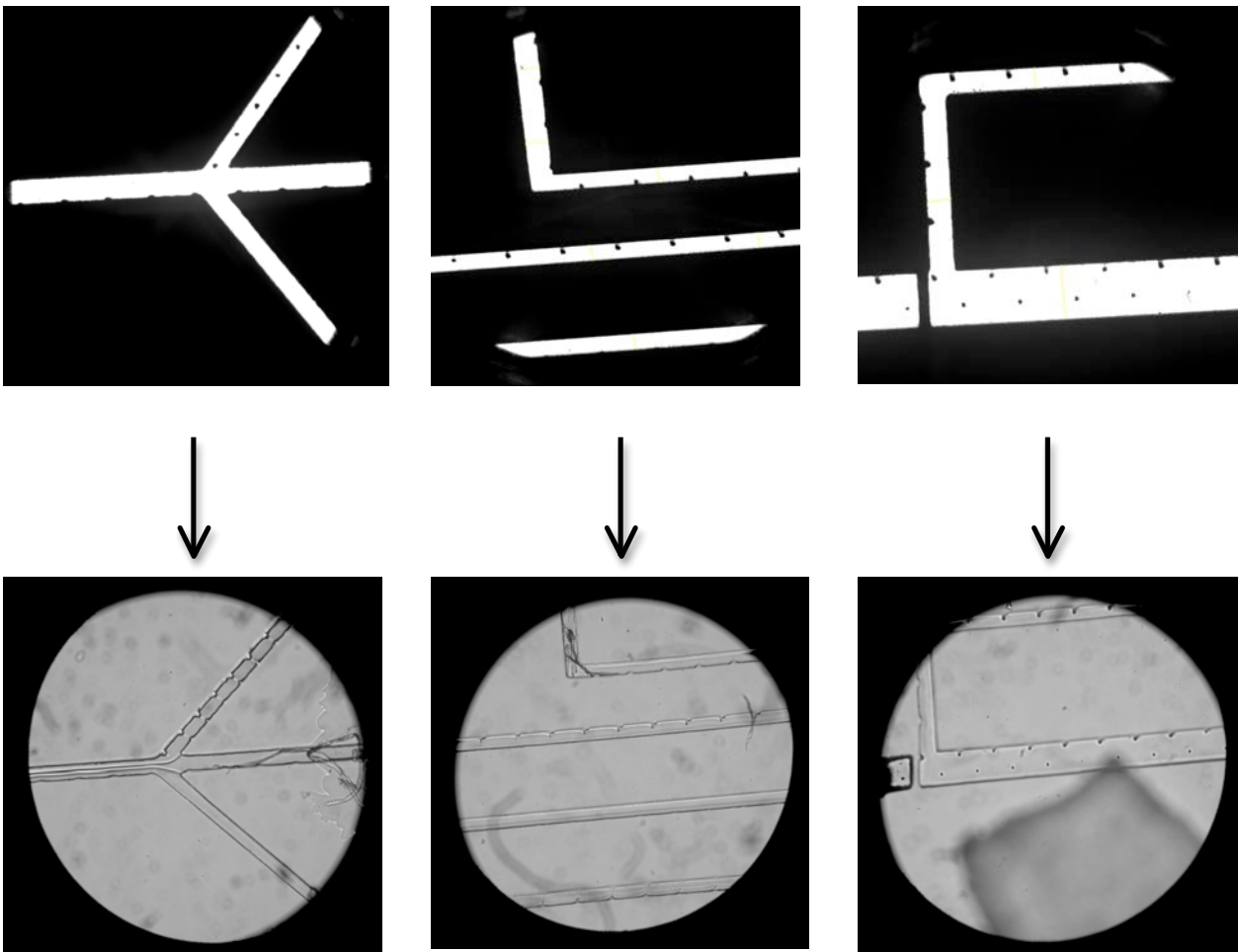


Figura 21. Transferencia del diseño de los microcanales del acetato en negativo a los microdispositivos fabricados. Fotos superiores. Microcanales impresos en el acetato en negativo. Fotos inferiores. Microcanales dentro del microchip.

Volumen y dimensiones del microchip.

Se realizó la medición de la altura y del ancho de los microcanales del dispositivo fabricado realizando un corte transversal a una capa de PDMS que presenta el relieve de los microcanales (capa sin ser sellada) (Figura 22). Las mediciones se realizaron con ayuda del Microscopio Leica Microsystems CMS Gmb H empleando el objetivo de 40x y con la cámara Phantom. La medición se realiza mediante la relación entre la foto de una retícula microscópica (S2 Stage Mic 5mm/ 0.05 mm div, Pyser-SGI LTD) y una imagen de los microcanales del microchip. Se realizaron varias medidas en diferentes puntos del recorrido formado por los microcanales. La altura promedio tuvo un valor de $62 \pm 4.77 \mu\text{m}$ y el ancho un valor de $108 \pm 5.6 \mu\text{m}$. También se midió el largo del recorrido total que forman los microcanales, de esa manera se calculó un volumen total aproximado de los microcanales, siendo de $\approx 0.45 \mu\text{L}$.

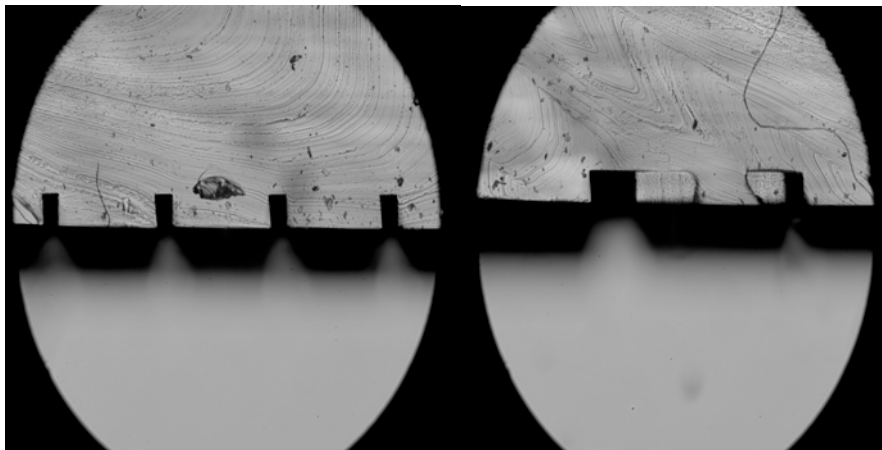


Figura 22. Corte transversal del microdispositivo fabricado para la conocer las dimensiones de alto y ancho de los microcanales fabricados.

3.2 Optimización analítica para la determinación de ácido tánico con detección fuera del microchip.

Evaluación de parámetros hidrodinámicos y fisicoquímicos para obtener la mayor sensibilidad en la determinación de ácido tánico.

Para evaluar el microchip como herramienta en la determinación de polifenoles totales se optimizaron parámetros hidrodinámicos y fisicoquímicos. La optimización de la concentración de los reactivos empleados en el ensayo de Folin-Ciocalteu se realizó a un caudal de $20 \mu\text{L}/\text{min}$ por ser el mínimo posible en las condiciones del sistema de propulsión y por ser con el que menor presión se ejercía en el microchip ya que no se tenía la certeza de si podía soportar presiones muy grandes. El microchip fue conectado a

Resultados y discusión

una celda de flujo con paso óptico de 1 cm, de esta manera el producto del ensayo de Folin-Ciocalteu se cuantificaba fuera del microdispositivo (Figura 23).



Figura 23. Acoplamiento del microchip (d) al sistema de propulsión (c), válvula de inyección (a) y a la celda de flujo (b) donde se realizó la detección.

Longitud de onda para la determinación del producto de reacción del ensayo de Folin-Ciocalteu.

Se trabajó a una longitud de onda de $\lambda = 730 \text{ nm}$ porque de acuerdo a las referencias consultadas (Chen et al., 2015) y a ensayos previos, el producto de la reacción de Folin-Ciocalteu presenta un máximo de absorción a ese valor de longitud de onda.

Optimización de la concentración de los reactivos con detección fuera del microchip.

Se realizó un diseño de experimentos para determinar la concentración óptima de los reactivos utilizados en la determinación de los polifenoles totales. Se realizó un diseño factorial 2^3 con expansión a central compuesto (3 puntos centrales). Las concentraciones empleadas se presentan en la Tabla 2.

En el diseño se consideró al ácido tánico como otro reactivo más para observar qué tan diferentes resultaban las señales de absorción producidas por cada una de ellas y de esta manera establecer los órdenes de magnitud que se pueden determinar de polifenoles totales empleando el microchip.

Resultados y discusión

Tabla 2. Condiciones del diseño de experimentos realizado.

	1.68	1	0	-1	-1.68
NaOH (M)	0.3	0.25	0.15	0.05	0.025
Reac. Folin-Ciocalteau (dilución)	1:16.6	1:20	1:30.3	1:100	1:200
Ácido tánico (mM)	0.088	0.0735	0.044	0.0147	0.00735

El diseño consistió en 17 experimentos en los que se midió la absorbancia de acuerdo a las condiciones presentadas en la Tabla 3.

Tabla 3. Corridas del diseño de experimentos.

Bloque	Ácido tánico	Folin	NaOH	Abs
1	-1.68179	0	0	0.0782
1	0	0	0	0.8614
1	1	-1	1	0.0908
1	1	1	1	1.7200
1	-1	1	1	0.5848
1	-1	-1	1	0.1802
1	0	0	-1.68179	-0.0570
1	0	0	1.68179	0.9082
1	0	0	0	1.103
1	1	-1	-1	0.3642
1	1	1	-1	0.1278
1	-1	-1	-1	0.2758
1	-1	1	-1	-0.0344
1	0	0	0	1.122
1	1.68179	0	0	1.2684
1	0	1.68179	0	1.7166
1	0	-1.68179	0	0.1430

Los diseños factoriales son los más eficientes para evaluar la respuesta de un experimento debida a los efectos de dos o más factores, ya que se investigan todas las combinaciones posibles de los factores en cuestión (concentración de los reactivos para este estudio). El efecto de un factor se define como el cambio en la respuesta producido por un cambio en el nivel del factor. En algunos experimentos puede encontrarse que la diferencia en la respuesta entre los niveles de un factor no es la misma para todos los

Resultados y discusión

niveles de los otros factores. Cuando esto ocurre, existe una interacción entre los factores (Montgomery, 2004).

A través del software Statgraphics centurión XVI se obtuvo el diagrama de Pareto estandarizado, el cual ayuda a determinar qué factores son estadísticamente significativos en la lectura de absorbancia y cuáles no. En el diagrama existe una barra por cada factor y por cada interacción posible entre ellos (Figura 24). El diagrama respresenta la relación del efecto de cada uno de los factores y de cada una de las interacciones sobre la absorbancia entre la desviación estándar asociada al error estadístico de todo el estudio. Los factores que no ejercen un cambio significativo en la absorbancia se encuentran por debajo de la línea perpendicular a la barras, mientras que, las barras por encima de la línea son factores significativos para la señal analítica. De esta manera, resultan significativos el NaOH y el reactivo de Folin-Ciocalteu. El valor crítico para determinar qué efecto es o no significativo resulta de la distribución T de student.

