



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

EVALUACIÓN DE MICRODISPOSITIVOS PARA LA EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DE  
COMPUESTOS FENÓLICOS EN ACEITE DE OLIVA

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. KENIA CHÁVEZ RAMOS

DRA. MARÍA DEL PILAR CAÑIZARES MACÍAS

FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2017



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     Dra. María Guadalupe Albarrán Sánchez

Vocal            M. en C. María de los Ángeles Valdivia López

Vocal            Dr. Alberto Rojas Hernández

Vocal            Dr. Arturo Navarro Ocaña

Secretario     Dr. Luis Fernando Olguín Contreras

## **Lugar donde se desarrolló la tesis:**

Laboratorio 211 “Métodos de Flujo Continuo” del edificio F perteneciente a la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## **Tutora de la Tesis:**

---

Dra. María del Pilar Cañizares Macías

Este trabajo se presentó en el **XXIX Congreso Nacional de Química Analítica** bajo las modalidades de cartel y exposición oral, así como en el **VI Congreso Iberoamericano de Química Analítica y Encuentro Nacional de Química Ambiental** bajo modalidad oral.

### Agradecimientos

Al CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios de maestría con número de becario 576703 y número de CVU 662463.

A la dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo financiero para la realización del trabajo bajo el Proyecto IN218415 titulado “Diseño, construcción y evaluación de microdispositivos para aplicaciones químicas y biológicas”.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por todas las oportunidades brindadas en todos estos años de formación universitaria.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por enseñarme y ayudarme a comprender el desafiante y apasionante mundo de la química.

A la Facultad de Química por abrirme sus puertas para seguir profundizando mi conocimiento.

A la Dra. María del Pilar Cañizares Macías por darme la oportunidad de colaborar en su grupo de trabajo, muchas gracias por todos sus consejos durante el desarrollo del proyecto, sobre todo por su tiempo, paciencia y apoyo brindados incondicionalmente.

A mi jurado asignado, la Dra. María Guadalupe Albarrán Sánchez, la M. en C. María de los Ángeles Valdivia López, el Dr. Alberto Rojas Hernández, el Dr. Arturo Navarro Ocaña y el Dr. Luis Fernando Olgún Contreras, por su tiempo brindado para la revisión de este trabajo y sus atinadas observaciones para la mejora del mismo.

Un especial agradecimiento al Dr. Luis Fernando Olgún Contreras y a mis compañeros del laboratorio 309 del Edificio F de la Facultad de Química de la UNAM, por su asesoría y ayuda para la construcción y caracterización de los microdispositivos.

A mis compañeros pero sobre todo amigos del laboratorio 211, gracias por los buenos momentos que ayudaron a hacer más amenas las sesiones experimentales y la escritura de esta tesis.

## Dedicatoria

*A mi abuelo, por quien soy lo que soy, el Ángel que me guía desde el cielo.*

A mi abuelita Concepción, mi mamá Lorena, mis tíos y primos, por la confianza depositada en mí todos estos años de estudio.

A mi hermano Ricardo y a Simbi, por ayudarme a disfrutar de la vida.

A Víctor García, por permitirme formar parte de su vida y por enseñarme a tener Fe.

## Índice

<b>Símbolos y abreviaturas.....</b>	<b>8</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>11</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>12</b>
<b>2. Marco teórico.....</b>	<b>13</b>
2.1. Características del olivo y su fruto.....	13
2.2. Variedades de olivo.....	14
2.3. Aceite de oliva.....	14
2.3.1. Elaboración.....	15
2.3.2. Denominaciones.....	16
2.3.3. Composición.....	17
2.3.3.1. Fracción mayoritaria.....	18
2.3.3.2. Fracción minoritaria.....	21
2.3.3.2.1. Compuestos fenólicos.....	26
2.3.3.3. Compuestos volátiles y aromáticos.....	29
2.3.4. El aceite de oliva en la dieta y salud humana.....	30
2.3.4.1. Capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos.....	31
2.4. Métodos de extracción de compuestos fenólicos.....	32
2.4.1. Extracción Líquido-Líquido (LLE).....	33
2.4.2. Extracción en Fase Sólida (SPE).....	34
2.4.3. Microextracción en Fase Líquida (LPME).....	35
2.5. Cuantificación de polifenoles totales: ensayo de Folin-Ciocalteu... ..	36
2.6. Detección óptica: espectrofotometría UV-Vis.....	37
2.7. Microfluídica: comportamiento del flujo a microescala.....	39
2.8. Dispositivos Lab-on-a-chip (LOC).....	40
2.8.1. Métodos de fabricación.....	42
2.8.1.1. Fotolitografía.....	43
2.8.1.2. Litografía suave.....	44
2.8.2. Materiales de fabricación: Polidimetilsiloxano (PDMS).....	45
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>48</b>
General.....	48
Específicos.....	48
<b>4. Metodología.....</b>	<b>49</b>
4.1. Equipos, instrumentos y reactivos.....	49