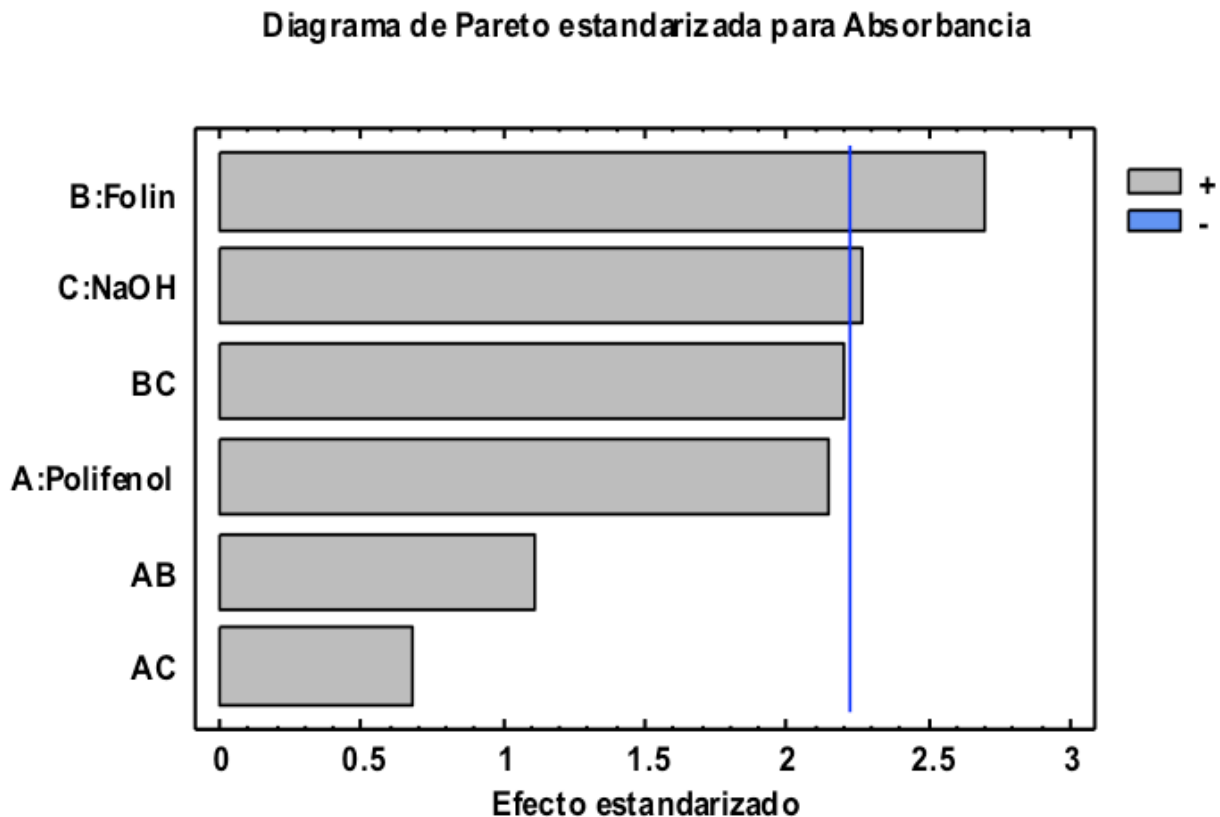


Figura 24. Diagrama de Pareto estandarizado para la señal de Absorbancia. Se observa que el NaOH y el reactivo de Folin-Ciocalteu ejercen un cambio significativo en la señal de absorbancia.

Resultados y discusión

Posteriormente, se realizó el gráfico de superficie de respuesta de la interacción de los factores que resultaron significativos (NaOH y el reactivo de Folin-Ciocalteu) para determinar bajo qué condiciones de los factores se obtenía la mayor sensibilidad posible (Figura 25). Se observa que se consigue un valor de absorbancia mayor cuando se emplean las disoluciones de los reactivos de mayor concentración.

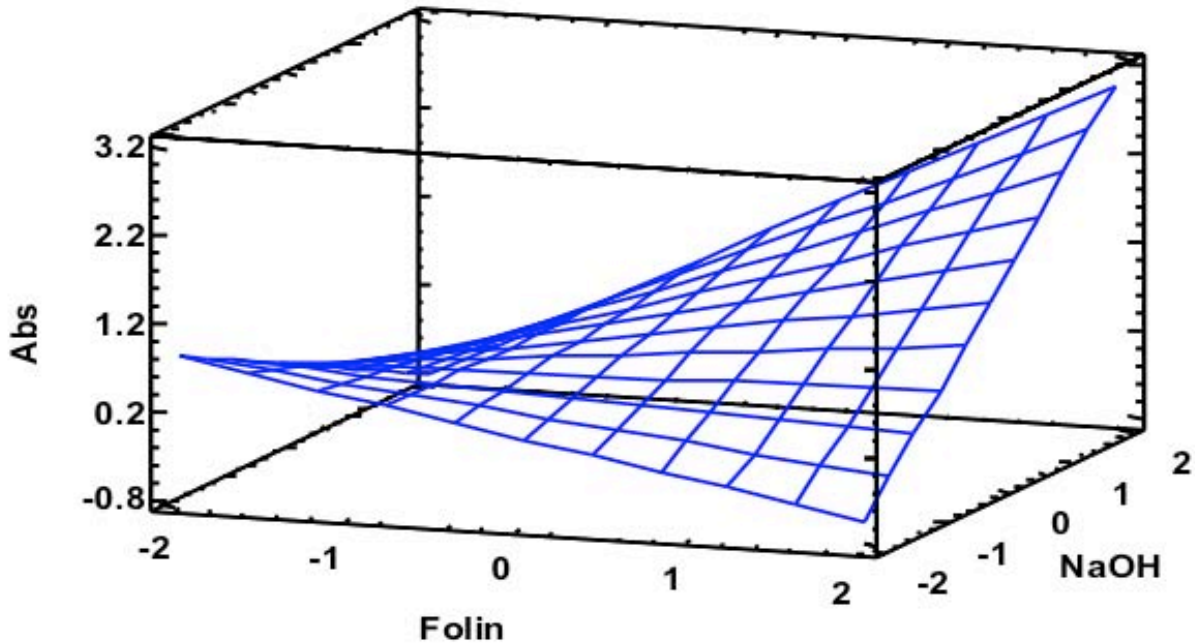


Figura 25. Superficie de respuesta de la variable Folin-NaOH manteniendo constante la concentración de ácido tánico.

Por lo tanto, para poder obtener la mayor sensibilidad se decidió trabajar con NaOH 0.3 M y con la disolución de Folin-Ciocalteu dilución 1:16.6, que son los reactivos de mayor concentración evaluados.

Evaluación del caudal de los reactivos y volumen de muestra.

Para optimizar el caudal y el volumen de muestra de ácido tánico, teniendo en cuenta las dimensiones del microchip, se midió la respuesta analítica que se obtenía cuando se variaban estos parámetros; teniendo presente que la relación que existe entre el caudal y la presión ejercida en el microchip es proporcional. Para realizar los estudios se empleó un estándar de ácido tánico de 0.044 mM. Los valores de caudal presentados se establecen directamente en la bomba peristáltica de 4 canales empleada en la

Resultados y discusión

investigación. Las pruebas realizadas se muestran en la Tabla 4 y Figura 26. Los espacios en blanco que aparecen en la Tabla 4 son evaluaciones no realizadas debido a que se determinó que se obtiene mayor valor de absorbancia cuando se trabaja con valores de caudal y volumen de ácido tánico más grandes.

Tabla 4. Volumen de muestra de ácido tánico (0.044 mM) introducido en el sistema para cada determinación.

Caudal\Tiempo (s)	50	40	30	20
20 $\mu\text{L}/\text{min}$	-	13.33 μL	10 μL	6.66 μL
30 $\mu\text{L}/\text{min}$	-	20 μL	15 μL	10 μL
34 $\mu\text{L}/\text{min}$	28.33 μL	22.66 μL	-	-
40 $\mu\text{L}/\text{min}$	-	26.66 μL	-	-

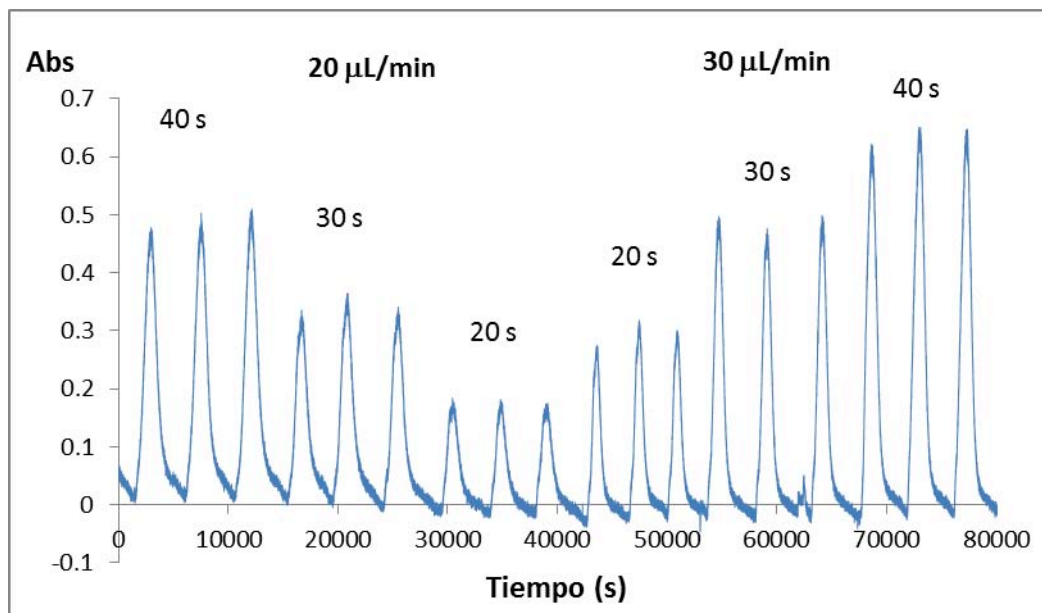


Figura 26. Señales obtenidas para los diferentes caudales evaluados.

Se puede observar que la lectura de absorbancia es mayor a caudales mayores, esto se atribuye a que el mezclado de los reactivos se favorece cuando los caudales son más grandes (Brivio et al., 2006; Lawati et al., 2011), sin embargo, entre 34 y 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ se observa que ya no existe una diferencia significativa (Figura 27), por ello se eligió 34 $\mu\text{L}/\text{min}$, ya que con este valor de caudal, la presión ejercida en el microchip es menor. Además que las altas tasas de caudal generalmente resultan en un consumo excesivo de reactivos y aumentan el costo del análisis (Lawati et al., 2011).

A 34 $\mu\text{L}/\text{min}$ se introdujeron dos volúmenes diferentes del estándar de ácido tánico, 22.66 y 28.33 μL . Se observa que la absorbancia es mucho mayor con el volumen más grande.

Resultados y discusión

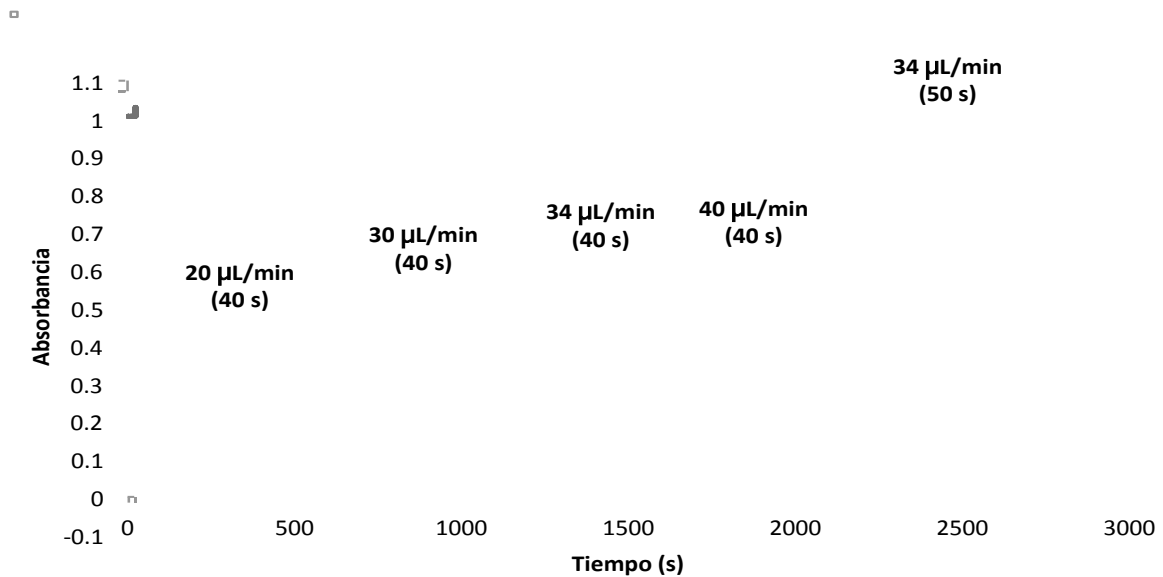


Figura 27. Señales obtenidas de diferentes volúmenes de estándar de ácido tánico a diferentes caudales.

Curva de calibración de ácido tánico con detección fuera del microchip (Ensayo A, Tabla 17).