4.2. Softwares.....	51
4.3. Fabricación de los microdispositivos.....	51
4.3.1. Diseño de los microcanales.....	51
4.3.2. Fotolitografía y litografía suave.....	52
4.3.3. Caracterización de los microchips.....	55
4.4. Estudios previos.....	55
4.4.1. Calibración de la bomba peristáltica.....	55
4.4.2. Evaluación del caudal de las bombas de jeringa.....	56
4.4.3. Estabilidad del reactivo de Folin-Ciocalteu en medio básico.....	56
4.4.4. Pruebas de solubilidad de ácido tánico, gálico y cafeico.....	56
4.4.5. Estudio de extracción de polifenoles con detección en el microchip.....	57
4.5. Optimización de la extracción líquido-líquido en el microdispositivo.....	57
4.5.1. Montaje experimental.....	58
4.5.2. Diseño de experimentos factorial completo $2^4$ .....	59
4.5.3. Evaluación de la influencia del pH.....	60
4.5.4. Cinética de la reacción de Folin-Ciocalteu.....	60
4.5.5. Efecto del caudal sobre la extracción.....	60
4.5.6. Estudio de la longitud de los microcanales de extracción y reacción.....	60
4.5.6.1. Longitud del microcanal de extracción: máxima extracción... ..	61
4.5.7. Influencia de la concentración de la solución amortiguadora.....	61
4.6. Evaluación del tiempo de vida de los microdispositivos.....	61
4.7. Comportamiento del flujo en los microcanales.....	62
4.8. Validación de la metodología.....	62
4.8.1. Determinación del intervalo lineal.....	62
4.8.2. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).....	62
4.8.3. Construcción de la curva de calibración.....	63
4.8.4. Precisión: repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio.....	63
4.9. Análisis de muestras de aceite de oliva virgen extra.....	63
4.9.1. Extracción en el microdispositivo.....	64
4.9.2. Extracción en lote: Bonoli et al.....	64
4.9.3. Extracción en lote: Consejo Oleícola Internacional.....	64
4.9.4. Comparación de las señales en medio acuoso y metanol/agua.....	65
4.9.4.1. Construcción de la curva de calibración en metanol/agua (80:20 v/v) en lote	65
4.10. Eficiencia de extracción.....	66
4.10.1. Extracción con el estándar 2,4-Diclorofenol.....	66
<b>5. Resultados y discusión.....</b>	<b>67</b>
5.1. Fabricación y caracterización de los microchips.....	67