Con las condiciones de longitud de onda, concentración de reactivos, caudal de la reacción de Folin-Ciocalteu y volumen de muestra de ácido tánico optimizados (Tabla 5), se construyó la curva de calibración. Los resultados se muestran en las Figuras 28 y 29. Se observa que existe una relación lineal entre la concentración de ácido tánico y la lectura de absorbancia que se obtiene. Se puede observar también que en estas condiciones se obtiene una muy buena sensibilidad ya que el valor que se obtiene de pendiente es muy similar a la que se obtuvo por el equipo de trabajo empleando la técnica de análisis por inyección en flujo que fue 22.616 mM^{-1} (Escutia, 2011). Se enfatiza en comparar el uso del microchip porque se trabajó con reactivos de menor concentración, se empleó un volumen 4 veces más pequeño y además se pudieron analizar disoluciones de ácido tánico de menor concentración. Lo anterior demuestra que el uso de microdispositivos aumenta la sensibilidad en la determinación de polifenoles totales.

Resultados y discusión

Tabla 5. Parámetros hidrodinámicos y fisicoquímicos optimizados para la determinación de ácido tánico con detección fuera del microchip.

Parámetro	Óptimo
Caudal	34 $\mu\text{L}/\text{min}$
Volumen de muestra de ácido tánico	28.33 μL
Reactivo de Folin-Ciocalteu (dilución)	1:16.6
NaOH (M)	0.3
Intervalo de concentración de ácido tánico	0.000588 a 0.0588 mM

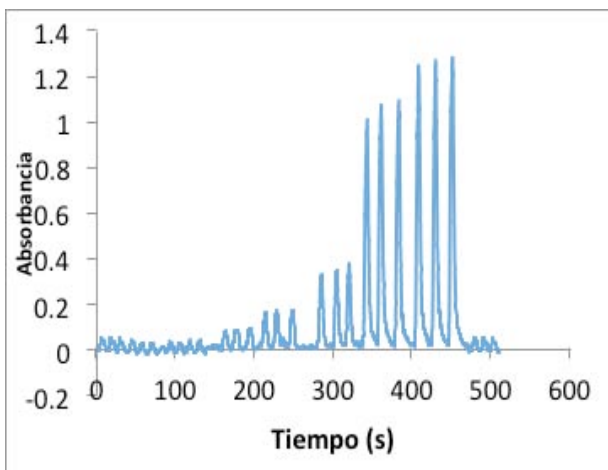


Figura 28. Señales obtenidas de diferentes concentraciones de ácido tánico.

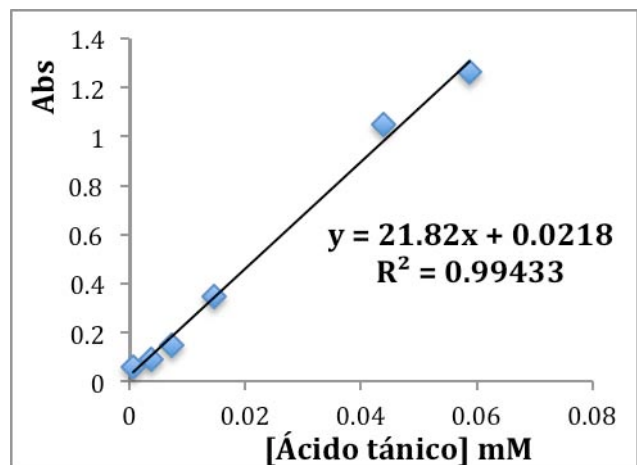


Figura 29. Curva de calibración $y = 21.82x + 0.0218$ (± 2.288) + 0.0218 (± 0.0704). Concentración de estándares: 0.000588 a 0.0588 mM.

Evaluación del ancho de los microcanales.

Se realizó una evaluación de la respuesta analítica en función del ancho de los microcanales de los dispositivos, para lo cual se fabricaron microchips con diferentes anchos. Se evaluaron 70, 77, 110 y 120 μm (Figura 30).



Figura 30. Microchips fabricados con diferentes dimensiones de ancho en microcanales.

Resultados y discusión

Para realizar la evaluación, con los parámetros optimizados de la Tabla 5, se construyó una curva de calibración, por duplicado (Ensayo B, Tabla 17), empleando estándares de ácido tánico en un intervalo de concentraciones de 0.00176 a 0.0588 mM (Figura 31).

Los resultados se muestran en la Tabla 6, en la que se observa que los valores del coeficiente de regresión son muy buenos y muy parecidos entre sí, esto nos habla que se obtiene una muy buena relación lineal del método sin importar el ancho de los microcanales. En cuanto al valor de la pendiente, se puede observar que no existe una diferencia muy notable entre los valores que se obtienen, sin embargo, con ayuda del software estadístico Statgraphics centurión XVI se realizó un análisis de varianza para conocer si existe diferencia significativa entre ellas, obteniendo una respuesta afirmativa a la existencia de diferencias significativas entre los valores obtenidos por los diferentes microchips (Ver Anexo 2). Por esta razón se decidió trabajar con el microchip 3 para realizar los estudios posteriores ya que cuando se empleó el microdispositivo con medidas de ancho de microcanales de 110 μm se obtuvo la mayor sensibilidad posible en las dos ocasiones que se realizó el estudio.

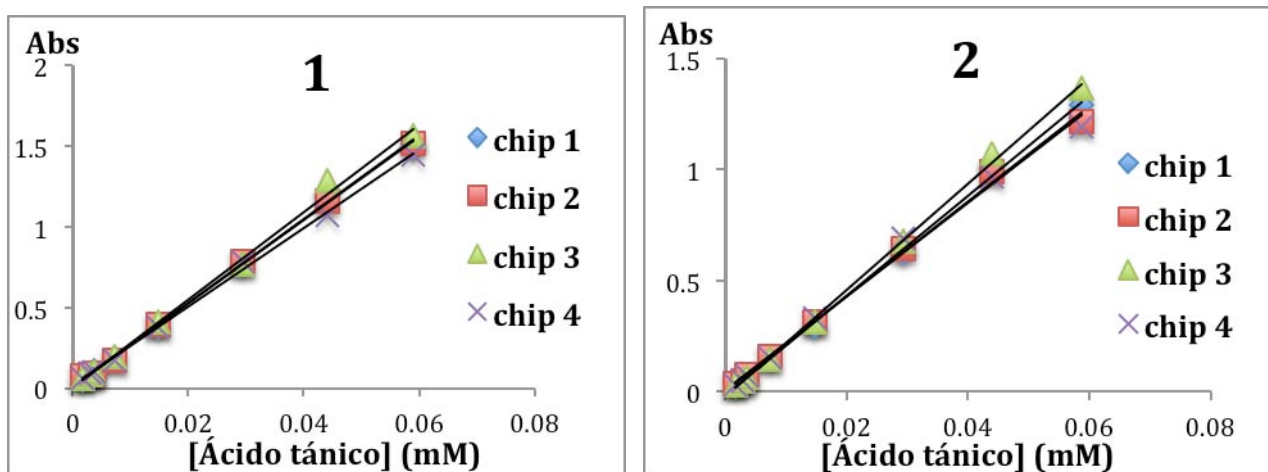


Figura 31. Intervalos lineales de la curva de calibración realizados en dos días diferentes.

Resultados y discusión

Tabla 6. Resumen de las rectas de calibración de los microdispositivos con diferentes longitudes de ancho.

Microchip	1		2		3		4	
Diámetro de canales ($\approx \mu\text{m}$)	70		77		110		120	
Estudio	1	2	1	2	1	2	1	2
Valor de Pendiente	25.986	22.569	25.835	21.38	27.172	23.938	24.325	21.11
Ordenada al origen	0.0081	-0.0237	0.0091	-0.0003	0.0067	-0.0214	0.018	0.0059
R^2	0.9981	0.9988	0.9992	0.9967	0.9961	0.9986	0.998	0.9939

Estudio del volumen de ácido tánico.

Uno de los objetivos de este trabajo es usar el menor volumen de analito posible (polifenoles) ya que es uno de los retos que afronta la química analítica actual, por esa razón se elaboró una curva de calibración donde se disminuyó el volumen de muestra introducido al microchip. Se probaron volúmenes de 14, 10, 2.83 y 1.7 μL con las condiciones de trabajo ya establecidas (Tabla 7).

Tabla 7. Condiciones óptimas para la determinación de ácido tánico con detección fuera del microchip.

Caudal	34 $\mu\text{L}/\text{min}$
Ancho de los microcanales	110 μm
NaOH (M)	0.3
Reactivo de Folin-Ciocalteu (dilución)	1:16.6
Tiempo aprox. de 1 análisis (min)	≈ 3

Con los volúmenes de 2.83 y 1.7 μL no fue posible observar señales en formas de picos definidos, esto se puede deber a la dispersión que presenta el producto de reacción formado sobretudo al salir del microchip por ser muy poca cantidad de volumen. A partir de 10 μL de volumen de muestra de ácido tánico se obtenían señales en forma de picos definidos y reproducibles. Por ello se eligió 10 μL como el menor volumen posible introducido bajo estas condiciones. Se construyó una curva de calibración empleando el nuevo volumen establecido.

La curva de calibración obtenida se muestra en la Figura 32 (Ensayo C, Tabla 17). Se observa que el valor del coeficiente de regresión sigue siendo aceptable y se sigue

Resultados y discusión

conservando la linealidad entre la concentración de ácido tánico y las lecturas de absorbancia, sin embargo como era de esperarse, la sensibilidad del método disminuye drásticamente (de 21.82 mM^{-1} a 13.554 mM^{-1}) en comparación cuando se empleó un volumen de $28.33 \mu\text{L}$ de ácido tánico. Además el tiempo que se lleva a cabo por un análisis no disminuye significativamente porque sigue siendo de aproximadamente 3 minutos.

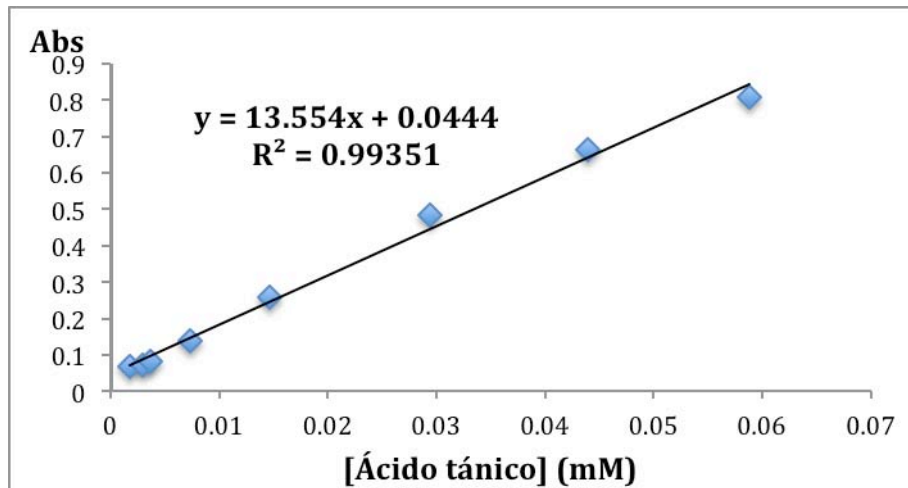


Figura 32. Intervalo lineal de la curva de calibración $y = 13.554x (\pm 1.095) + 0.0444 (\pm 0.03132)$ obtenida de estándares de ácido tánico (0.00176-0588 mM).

3.3 Optimización analítica para la determinación de ácido tánico con detección *in situ* (dentro del microchip).

La miniaturización está creciendo rápidamente con nuevas ideas en los últimos años. Al igual que en otros campos, los sistemas analíticos han sido afectados por esta tendencia. En concreto, la capacidad de llevar a cabo las operaciones de laboratorio a pequeña escala con el uso de dispositivos miniaturizados es muy atractiva. Por lo tanto, los sistemas μ TAS, también llamados LOC, han renovado el interés en las leyes de escalamiento desde hace 20-25 años. De esta manera, a pequeña escala se reduce el tiempo requerido para sintetizar y analizar un producto, así como se consigue un mayor control de las interacciones moleculares a nivel de microescala. Además, la cantidad de reactivos y la cantidad de residuos químicos se pueden reducir mucho. Ahora, a principios de este siglo, está claro que LOC están empezando a generar un nuevo enfoque para ser considerado como una herramienta analítica potencial en muchos campos de aplicación. (Ríos et al., 2015).

Evaluación de las fibras ópticas y de los parámetros hidrodinámicos y fisicoquímicos.

Con el objetivo de trabajar en las condiciones experimentales que permitan tener una mayor sensibilidad de la determinación de ácido tánico se procedió a evaluar las fibras ópticas y los diferentes parámetros hidrodinámicos y fisicoquímicos involucrados en la detección de ácido tánico *in situ*.