5.2. Estudios previos.....	70
5.2.1. Calibración de la bomba peristáltica.....	70
5.2.2. Evaluación del caudal de las bombas de jeringa.....	70
5.2.3. Estabilidad del reactivo de Folin-Ciocalteu en medio básico.....	71
5.2.4. Pruebas de solubilidad de ácido tánico, gálico y cafeico.....	71
5.2.5. Estudio de extracción de polifenoles con detección en el microchip.....	72
5.3. Optimización de la extracción líquido-líquido en el microdispositivo.....	73
5.3.1. Fundamento de la extracción.....	73
5.3.2. Diseño de experimentos factorial completo 2 <sup>4</sup> .....	74
5.3.3. Evaluación de la influencia del pH.....	77
5.3.4. Cinética de la reacción de Folin-Ciocalteu.....	78
5.3.5. Efecto del caudal sobre la extracción.....	79
5.3.6. Estudio de la longitud de los microcanales de extracción y reacción.....	81
5.3.7. Influencia de la concentración de la solución amortiguadora.....	83
5.4. Evaluación del tiempo de vida de los microdispositivos.....	83
5.5. Comportamiento del flujo en los microcanales.....	85
5.6. Validación de la metodología.....	86
5.6.1. Determinación del intervalo lineal.....	86
5.6.2. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).....	88
5.6.3. Construcción de la curva de calibración.....	89
5.6.4. Precisión: reproducibilidad y repetibilidad intralaboratorio.....	92
5.7. Análisis de muestras de aceite de oliva virgen extra.....	96
5.7.1. Comparación de las señales en medio acuoso y metanol/agua.....	96
5.7.1.1. Construcción de la curva de calibración en metanol/agua (80:20 v/v).....	102
5.7.2. Comparativo de la cuantificación con base en la metodología de extracción.....	105
5.8. Eficiencia de extracción.....	108
5.8.1. Extracción con el estándar 2,4-Diclorofenol.....	109
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>111</b>
<b>7. Perspectivas.....</b>	<b>112</b>
<b>8. Anexos.....</b>	<b>113</b>
<b>9. Referencias.....</b>	<b>118</b>



## Símbolos y abreviaturas

° C	Grados centígrados
$\alpha$	Nivel de significancia
$\varepsilon$	Coefficiente de absortividad molar
$\lambda$	Longitud de onda
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrometro
$\mu\text{mol}$	Micromol
$\mu\text{TAS}$	Microsistemas de Análisis Total ( <i>Micrototal Analysis System</i> )
2,4,6- TCF	2,4,6-Triclorofenol
2,4-DCF	2,4-Diclorofenol
A	Absorbancia
ANOVA	Análisis de Varianza
$A_{\text{prom}}$	Absorbancia promedio
$A_{\text{promprom}}$	Absorbancia promedio promedio
ÁT	Ácido Tánico
$b_0$	Ordenada al origen de la curva de calibración
$b_1$	Pendiente de la curva de calibración
BJ	Bomba de Jeringa
BP	Bomba Peristáltica
C	Concentración
CF	Celda de Flujo
CG	Cromatografía de Gases
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
cm	Centímetro
CM	Cuadrado Medio
COI	Consejo Oleícola Internacional
DLLME	Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva ( <i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i> )
EC	Electroforesis Capilar
F	Estadístico contraste F de Fisher
g	Gramo
GL	Grados de libertad
h	hora
$H_0$	Hipótesis nula
$H_1$	Hipótesis alterna
I	intensidad de radiación emergente

$I_0$	Intensidad de radiación incidente
ID	Diámetro Interno ( <i>Internal Diameter</i> )
in	Pulgadas
kg	Kilogramo
L	Litro
$l$	Longitud de paso óptico
LLE	Extracción Líquido-Líquido ( <i>Liquid-Liquid extraction</i> )
LOC	Laboratorio en un chip ( <i>Lab-on-a-chip</i> )
LOD	Límite de detección ( <i>Limit of Detection</i> )
LOQ	Límite de cuantificación ( <i>Limit of Quantification</i> )
LPME	Microextracción en Fase Líquida ( <i>Liquid Phase Microextraction</i> )
LSE	Longitud serpentín de extracción
LSR	Longitud serpentín de reacción
LT	Longitud Total
MAE	Extracción Asistida por Microondas ( <i>Microwave Assited Extraction</i> )
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
mgE	Miligramo Equivalente
mgEÁT	Miligramos Equivalente de Ácido Tánico
min	minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmol	Milimol
nm	Nanómetros
No.	Número
PDMS	Polidimetilsiloxano
PEEK	Poliéter étercetona
PLE	Extracción con Líquidos Presurizados ( <i>Pressurized Liquid Extraction</i> )
PM-Acetato	Propilenglicol monometil éter acetato
$R^2$	Coefficiente de determinación
Re	Número de Reynolds
Reactivo F-C	Reactivo de Folin-Ciocalteu
rpm	Revolución por minuto
S	Desviación estándar
s	Segundo
$S_0$	Desviación estándar de la ordenada al origen
$S_1$	Desviación estándar de la pendiente
$S^2$	Varianza
SC	Suma de Cuadrados
SDME	Microextracción con Gota Suspendida ( <i>Sigle-Drop Microextraction</i> )

SFE	Extracción con Fluidos Supercríticos ( <i>Supercritical Fluid Extraction</i> )
SPE	Extracción en Fase Sólida ( <i>Solid Phase Extraction</i> )
$S_R^2$	Repetibilidad intralaboratorio
$S_{WR}^2$	Reproducibilidad intralaboratorio
$S_{y/x}$	Desviación estándar de regresión
$t$	Estadístico prueba t de Student
TAS	Sistemas de Análisis Total ( <i>Total Analysis System</i> )
Ton	Toneladas
UAE	Extracción Asistida por Ultrasonido ( <i>Ultrasound Assited Extraction</i> )
UE	Unión Europea
UV	Ultravioleta
V	Volumen
v/v	Proporción volumen/volumen
Vis	Visible
VT	Volumen Total

## Resumen

En el presente trabajo se diseñaron, construyeron y evaluaron microdispositivos para la extracción líquido-líquido de compuestos fenólicos en aceite de oliva virgen extra, una vez extraídos la cuantificación por espectrofotometría se realizó acoplado una celda de flujo fuera del microchip. La construcción se hizo a través de la técnica de fotolitografía y litografía suave empleando como material el polímero polidimetilsiloxano (PDMS) y sellando los canales con descargas de plasma sobre vidrio. El microdispositivo estuvo formado por dos partes: (1) zona de extracción, en donde se introdujo la muestra de aceite y la solución amortiguadora y (2) zona de reacción, en donde se incorporó el reactivo de Folin-Ciocalteu para la formación del producto colorido.

La optimización de la extracción se realizó mediante una serie de experimentos en los que se estudió la influencia del caudal, el pH, la concentración de la solución amortiguadora, la longitud del microcanal y la concentración del reactivo de Folin-Ciocalteu. Se encontró que los factores que influían significativamente en la extracción fueron el pH y las concentraciones de las soluciones amortiguadora y Folin-Ciocalteu. Asimismo, el aumento en la longitud del microcanal del serpiente de extracción influyó positivamente. Las condiciones óptimas encontradas fueron: caudal de 40  $\mu\text{L}/\text{min}$ , concentración de Folin-Ciocalteu 0.02 mol/L, solución amortiguadora de carbonatos 0.75 mol/L pH 10.6 y longitud de microcanal de extracción de 26.36 cm. Con la extracción optimizada se construyó la curva de calibración empleando como estándar ácido tánico en medio acuoso, se determinó el intervalo lineal de 1.18 a 11.79  $\mu\text{mol}/\text{L}$  (2.00 a 20.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), con límite de detección de 0.51  $\mu\text{mol}/\text{L}$  (0.873  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y de cuantificación de 1.18  $\mu\text{mol}/\text{L}$  (2.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se evaluó la precisión de la metodología desarrollada en términos de reproducibilidad y repetibilidad intralaboratorio obteniendo como resultado 2.93 % y 1.45 % respectivamente; posteriormente se aplicó a seis muestras de aceite de oliva virgen extra y se compararon los resultados con dos métodos de extracción en lote. El porcentaje de extracción varió dependiendo de la metodología empleada, donde la extracción utilizando el microdispositivo tuvo una eficiencia entre 46 % y 67 % mayor que por los métodos de extracción convencionales.

Los dispositivos Lab-on-a-chip presentaron diversas ventajas entre las que se encuentran: menor manipulación por parte del usuario, baja demanda de reactivos y muestras, menor generación de residuos y disminución del tiempo de análisis, logrando analizar hasta 10 muestras por hora.

**Palabras clave:** polifenoles; Lab-on-a-chip (LOC); microfluídica; microchip; reacción de Folin-Ciocalteu; capacidad antioxidante; microextracción en fase líquida (LPME).

## 1. Introducción

La química analítica actual busca realizar mediciones rápidas y continuas empleando volúmenes de muestra pequeños y generando menor cantidad de residuos, lo cual ha conducido a la miniaturización y al surgimiento de dispositivos de microfluídica denominados *Lab-on-a-chip* (LOC), donde se integran todas las funciones o procesos que se realizan en un laboratorio en un solo chip miniaturizado. La técnica más empleada para su construcción es la fotolitografía, que consiste en la elaboración de un molde por medio de la “impresión” de un patrón utilizando una máscara con el diseño sobre una superficie cubierta de un material sensible a la luz. Una vez que se obtiene el molde, es posible fabricar muchos microchips empleando diversos polímeros, el polidimetilsiloxano (PDMS) es el material más utilizado [1].