Evaluación de las fibras ópticas en el microchip.

Otro objetivo del presente trabajo es realizar la determinación de polifenoles totales *in situ*, es decir, dentro del microchip. Para ello, se insertaron dos fibras ópticas en el microchip (Figura 33) de tal manera que se tuviera una longitud de paso óptico de aproximadamente 0.110 mm.

Se contaba con fibras ópticas de diferentes diámetros externos (50, 100 y 200 μ m), las cuales fueron insertadas en las guías del microchip y se observó que no todas se ajustaban a los canales guías del microchip de 500 μ m de ancho; caso contrario en las guías de 250 μ m de ancho en que, la fibra de diámetro externo de 200 μ m quedó ajustada perfectamente. Esto a parte de ayudar a que la fibra se mantuviera en su lugar, aseguraba que ambas fibras ópticas insertadas estuvieran lo más alineadas posible asegurando la transmisión de luz proveniente de la lámpara de halógeno en el extremo de una de ellas.

Resultados y discusión

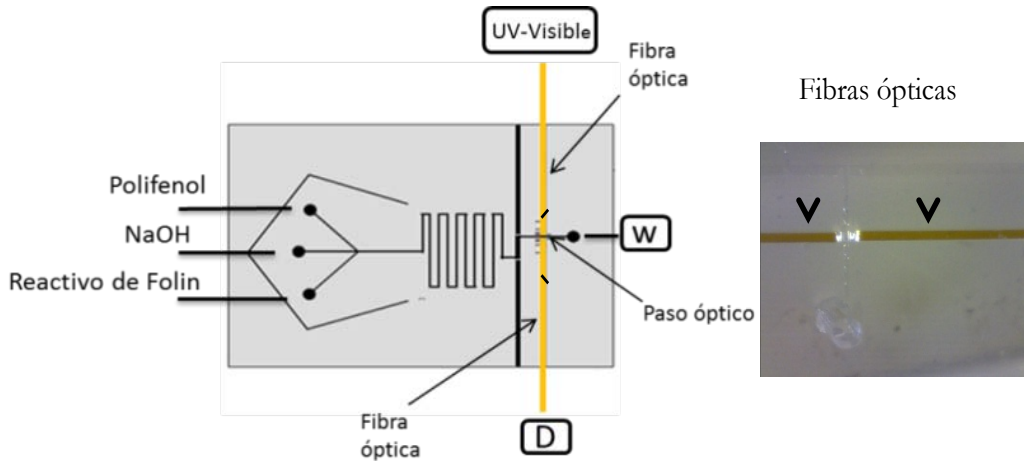


Figura 33. Microdispositivo para la detección de ácido tánico *in situ*. D: detector de luz. W: desechos. UV-Visible: Lámpara de halógeno.

En la Tabla 8 se muestran las condiciones del estudio realizado para evaluar la detección con las fibras ópticas. Se empleó un estándar de ácido tánico considerablemente concentrado por las dimensiones que presenta el paso óptico.

Tabla 8. Condiciones empleadas en la detección de ácido tánico *in situ*.

Caudal	34 $\mu\text{L}/\text{min}$
[Ácido tánico]	0.147 mM
Volumen de muestra de ácido tánico	$\approx 10 \mu\text{L}$
[NaOH]	0.3 M
[Reactivo de Folin-Ciocalteu]	Dilución 1:16.6
Tiempo aprox .de 1 análisis	20 s

El resultado de la evaluación de la determinación de ácido tánico dentro del microchip se muestra en la Figura 34. Se puede observar que sí es posible determinar ácido tánico *in situ* con fibra óptica, ya que se observó un aumento en la señal de absorbancia cada vez que se introducía un volumen determinado de muestra de ácido tánico, responsable del aumento en la lectura de la misma.

Resultados y discusión

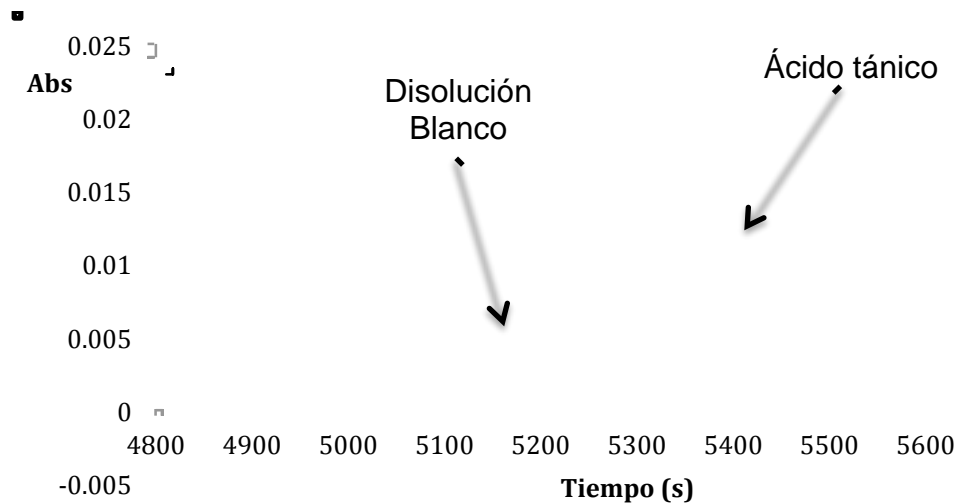


Figura 34. Señales obtenidas de la determinación de ácido tánico *in situ*.

Volumen de muestra de ácido tánico.

Se introdujo el volumen de 10 μL al microchip pero no se observaron picos porque la señal de absorbancia registrada se saturaba. Por ello, se decidió introducir volúmenes más pequeños. Se decidió introducir 3.4 μL de muestra de ácido tánico ya que este valor de volumen fue el máximo permisible para que no se saturara la señal de absorbancia; además permitía que las señales fueran reproducibles al introducir el ácido tánico al microchip.

Optimización de la concentración de los reactivos.

Con el fin de obtener la mayor sensibilidad posible en la determinación de ácido tánico con detección dentro del microchip, se volvieron a optimizar las concentraciones de los reactivos empleados en la reacción. De acuerdo a los resultados obtenidos con el diseño de experimentos utilizados para la optimización con detección fuera del microchip se observó que mientras más concentrados éstos la señal de absorbancia era mayor (Figura 25); por ese hecho, se decidió evaluar otra condición en la que se incrementó la concentración (Tabla 9) de los reactivos.

Resultados y discusión

Tabla 9. Condiciones para la optimización de los reactivos del ensayo de Folin-Ciocalteu para la determinación de ácido tánico *in situ*.

Ensayo	a	b
Caudal	34 $\mu\text{L}/\text{min}$	
Volumen de muestra	3.4 μL	
[Ácido tánico]	0.147 mM	
[NaOH]	0.5 M	0.3 M
[Reactivo de Folin-Ciocalteu]	Dilución 1:10	Dilución 1:16.6
Tiempo aprox .de 1 análisis	20 s	

Los resultados se muestran en la Figura 35. Las señales de absorbancia que se obtienen son más grandes cuando se trabaja con los reactivos más concentrados, correspondientes al ensayo **a**. Por ello, se decidió trabajar con esas nuevas concentraciones para realizar los estudios posteriores. Cabe mencionar que cada uno de los picos presentados en la Figura 35 corresponde a una inyección de ácido tánico al microchip.

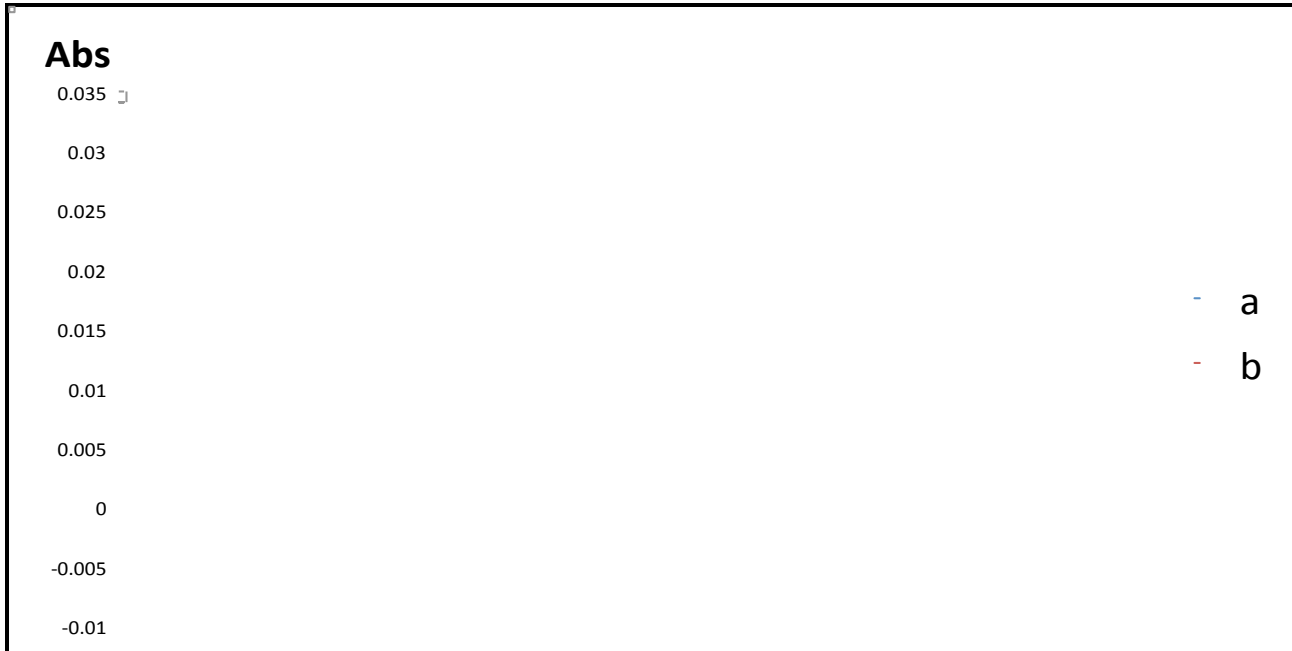


Figura 35. Señales obtenidas por las dos condiciones evaluadas para la determinación de polifenoles totales *in situ*. a) NaOH: 0.5 M y Reactivo de Folin-Ciocalteu Dilución 1:10; b) NaOH: 0.3 M y Reactivo de Folin-Ciocalteu Dilución 1:16.6.

Resultados y discusión

Evaluación de la longitud de paso óptico.

Se evaluó el efecto de la longitud del paso óptico sobre la sensibilidad de la determinación de ácido tánico con detección dentro del microchip a través de curvas de calibración. Se evaluaron 0.11, 1.5 y 7 mm como longitud de paso óptico. La detección *in situ* se realizó como se muestra en la Figura 33, empleando las condiciones del ensayo **a** de la Tabla 9, modificándose la parte del microcanal que forma el paso óptico a las dimensiones deseadas. Cada estándar se inyectó mínimo 6 veces. Los resultados se muestran en las Figuras 36 a 41. Cabe mencionar que en las Figuras 36, 38 y 40 cada pico representa una inyección de ácido tánico al microchip.

Detalles a destacar al realizar la detección *in situ*: 1) se reduce drásticamente el tiempo de análisis pasando de 3 minutos a sólo 20 segundos por determinación, lo que permite realizar 180 determinaciones/hora y 2) se reduce la cantidad de reactivos empleados y por ende de productos de desecho (menos de 15 mL por día de trabajo de 8 horas).

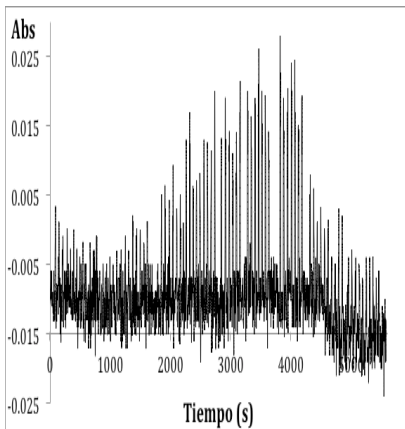


Figura 36. Señales obtenidas de la determinación de ácido tánico in situ con paso óptico de 0.11 mm.