El aceite de oliva es el aceite procedente del fruto del árbol de olivo (oliva o aceituna), su composición química incluye una mezcla heterogénea de componentes entre los que se encuentran los compuestos fenólicos, caracterizados por tener diversos grupos hidroxilo con anillos aromáticos (flavonoides, alcoholes fenólicos, ácidos fenólicos, lignanos y secoiridoides), los cuales se localizan únicamente en este tipo de aceite vegetal y a los que se les atribuyen funciones diversas en beneficio a la salud humana como son actividad antimicrobiana y actividad antioxidante. Su concentración en el aceite puede variar de 200 a 1500 mg/kg, presentando un intervalo tan amplio debido al gran número de factores involucrados en su contenido final: maduración de la aceituna, el sistema de extracción de aceite empleado, tipo de aceituna, variedades climatológicas y agronómicas de cultivo, etc. [2].

Los compuestos fenólicos de aceite de oliva pueden ser extraídos aplicando diversas metodologías, la más empleada es la extracción líquido-líquido (LLE), en donde se utiliza una mezcla de disolventes inmiscibles como n-hexano y metanol/agua, así dependiendo de su afinidad el compuesto fenólico se repartirá entre ambas fases [3]. Sin embargo, esta técnica requiere gran cantidad de disolventes orgánicos y tiempos de extracción relativamente grandes; lo anterior ha conducido a la búsqueda y desarrollo de nuevas técnicas de separación aprovechando la microtecnología, así, se han construido dispositivos LOC, en donde dos líquidos inmiscibles fluyen a través de microcanales originando la extracción de los compuestos fenólicos. En los últimos años la microextracción en fase líquida (PLME) se ha definido como una técnica prometedora para la separación de diferentes compuestos químicos y bioquímicos [4-6].

Una vez extraídos, los polifenoles suelen ser cuantificados como contenido de polifenoles totales referido a equivalentes de ácido gálico o ácido tánico. Para ello se emplea el reactivo de Folin-Ciocalteu en medio básico; la química de la reacción es compleja, pero se sabe que se trata de una reacción de transferencia de electrones entre los iones fenolato y los molibdatos/tungstatos, dando como resultado un producto color azul con detección espectrofotométrica a  $\lambda = 730 \text{ nm}$  [7].

## 2. Marco teórico

### 2.1. Características del olivo y su fruto.

El olivo, denominado científicamente como *Olea europaea L.*, es una de las plantas cultivadas más antiguas, sus orígenes se remontan hace unos 4,000 años A.C. en la región geográfica que abarca desde el sur del Cáucaso hasta las altiplanicies de Irán, Palestina y la zona costera de Siria. Con el paso de los años se ha extendido hasta poblar todos los países ribereños del Mediterráneo. A partir del siglo XV se extendió por el nuevo mundo y actualmente es cultivado también en Sudáfrica, China, Japón y Australia [8].

Pertenece a la familia *oleaceae*, siendo la única especie de la familia con fruto comestible. Es un árbol longevo, puede alcanzar hasta 15 metros de altura, con copa ancha y tronco grueso, retorcido y a menudo muy corto. Crece entre las latitudes 30° y 45° en ambos hemisferios, en regiones que poseen clima mediterráneo que se caracteriza por presentar veranos cálidos e inviernos con temperaturas suaves. El crecimiento del olivo es lento. Suele dar fruto al cabo de 5 a 10 años desde su plantación y no alcanza su pleno desarrollo hasta los 20. Desde los 35 a los 100-150 años se encuentra en su período de madurez y plena producción [9, 10].

El fruto del olivo, llamado oliva o aceituna, es de tamaño pequeño de forma elipsoidal, mide de 1 a 4 cm de longitud y su diámetro varía de 0.6 a 2 cm. De acuerdo a su definición botánica, se trata de una *drupa*, con una sola semilla y posee tres partes fundamentales:

1. *Endocarpio* o hueso, cáscara leñosa que encierra la semilla, posee pequeñas cantidades de aceite.
2. *Mesocarpio* o pulpa, que contiene la mayor cantidad de aceite.
3. *Exocarpio* o piel exterior, membrana externa y lisa, cambia de color de verde a morado a medida que el fruto madura, y es revestida por una sustancia cerosa protectora.