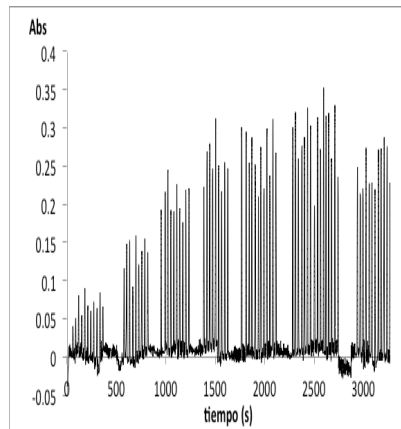


Figura 38. Señales obtenidas de la determinación de ácido tánico in situ con paso óptico de 1.5 mm.

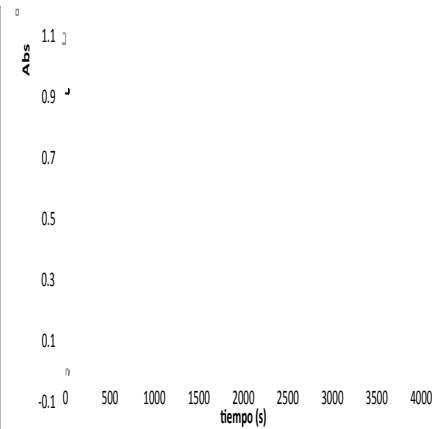


Figura 40. Señales obtenidas de la determinación de ácido tánico in situ con paso óptico de 7 mm.

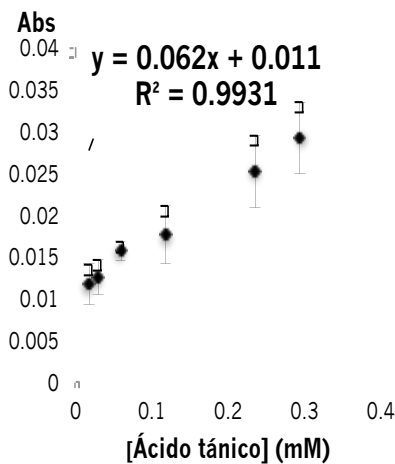


Figura 37. Curva de calibración de la determinación de ácido tánico in situ con paso óptico de 0.11 mm. Ensayo D, Tabla 17

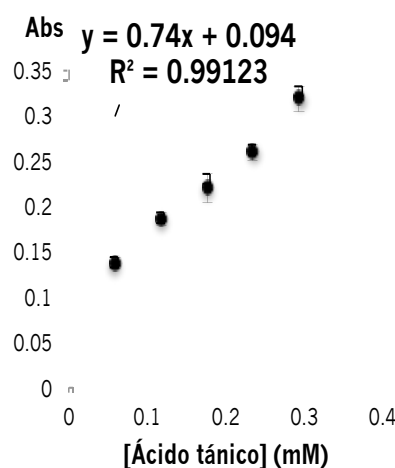


Figura 39. Curva de calibración de la determinación de ácido tánico in situ con paso óptico de 1.5 mm. Ensayo E, Tabla 17

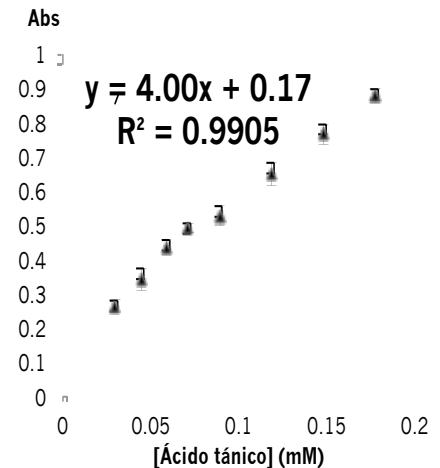


Figura 41. Curva de calibración de la determinación de ácido tánico in situ con paso óptico de 7 mm. Ensayo F, Tabla 17

Resultados y discusión

Se puede observar que a 0.11 mm sí se obtiene una relación lineal del método con un buen coeficiente de regresión lineal a pesar de la poca sensibilidad que se tiene con este paso óptico (Figuras 36 y 37, Ensayo D, Tabla 17).

La sensibilidad de la técnica está en función de la concentración del analito, del coeficiente de absortividad molar del compuesto en cuestión y de la longitud del paso óptico (Skoog, 2003). Por ello se decidió probar longitudes de paso óptico más largas. Se aumentó la longitud del paso óptico a 1.5 mm. Los resultados de las señales y las curvas de calibración se muestran en las Figuras 38 y 39 (Ensayo E, Tabla 17). Se observa que la sensibilidad del método es mayor, ya que los valores de absorbancia son mayores para las mismas concentraciones de ácido tánico que para el caso anterior (paso óptico de 0.110 mm). Sin embargo, se observa que no existe una diferencia significativa entre las señales de absorbancia entre un estándar y otro de ácido tánico que son parte de la curva de calibración, aunque el método sigue presentando un buen coeficiente de regresión lineal además de ser reproducible (Figura 39).

Por lo tanto se aumentó una vez más la longitud del paso óptico, siempre teniendo en cuenta que la transmisión de luz entre las fibras ópticas no se perdiera. Por ello, finalmente se decidió establecer un aumento a 7 mm (Figuras 40 y 41; Ensayo F, Tabla 17). Los resultados de muestran en la Tabla 10 y Figura 41. Se observa que la lectura de absorbancia es mayor conforme se introduce al microchip ácido tánico más concentrado. Sin embargo, a concentraciones mayores de 0.1778 mM las señales de absorbancia ya no presentan una relación proporcional a la concentración de ácido (Tabla 10).

Tabla 10. Relación de resultados de la curva de calibración.

Concentración Ácido tánico (mM)	Absorbancia (promedio)	Desviación estándar
0.0059	0.1199	0.04337
0.01778	0.01618	0.02326
0.02963	0.2624	0.01786
0.04444	0.3427	0.0317
0.05925	0.4368	0.02061
0.07110	0.4933	0.01344
0.08888	0.5284	0.02778
0.1185	0.6488	0.03387
0.1481	0.7651	0.03194
0.1778	0.8773	0.02016
0.237	0.8947	0.03624

Resultados y discusión

Características del método.

Curva de calibración.

Con los resultados obtenidos se decidió usar un paso óptico de 7 mm para establecer el intervalo lineal de ácido tánico de 0.03 a 0.18 mM (Figura 41).

A través del método de mínimos cuadrados se obtuvieron los coeficientes de la ordenada al origen y de la pendiente de la ecuación de la recta que describe el intervalo lineal determinado (Ver Anexo 1). Los coeficientes de la ecuación de la recta obtenidos se corroboraron a través de un análisis de regresión lineal (Tabla 11) y de un análisis de varianza (Tabla 12) realizados con el software estadístico Statgraphics centurión XVI; resultando en los mismos valores de coeficientes de la recta. Las Tablas 11 y 12 muestran un valor P y F de 0.0000, puesto que ese valor es menor de 0.05 existe una relación estadísticamente significativa entre las variables con un nivel de significancia de confianza del 95 %.

Tabla 11. Análisis de regresión lineal para los datos obtenidos.

Análisis de Regresión Lineal				
Variable dependiente: Abs				
Parámetro	Valor Estimado	Error estándar	Estadístico T	Valor P
Ordenada al origen	0.17	0.017	10.5033	0.0000
Pendiente	4.00	0.16	24.9588	0.0000

Tabla 12. Análisis de varianza para los datos obtenidos.

Análisis de varianza					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Ratio F	Valor F
Modelo	0.302122	1	0.302122	622.94	0.0000
Residual	0.00290995	6	0.000484992		
Total	0.305032	7			

En la Tabla 13 se muestran los resultados de los cálculos para determinar los intervalos de confianza al 95 % de los coeficientes de la ecuación de la recta que describe el intervalo lineal establecido (Ver Anexo 1). Los intervalos de confianza muestran con

Resultados y discusión

qué precisión pueden estimarse los coeficientes dados, la cantidad de datos disponibles y el nivel de ruido que está presente.

Tabla 13. Intervalos de confianza al 95 % para los valores de ordenada al origen y pendiente de la curva de calibración obtenida.

Intervalos de confianza al 95 % para los coeficientes estimados				
Parámetro	Valor Estimado	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
Ordenada al origen	0.17	0.017	0.13	0.211
Pendiente	4.00	0.16	3.61	4.39

Se observa que con el aumento del paso óptico a 7 mm, se incrementa la sensibilidad como se esperaba. El aumento en ésta es proporcional al aumento que se hizo del paso óptico, ya que la sensibilidad que se tiene en el caso anterior (paso óptico de 1.5 mm) es de 0.7391 y es 5.41 veces menor que la que se presenta con las condiciones finales y es una relación similar que la que se presenta en las longitudes de paso óptico (Tabla 14).

Tabla 14. Relación de proporción de sensibilidad y de longitud de paso óptico de 1.5 y 7 mm.

Relación de longitud de paso óptico	Relación sensibilidad
7mm/ 1.5 mm = 4.66	4.00/0.74 = 5.41

También se realizó la comparación de la sensibilidad que se presenta cuando el paso óptico es de 7 y 0.11 mm de longitud. Se observa que se obtiene un valor muy similar con la relación de las longitudes del paso óptico (Tabla 15).

Tabla 15. Relación de proporción de sensibilidad y de longitud de paso óptico de 0.11 y 7 mm.

Relación de longitud de paso óptico	Relación sensibilidad
7mm/ 0.11 mm = 63.63	4.00/0.062 = 64.52

De igual forma, se realizó la comparación de la sensibilidad con las longitudes de paso óptico más pequeñas evaluadas (Tabla 16).

Resultados y discusión

Tabla 16. Relación de proporción de sensibilidad y de longitud de paso óptico de 0.11 y 1.5 mm.

Relación de longitud de paso óptico	Relación sensibilidad
$1.5\text{mm}/0.11\text{ mm} = 13.63$	$0.74/0.062 = 11.94$

En la Tabla 17 se muestra un resumen de los diferentes ensayos llevados a cabo durante la evaluación de los microdispositivos para la determinación de polifenoles totales referidos como equivalentes de ácido tánico, tanto los que se realizaron con detección fuera y dentro del microchip, con el fin de compararlos entre sí y con un método realizado por el equipo de trabajo con la técnica FIA (Ensayo G (Escutia, 2011)). Se compararon parámetros que son relevantes al momento de elegir un método analítico como la sensibilidad, el volumen de muestra para llevar a cabo el análisis y el tiempo en que se lleva a cabo una determinación, entre otros. Cabe señalar que el intervalo lineal de cada ensayo fue determinado bajo el criterio de término de linealidad.

Se observa que la sensibilidad de las determinaciones es menor cuando se trabaja con pasos ópticos menores a 1 cm, sin embargo ya no existe una diferencia muy grande de sensibilidad entre los ensayos C y F ya que la del primero es tres veces mayor que la del segundo, teniendo en cuenta que el volumen de muestra introducido al microchip del segundo es aproximadamente tres veces menor que la del primero.

Un punto importante a destacar es que en los ensayos con detección dentro del microchip las determinaciones se realizan en un menor tiempo y empleando un menor volumen respecto a las determinaciones con detección fuera del microdispositivo.

Los resultados se compararon con un estudio previo, realizado por el equipo de trabajo en el que se empleó la técnica FIA (Ensayo G); a pesar que éste presenta una sensibilidad mucho mayor que la de los análisis dentro del microchip (ensayos D, E, F), la sensibilidad es similar con los ensayos A y B (detección fuera del microchip), recordando que en esos ensayos se emplearon concentraciones menores de los reactivos, menor volumen de reactivos y por consiguiente menor producción de desechos.

La elección por alguno de los ensayos dependerá del criterio y de las necesidades de cada analista.

Resultados y discusión

Tabla 17. Resumen de la comparación de los ensayos realizados para la evaluación de los microdispositivos para la determinación de polifenoles totales como equivalentes de ácido tánico. G* = Condiciones del trabajo previo de análisis de polifenoles por la técnica FIA realizado por el equipo de trabajo (Escutia, 2011)

Resumen	A	B	C	D	E	F	G*
	Ensayos con detección fuera del microchip			Ensayos con detección dentro del microchip			Ensayo con análisis FIA
Caudal	Todos los reactivos: 34 μ L/min						Portador (Agua Destilada) 0.7 mL/min Demás reactivos: 1 mL/min
NaOH (M)	0.3			0.5			
R. Folin-Ciocalteu (dilución)	1:16.6			1:10			
Volumen de muestra (μ L)	28.33	28.33	10	3.4	3.4	3.4	100
Tiempo aprox de 1 análisis	\approx 3 min	\approx 3 min	\approx 3 min	20 s	20 s	20 s	\approx 2-3 min
Sensibilidad (mM^{-1})	21.82	23.934	13.554	0.062	0.74	4.00	22.616
Intervalo lineal (mM)	0.000588-0.0588	0.00176-0.0588	0.00176-0.0588	0.0176-0.294	0.0588-0.294	0.03-0.18	0.00735-0.088
Longitud de paso óptico	1 cm	1 cm	1 cm	0.011 cm	0.15 cm	0.7 cm	1 cm

Aunque en los ensayos con determinación dentro del microchip presentan menor sensibilidad se pueden mejorar para conseguir sensibilidades mayores; lo que se discute más adelante.

Resultados y discusión

Límite de detección.

Con los datos obtenidos de la ecuación de la recta de la curva de calibración se procedió a realizar el cálculo para establecer el límite de detección que se muestra a continuación:

$$\begin{aligned} \text{Límite de detección (LOD)} &= y_b + 3 s_b \\ \text{LOD} &= 0.17 + (3)(0.022) = 0.236 \\ \text{LOD} &= (0.236 - 0.17) / (4.00) = 0.0165 \text{ mM} \end{aligned}$$

Límite de cuantificación.

De igual forma, con los datos obtenidos de la ecuación de la recta, se hizo el cálculo para determinar el límite de cuantificación.

$$\begin{aligned} \text{Límite de cuantificación (LOQ)} &= y_b + 10 s_b \\ \text{LOQ} &= 0.17 + (10)(0.022) = 0.39 \\ \text{LOQ} &= (0.39 - 0.17) / (4.00) = 0.055 \text{ mM} \end{aligned}$$

Repetibilidad y Reproducibilidad.

Para conocer la precisión del método se evaluó su repetibilidad y reproducibilidad dentro del laboratorio. En esta evaluación se realiza el análisis repetido de una muestra, por el mismo analista con el mismo instrumento en un lapso corto de tiempo. En este caso se hizo el análisis por 7 días consecutivos de un estándar de ácido tánico (por duplicado) que no sea punto de la curva de calibración. Los resultados se muestran en la Tabla 18.

Estándar de 0.13 mM

Tabla 18. Resultados para la prueba de repetibilidad y reproducibilidad del estándar de ácido tánico 0.13 mM.

Día	Réplica 1 (Absorbancia)	Réplica 2 (Absorbancia)
1	0.131	0.134
2	0.125	0.13
3	0.113	0.111
4	0.129	0.13
5	0.116	0.11
6	0.128	0.125
7	0.128	0.118

Resultados y discusión

Se realizó el análisis de varianza. En la Tabla 19 se indican la suma de cuadrados (SC), los grados de libertad (GL) y los cuadrados medios (CM) de entre días como dentro de los días que serán de utilidad para el cálculo de repetibilidad y reproducibilidad.

Tabla 19. Análisis de varianza del estándar de ácido tánico 0.13 mM.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>
Entre grupos	0.00076943	6	0.00012824
Dentro de los grupos	9.2 E-5	7	1.3143 E-5
Total	0.00086143	13	

La variación entre días (repetibilidad, S_R^2) se determinó tomando en cuenta que S^2 es igual a la media de cuadrados dentro de días (Miller et al., 2002), ya que:

$$S_R = \sqrt{CM_{\text{dentro de días}}}$$

Por lo tanto:

$$S_R^2 = 1.3143 \text{ E-}5$$

Para calcular la reproducibilidad dentro del laboratorio (S_{WR}^2), se determinó de acuerdo a las siguientes ecuaciones, donde n_j es el número de réplicas por día.

$$S^2 = (CM_{\text{entre días}} - CM_{\text{dentro de días}} / n_j)$$

$$S_{WR}^2 = S_R^2 + S_{\text{entre días}}^2$$

$$S^2 = (0.00012824 - 1.3143 \text{ E} - 5) / 2 = 5.7549 \text{ E} - 5$$

$$S_{WR}^2 = 5.7549 \text{ E} - 5 + 1.3143 \text{ E-}5 = 7.0692 \text{ E} - 5$$

$$\text{Repetibilidad} = [(\sqrt{1.3143 \text{ E} - 5}) / 0.123] * 100 = 2.95 \%$$

$$\text{Reproducibilidad} = [(\sqrt{7.0692 \text{ E} - 5}) / 0.123] * 100 = 6.84 \%$$

Los valores de repetibilidad y reproducibilidad son menores al 7%. Estos valores se consideran adecuados para el orden de magnitud del volumen empleado en las determinaciones de polifenoles totales y de la forma en que es introducida la muestra al microchip (manualmente a través de la válvula de inyección).

Resultados y discusión

En la Tabla 20 se resumen los datos obtenidos de la caracterización de la determinación de ácido tánico *in situ*.

Tabla 20. Características de la determinación de ácido tánico *in situ*.

Características de la determinación de ácido tánico <i>in situ</i>	
Ecuación de la recta	$y = 4.00x (\pm 0.39) + 0.17 (\pm 0.041)$ $R^2 = 0.9905$
Intervalo lineal	0.03 – 0.18 mM
LOD	0.0165 mM
LOQ	0.055 mM
Repetibilidad	2.95 %
Reproducibilidad	6.84 %

Análisis de muestras.

Se determinó la concentración de polifenoles totales referidos como equivalentes de ácido tánico ($\mu\text{g/mL}$) presentes en 6 vinos blancos. Los resultados se muestran en la Figura 42 y Tabla 21.

Recobros.

Para evaluar la exactitud del microchip como herramienta de análisis en la determinación de polifenoles totales, se realizaron recobros (evaluación de la cercanía de un resultado al valor considerado como verdadero) de los vinos analizados. La Figura 42 y Tabla 21 muestran los resultados de la concentración de polifenoles en diferentes vinos así como el recobro obtenido. También se realizó el cálculo de la incertidumbre asociada a cada valor reportado. Ver Anexo 3.

Resultados y discusión

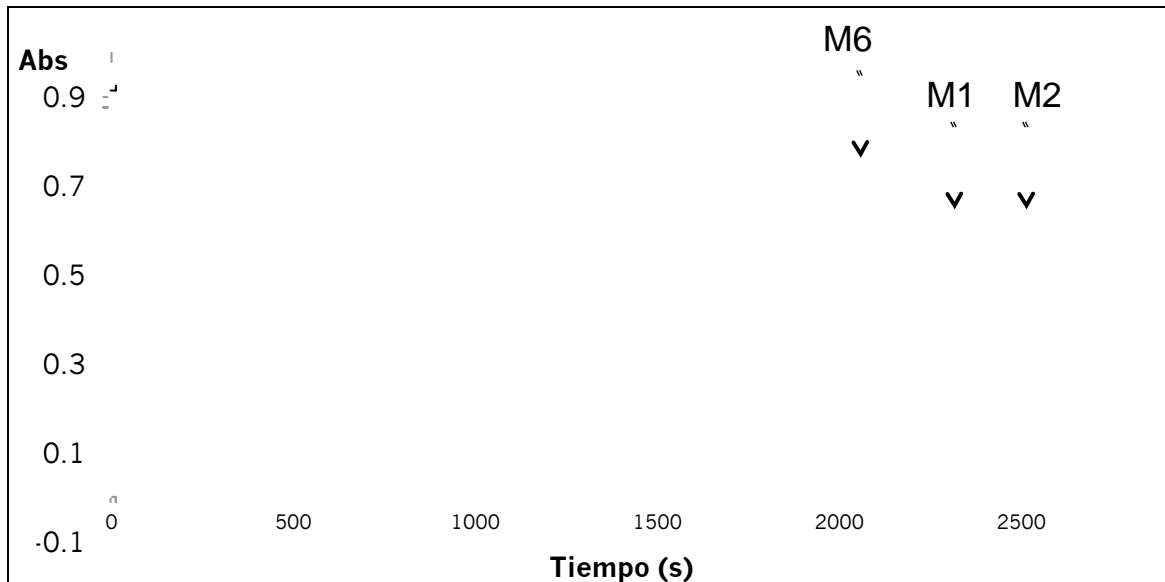


Figura 42. Señales obtenidas de algunos vinos analizados.

Tabla 21. Resultados obtenidos en el análisis de vinos con el microchip.

Vino Blanco	[Polifenoles] obtenida ($\mu\text{g/mL}$)	Cantidad adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	% Recuperación
M1	214.05 ± 3.25	50	106.57 ± 3.14
M2	174.57 ± 3.01	50	98.94 ± 3.56
M3	188.98 ± 3.1	50	120.43 ± 3.04
M4	225.56 ± 3.52	50	104.46 ± 3.16
M5	336.283 ± 5.71	50	112.71 ± 3.04
M6	247.33 ± 3.87	50	87.6 ± 3.52

Los factores que determinan la cantidad de polifenoles totales presentes en los vinos son la uva y las prácticas enológicas (Jiménez, 2015). De acuerdo a Tagliazucchi et al., 2005, la concentración de fenoles totales oscila desde 800 hasta 4000 mg/L para los vinos tintos y entre 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ para los vinos blancos. Los resultados de la cantidad de polifenoles totales determinados en los vinos blancos analizados afirman lo escrito por Tagliazucchi et al., 2005 porque las concentraciones obtenidas van desde 174.57 a 336.283 $\mu\text{g/mL}$; estos resultados son semejantes con los obtenidos por el equipo de trabajo anteriormente ya que los resultados van desde 201.87 a 303.051 $\mu\text{g/mL}$ de polifenoles totales para las mismas muestras de vinos blancos (Jiménez, 2015).

Los porcentajes de recobro obtenidos confirman la exactitud del microchip como herramienta en la cuantificación de polifenoles totales en vinos blancos. Los porcentajes de recobro van desde 87.6 % a 120.43 %. Estos valores se consideran adecuados

Resultados y discusión

principalmente por motivos como: volumen empleado para realizar las determinaciones (3.4 μL) y el orden de magnitud determinado ($\mu\text{g/mL}$) (AOAC Peer Verified Methods Program).

3.4 Análisis del mezclado de los reactivos dentro del microchip.

En la Figura 43 se observa que al introducir los reactivos se forman 3 fases que poco a poco, a lo largo del recorrido, desaparecen por la mezcla de los reactivos por difusión y por las irregularidades que presentan los microcanales ya que se aprecia un aumento en la formación del complejo color azul producto de la reacción.

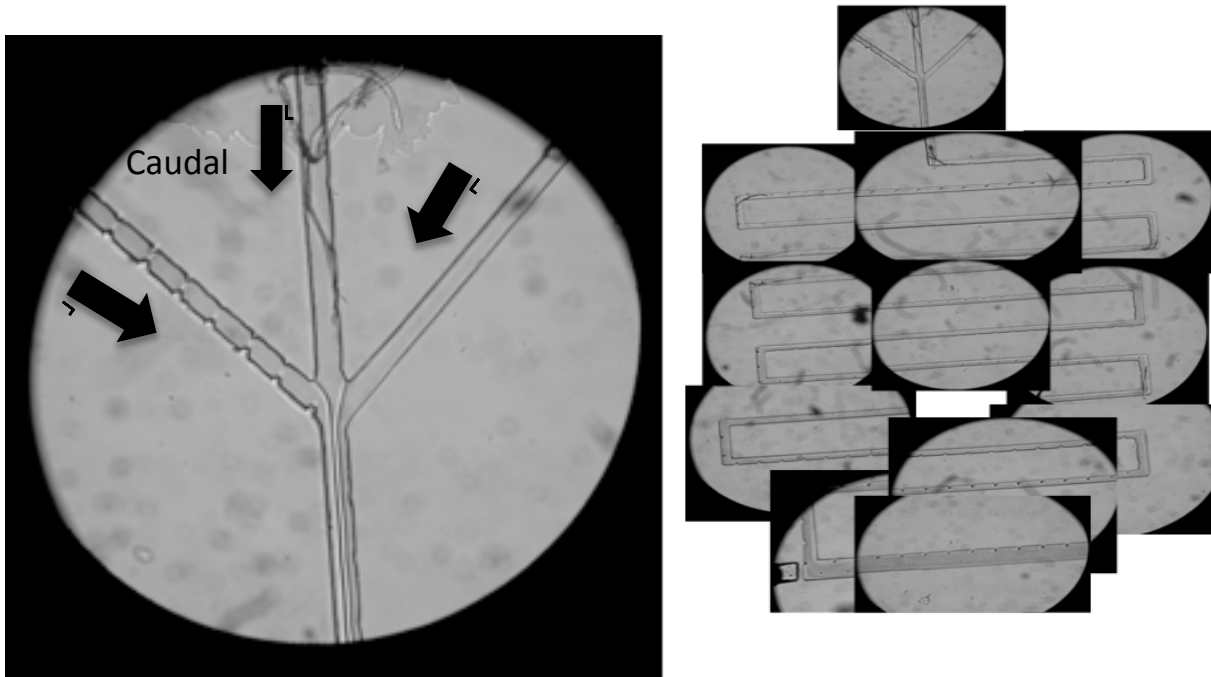


Figura 43. Mezcla de los reactivos en los dispositivos de microfluídica.

Se realizó el cálculo de la distancia necesaria para que el volumen de ácido tánico que se introduce al microchip se difunda totalmente en las condiciones empleadas. El valor obtenido es muy grande comparado con las dimensiones del microdispositivo ya que resultó ser del orden de magnitud de metros (Ver Anexo 4). Se calculó la distancia que existe desde donde la muestra es introducida hasta el detector formado por las fibras ópticas, siendo ésta de 4.61 cm. Con este valor se calculó el porcentaje del volumen que se ha difundido en esa distancia que es de 0.21 %. A pesar que el porcentaje teórico de muestra que se logra difundir es muy bajo es suficiente para que los reactivos reaccionen

Resultados y discusión

y formen el producto colorido que se determinó y cuantificó en los experimentos realizados.

Los resultados sugieren que existe una mejor mezcla que se puede deber a estrategias reportadas por otros autores tales como: inyección de un volumen fijo de muestra (Lawati et al., 2011), uso de altas velocidades de flujo ya que aumenta el número de Reynolds y por lo tanto mejora la mezcla (Lawati et al., 2011) y al empleo de reactores con geometrías de serpentín porque la geometría del chip juega un papel crucial en la mejora de la sensibilidad de los sistemas LOC (Lawati et al., 2010). La lectura de absorbancia es el resultado de la mezcla del reactivo y la velocidad de reacción. Si el proceso de mezclado es lento con relación a la velocidad de reacción, la mayoría de los reactivos reaccionarán durante el proceso de mezcla (Lawati et al., 2010). Otro factor que ayudó a la mezcla de los reactivos fue las irregularidades sobre y en los bordes de los microcanales ya que impiden que los líquidos fluyan de manera ordenada, esto perjudica al flujo laminar controlado provocando turbulencias que impiden volver al flujo laminar con rapidez ocasionando que las mediciones sean menos reproducibles. En la Figura 44 se presenta el canal que forma el paso óptico del microchip. De lado izquierdo se observa que no existe coloración al no estar presente el ácido tánico, sin embargo cuando éste entra en contacto con el NaOH y el reactivo de Folin-Ciocalteu, se mezcla y reacciona para formar el complejo colorido que es detectado por las fibras ópticas (lado derecho de la Figura 44). La hidrofobicidad que presenta el PDMS (Bodas et al., 2006; Fujii, 2002), que es el material del que está hecho el microdispositivo, puede también ayudar al proceso de mezclado ya que al estar todos los reactivos en fase acuosa existe una repulsión de éstos hacia las paredes de los microcanales.

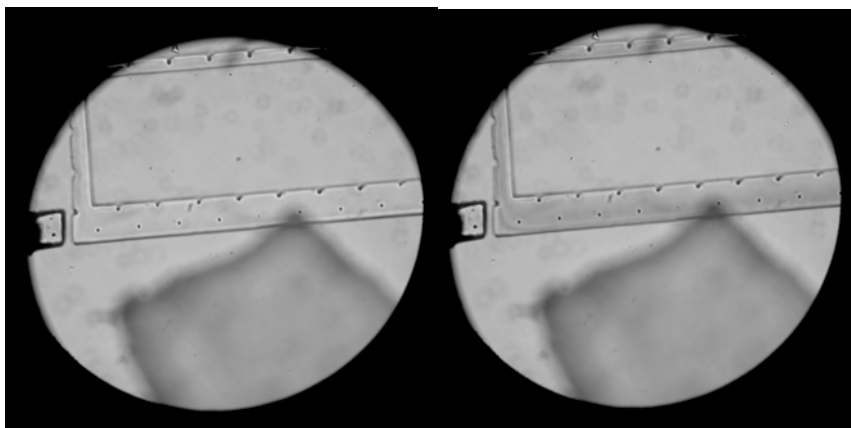


Figura 44. Acercamiento del paso óptico. Fotografía izquierda. Disolución blanco. Fotografía derecha. Formación del producto colorido por la introducción de ácido tánico.

Resultados y discusión

El primer paso de cada reacción química es el transporte de reactivos por difusión y convección a través del volumen de reacción. Para recopilar información significativa sobre las reacciones químicas, el transporte de masa debe ser más rápido que la cinética de reacción. Mientras que la cinética de reacción no se ve afectada por la reducción de escala, los coeficientes de transferencia de masa se incrementan sustancialmente como consecuencia de la disminución de la dimensión lineal. Debido a las longitudes de difusión más cortas, el mezclado en microrreactores es mucho más rápido y por lo tanto la influencia del transporte de masa en la velocidad de reacción se reduce considerablemente (Brivio et al., 2006).

3.5 CONCLUSIONES

- 1.- A través de las técnicas de fotolitografía y litografía suave se fabricaron dispositivos de microfluídica.
- 2.- Se comprobó que el elástomero de PDMS es buen material en la fabricación de dispositivos de microfluídica por sus características como: inerte, maleabilidad y por ser transparente en la región del visible.
- 3.- Se logró insertar con éxito fibra óptica en el microdispositivo para realizar la detección de polifenoles *in situ*.
- 4.- Se optimizó la determinación de polifenoles totales referidos como equivalentes de ácido tánico con detección dentro y fuera del microchip.
- 5.- Se compararon las determinaciones de polifenoles totales realizadas con detección dentro y fuera del microchip entre sí, resultando que las primeras se realizan en menor tiempo y con un menor volumen que las segundas.
- 6.- Se comparó la sensibilidad que se presenta en la detección fuera del microchip con la sensibilidad de un estudio FIA previo realizado por el equipo de trabajo, resultando muy similares. La comparación demuestra que la determinación de polifenoles al emplear el microdispositivo tiene más ventajas ya que se emplea una concentración menor de reactivos, menor volumen de los mismos y por consiguiente menor producción de desechos.
- 7.- Los valores obtenidos de precisión se consideran adecuados para el volumen tan pequeño (3.4 μL) que se emplea en la detección dentro del microchip.
- 8.- Se comprobó que el método propuesto utilizando microchips con detección espectrofotométrica *in situ* puede ser utilizado para determinar polifenoles totales en muestras de vino blanco.
- 9.- Los valores de porcentaje de recuperación demuestran que la exactitud de la determinación de polifenoles totales referidos como equivalentes de ácido tánico con detección dentro del microchip es buena.
- 10.- Los sistemas LOC demostraron ser poderosas herramientas para las diferentes áreas de la química, en este caso para la Química Analítica por presentar buena precisión y exactitud en las determinaciones. Además de las ventajas inherentes de su uso frente a otras técnicas de análisis ya establecidas (cromatografía de gases, cromatografía de líquidos, electroforesis, FIA, etc.) como bajo consumo de reactivos y por ende, de desechos; análisis rápidos (20 s por determinación), por lo tanto mayor número de inyecciones por hora.

Conclusiones

11.- El desarrollo de métodos para cuantificar polifenoles, además de proporcionar información sobre la capacidad antioxidante de la muestra, es importante para los consumidores y las industrias alimentarias ya que es algo atractivo que pueden resaltar en las etiquetas de los productos manufacturados.

3.6 BIBLIOGRAFÍA

AOAC Peer Verified Methods Program. www.aoac.org

Becker, H., y Locascio, L. E. (2002). *Polymer microfluidic devices. Review.* Talanta. 56, 267-287.

Bodas, D., y Khan-Malek, C. (2006). *Formation of more stable hydrophilic surfaces of PDMS by plasma and chemical treatments.* Microelectronic Engineering. 83, 1277-1279.

Brivio, M., Verboom, W., y Reinhoudt, D. N. (2006). *Miniaturized continuous flow reaction vessels: influence on chemical reactions.* The Royal Society of Chemistry. 329-344.

Castillero-Sánchez, E. *Acoplamiento de un instrumento HPLC a un microchip de microfluídica para ensayos de inhibición enzimática.* Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, 2015.

Chen, L., Cheng, C., y Liang, J. (2015). *Effect of esterification condensation on the Folin-Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols.* Food Chemistry. 170, 10-15.

Delamarche, E., Bernard, A., Schmid, H., Bietsch, A., Michel, B., y Biebuyck, H. (1998). *Microfluidic networks for chemical patterning of substrates: design and application to bioassays.* Journal of the American Chemical Society. 120, 500-508.

Dongre, C., Dekker, R., Hoekstra, H. J. W. M., Pollnau, M., Martinez-Vazquez, R., Osellame, R., Cerullo, G., Ramponi, R., Weeghel, R., Besselink, G. A. J., y Vlekert, H. H. (2008). *Fluorescence monitoring of microchip capillary electrophoresis separation with monolithically integrated waveguides.* Optics Letters. 33, 2503-2505.

Effenhauser, C. S., Bruin, G. J. M., Paulus, A., y Ehrat, M. (1997). *Integrated capillary electrophoresis on flexible silicone microdevices: analysis of DNA restriction fragments and detection of single DNA molecules on microchips.* Analytical Chemistry. 69, 3451-3457.

Escarpa, A., González, M. C., González-Crevillén, A., y Blasco, A. J. (2007). *Review. CE microchips: An opened gate to food analysis.* Electrophoresis. 28, 1002–1011.

Escutia-Guadarrama, L. *Extracción asistida por ultrasonido de polifenoles en uva.* Tesis de licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México, 2011.

Fernández-la-Villa, A., Sánchez-Barragán, D., Pozo-Ayuso, D. F., y Castaño-Álvarez, M. (2012). *Research article. Smart portable electrophoresis instrument based on multipurpose microfluidic chips with electrochemical detection.* Electrophoresis. 33, 2733-2742.

Ferreira, L. M., Costa, E. T., Lago, C. L., y Angnes, L. (2013). *Miniaturized flow system based on enzyme modified PMMA microreactor for amperometric determination of glucose.* Biosensors and Bioelectronics. 47, 539-544.

Bibliografía

- Fiorini, G., y Chui, D. (2005). *Disposable microfluidic devices: fabrication, function and application*. *BioTechniques*. 38, 429-446.
- Franquet-Griell, H., Checa, A., Núñez, O., Saurina, J., Hernández-Cassou, S., y Puignou, L. (2012). *Determination of Polyphenols in Spanish Wines by Capillary Zone Electrophoresis. Application to Wine Characterization by Using Chemometrics*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60, 8340-8349.
- Fister, III, J. C., Jacobson, S. C., Davis, L. M., y Ramsey, J. M. (1998). *Counting single chromophore molecules for ultrasensitive analysis and separations on microchip devices*. *Analytical Chemistry*. 70, 431-437.
- Fresco, P., Borges, F., Marques, M. P. M., y Diniz, C., (2010). *The Anticancer Properties of Dietary Polyphenols and its Relation with Apoptosis*. *Current Pharmaceutical Design*. 16, 114-134.
- Friedman, M., y Jurgens, H. S. (2000). *Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 2101-2110.
- Fu, L. M., Wang, Y. N., y Liu, C. C. (2014). *An integrated microfluidic chip for formaldehyde analysis in chinese herbs*. *Chemical Engineering Journal*. 244, 422-428.
- Fujii, T. (2002). *PDMS-based microfluidic devices for biomedical applications*. *Microelectronic Engineering*. 61-62, 907-914.
- Goldbach, M., Axthelm, H., y Keusgen, M. (2006). *LTCC-based microchips for the electrochemical detection of phenolic compounds*. *Sensors and Actuators B*. 120, 346-351.
- Golonka, L., Roguszczak, H., Zawada, T., Radojewski, J., Grabowska, I., y Chudy, M. (2005). *LTCC based microfluidic system with optical detection*. *Sensors and Actuators B*. 111-112, 396-402.
- Gunasekara, D. B., Siegel, J. M., Caruso, G., Hulvey, M. K., y Lunteey, S. M. (2014). *Microchip electrophoresis with amperometric detection method for profiling cellular nitrosative stress markers*. *Analyst*. 139, 3265-3273.
- Hartman, R. L., y Jensen, K. F. (2009). *Microchemical systems for continuous-flow synthesis*. *The Royal Society of Chemistry*. 2495-2507.
- Jiménez-Rioja, E. *Análisis físicoquímico de vinos blancos*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, 2015.
- Lawati, H. A., Gharibi, E. A., Kindy, S. M., Suliman, F. E., y Al-Lawati, A. M. (2011). *High throughput method for the analysis of cetrizine hydrochloride in pharmaceutical formulations and in biological fluids using a tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)-peroxydisulphate chemiluminescence system in a two-chip device*. *Talanta*. 85, 906-912.
- Lawati, H. A., Suliman, F. E., Kindy, S. M., Al-Lawati, A. M., Varma, G. B., y Nour, I. E. (2010). *Enhancement of on chip chemiluminescence signal intensity of tris(1,10-phenanthroline)-ruthenium(II) peroxydisphate system for analysis of chlorpheniramine maleate in pharmaceutical formulations*. *Talanta*. 1999-2002.

Bibliografía

- Luttge, R. (2011). *Microfluidic components, devices and integrated lab-on-a-chip systems*. Microfabrication for industrial applications (págs. 199-233). Oxford: Elsevier.
- McKay, D.L., Oliver-Chen, C.Y., Zampariello, C. A., y Blumberg, J. B. (2014). *Flavonoids and phenolic acids from cranberry juice are bioavailable and bioactive in healthy older adults*. Food Chemistry. 168, 233–240.
- Meng, X., Schultz, C. W., Cui, C., Li, X., y Yu, H. Z. (2015). *On-site chip-based colorimetric quantitation of organophosphorus pesticides using an office scanner*. Sensors and Actuators B: Chemical. 215, 577-583.
- Miller, N., y Miller, J. C. *Estadística y quimiometría para Química Analítica*. Cuarta edición. Editorial Prentice Hall. Madrid, 2002, pp. 21-30, 50-64.
- Mirasoli, M., Guardigli, M., Michelini, E., y Roda, A. (2014). *Recent advancements in chemical luminescence-based lab-on-chip and microfluidic platforms for bioanalysis*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 87, 36-52.
- Montgomery, D. C. *Diseño y análisis de experimentos*. Segunda edición. Editorial Limusa Wiley. México, D. F., 2004.
- Paradee, N., Sirivat, A., Niamlang, S., y Prissanaroon-Ouajai, W. (2012). *Effects of crosslinking ratio, model drugs, and electric field strength on electrically controlled release for alginate-based hydrogel*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 23, 999-1010.
- Plecis, A., y Chen, Y. (2007). *Fabrication of microfluidic devices based on glass-PDMS-glass technology*. Microelectronic Engineering. 84, 1265-1269.
- Quiñones, M., Miguel, M., y Aleixandre, A. (2012). *Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular*. Nutrición Hospitalaria. 27, 76-89.
- Ríos, Á., Zougagh, M., y Avila, M. (2012). *Miniaturization through lab-on-a-chip: Utopia or reality for routine laboratories? A review*. Analytica Chimica Acta. 740, 1-11.
- Ríos, Á y Zougagh, M. (2015). *Modern qualitative analysis by miniaturized and microfluidic systems*. Trends in Analytical Chemistry. 69, 105–113.
- Ro, K.W., Lim, K., Hahn, J. H., y Shim, B. C. (2005). *Integrated light collimating system for extended optical-path-length absorbance detection in microchip-based capillary electrophoresis*. Analytical Chemistry. 77, 5160-5166.
- Rolland, J.P., Van Dam, R. M., Schorzman, D. A., Quake, S. R., y DeSimone, J. M. (2004). *Solvent-resistant photocurable "liquid Teflon" for microfluidic device fabrication*. Journal of the American Chemical Society. 126, 2322-2323.
- Shih, W.P., Hui, C.Y., y Tien, N. C. (2004). *Collapse of microchannels during anodic bonding: Theory and experiments*. Journal of Applied Physics. 95, 2800-2808.

Bibliografía

Singleton, V.L., Orthofer, R., y Lamuela-Raventós, R.M. (1999). *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent*. *Methods in Enzymology*. 299, 152-178.

Skoog, D.A., Holler, F.J., y Nieman, T.A. *Principios de Análisis Instrumental*. Quinta edición. Madrid, McGraw-Hill. 2003.

Tabeling, P. (2005). *Introduction to microfluidics*. New York: Oxford University Press.

Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., y Conte, A. (2005). *Effect of some phenolic compounds and beverages on pepsin activity during simulated gastric digestion*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 8706-8713.

Temiz, Y., Lovchik, R. D., Kaigala, G. V., y Delamarche, E. (2015). *Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab?*. *Microelectronic Engineering*. 132, 156-175.

Ueno, Y., Horiuchi, T., Morimoto, T., y Niwa, O. (2001). *Microfluidic device for airborne BTEX detection*. *Analytical Chemistry*. 73 (19), 4688-4693.

Urban, P. L., Goodall, D. M., y Bruce, N. C. (2006). *Enzymatic microreactors in chemical analysis and kinetic studies*. *Biotechnology Advances*. 24, 42-57.

Wu, W. I., Rezai, P., Hsu, H. H., y Selvaganapathy, P. R. *Microfluidic devices for biomedical applications*. (2013). Part I: Fundamentals of microfluidic technologies for biomedical applications. *Materials and methods for the microfabrication of microfluidic biomedical devices*. A volume in Woodhead Publishing series in Biomaterials. Cambridge, Edited by X. Li, & Y. Zhou.

<http://oceanoptics.com/product-category/numerical-aperture>. Consultado el 24-5-2015.

ANEXOS

Anexo 1. Regresión simple con datos homocedásticos.

	X_i	Y_i	$X_i - X_{MEDIA}$	$(X_i - X_m)^2$	$Y_i - Y_{MEDIA}$	$(Y_i - Y_m)^2$	$(X_i - X_m)(Y_i - Y_m)$	X_i^2	$\hat{Y}(\text{predicha})$	$Y_i - Y_{predicha}$	$(Y_i - Y_{pre})^2$
	0.02963	0.26244444	-0.0625825	0.003916569	-0.281903075	0.079469344	0.017642199	0.000877937	0.294014018	-0.031569573	0.000996638
	0.04444	0.342727273	-0.0477725	0.002282212	-0.201620247	0.040650724	0.009631903	0.001974914	0.353254847	-0.010527574	0.00011083
	0.05925	0.43675	-0.0329625	0.001086526	-0.10759752	0.011577226	0.003546683	0.003510563	0.412495675	-0.024254325	0.000588272
	0.0711	0.493285714	-0.0211125	0.000445738	-0.051061806	0.002607308	0.001078042	0.00505521	0.459896338	-0.033389376	0.00111485
	0.08888	0.528416667	-0.0033325	1.11056E-05	-0.015930853	0.000253792	5.30896E-05	0.007899654	0.531017333	-0.002600667	6.76347E-06
	0.1185	0.6488	0.0262875	0.000691033	0.10445248	0.010910321	0.002745795	0.01404225	0.649498991	-0.000698991	4.88588E-07
	0.1481	0.765083333	0.0558875	0.003123413	0.220735813	0.048724299	0.012336373	0.02193361	0.767900647	-0.002817314	7.93726E-06
	0.1778	0.877272727	0.0855875	0.00732522	0.332925207	0.110839194	0.028494236	0.03161284	0.886702309	-0.009429582	8.8917E-05
Suma	0.7377	4.354780159		0.018881816		0.305032208	0.075528321	0.086906977			0.002914697
Media	0.0922125	0.54434752									

Pendiente = 4.00

Ordenada = 0.17

$Se^2 = 0.00048578$ $Se = 0.022$

$So^2 = 0.0002791$ $So = 0.0167053$

$Si^2 = 0.025691$ $Si = 0.160283$

Intervalos de confianza

T de student para grados de libertad 6 y alfa 0.05, de dos lados = 2.447

$t_{So} = 0.04088$ IC para la ordenada (0.1346 a 0.2163)

$t_{Si} = 0.392213$ IC para la pendiente (3.60827 a 4.39267)

Anexo 2. Evaluación del ancho de los microcanales a través de la comparación de rectas de regresión.

a) Estudio 1

Coeficientes

<i>Chip</i>	<i>Ordenada al origen</i>	<i>Pendiente</i>
1	0.00810299	25.9862
2	0.00913568	25.8352
3	0.00671568	27.1718
4	0.0180325	24.3251

ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Concentraciones de ácido tánico	8.66639	1	8.66639	10843.60	0.0000
Interceptos	0.00868588	3	0.00289529	3.62	0.0275
Pendientes	0.013281	3	0.00442701	5.54	0.0049
Modelo	8.68835	7			

La tabla anterior permite evaluar la significancia estadística de los términos en el modelo. Debido a que el valor-P para las pendientes es menor que 0.01, existen diferencias estadísticas entre las pendientes para los distintos chips con un nivel de confianza del 99%. Dado el valor-P para las ordenadas al origen es menor que 0.05, existen diferencias estadísticamente significativas entre las ordenadas al origen para los diferentes chips con un nivel de confianza del 95%.

b) Estudio 2

Coeficientes

<i>Chip</i>	<i>Ordenada al origen</i>	<i>Pendiente</i>
1	-0.0237294	22.5694
2	-0.000318446	21.3796
3	-0.0214142	23.9381
4	0.00594687	21.1105

ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Concentraciones de ácido tánico	6.43044	1	6.43044	8515.29	0.0000
Interceptos	0.0055443	3	0.0018481	2.45	0.0883
Pendientes	0.0162628	3	0.00542094	7.18	0.0013
Modelo	6.45224	7			

La tabla anterior permite evaluar la significancia estadística de los términos en el modelo. Debido a que el valor-P para las pendientes es menor que 0.01, existen diferencias estadísticas entre las pendientes para los distintos chips con un nivel de confianza del 99%. Dado el valor-P para las ordenadas al origen es menor que 0.1, existen diferencias estadísticamente significativas entre las ordenadas al origen para los diferentes chips con un nivel de confianza del 90%.

Anexo 3. Cálculo de incertidumbre en las concentraciones interpoladas en la curva de calibración.

$$S_{x_0} = S_e / b \sqrt{1/m + 1/n + [(Y_0 - Y_{media})^2 / (b^2 \sum (X_i - X_{media})^2)]}$$

m = repeticiones de la medida de la muestra (10)

n = número de estándares utilizados en la calibración

Y₀ = valor de la señal experimental de la muestra

b = pendiente de la curva

S_{y/x} = S_e

± = (Valor t) S_e / m

Anexo 4. Cálculo del porcentaje de volumen de muestra que se logra difundir dentro del microdispositivo.

1. $d = V * t$;

d = distancia (cm).
 V = velocidad (cm/s).
 t = tiempo (s).

2. $Q = V * A \rightarrow V = Q/A$;

Q = caudal (cm³/s).
 V = velocidad (cm/s).
 A = área (cm²).

3. $t = x^2/2D$

t = tiempo (s).
 x = ancho del microcanal (cm).
 D = coeficiente de difusión de ácido tánico (cm²/s) (Paradee et al., 2012).

- Cálculo del tiempo de difusión.

$$Q = \frac{102 \mu L}{min} * \frac{1 mL}{1000 \mu L} * \frac{1 cm^3}{1 mL} * \frac{1 min}{60 s} = 1.7 \times 10^{-3} \frac{cm^3}{s}$$

$$A = 0.0108 cm * 0.006 cm = 6.48 \times 10^{-5} cm^2$$

$$V = \frac{1.7 \times 10^{-3} \frac{cm^3}{s}}{6.48 \times 10^{-5} cm^2} = 26.24 \frac{cm}{s}$$

$$t = \frac{(0.0108 cm)^2}{2 (7.02 \times 10^{-7} \frac{cm^2}{s})} = 83.08 s$$

- Cálculo de la distancia en que se difundirá totalmente el volumen de muestra introducido al microdispositivo.

$$d = (26.24 \frac{cm}{s}) * (83.08 s) = 2180 cm$$

- Cálculo del porcentaje de la muestra que se logra difundir dentro del microdispositivo.

$$4.61 cm \left(\frac{100 \%}{2180 cm} \right) = 0.21 \%$$