La aceituna contiene de un 70 a 90 % de pulpa, 9 a 27 % de hueso y de 2 a 3 % de semilla, en relación al peso total del fruto. El porcentaje tan elevado de pulpa facilita la extracción del aceite por una simple presión ejercida por un molino [9-12].



**Figura 1.** Árbol de olivo (izquierda) y su fruto aceituna en proceso de maduración (derecha).

## 2.2. Variedades de olivo.

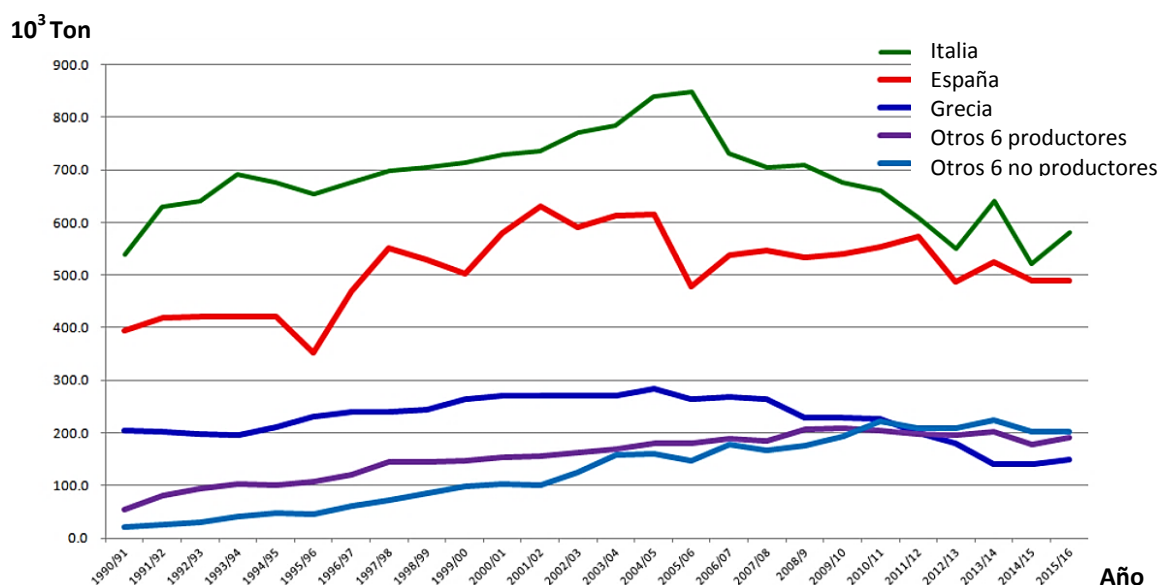
Existen diferentes variedades de olivo, de acuerdo a su procedencia algunos de los más importantes son:

- Origen español: Picual, Hojiblanca, Cornicabra, Lechín, Arbequina, Arbusana, Banqueta, Changlot real, Empeltre y Manzanilla española.
- Origen Italiano: Frantoio, Coratina y Carolea.
- Origen Griego: Koroneiki y Mastoidis.
- Originarias de Túnez: Chemlaly y Chetoui.
- Originarias de Turquía: Memecik, Ayvalik y Gemlic.

## 2.3. Aceite de oliva.

El aceite de oliva es el aceite procedente únicamente del fruto del árbol de olivo (oliva o aceituna), con la exclusión de aceites obtenidos usando disolventes o procesos de re-esterificación y de toda mezcla con aceites de otra naturaleza [13,14].

La producción del olivar alcanza una media anual de 16 millones de aceitunas, de las cuales un 90% se destinan a la elaboración de aceite y únicamente un 10 % se consumen elaboradas como aceitunas de mesa; siendo España el principal país productor de aceite de oliva con 49 % de la producción mundial, seguido por otros países de la cuenca mediterránea como Italia, Portugal y Grecia [15]. De acuerdo al Consejo Oleícola Internacional, los principales países consumidores son también los productores, pertenecientes a la Unión Europea (UE), como se muestra en la **Figura 2**, liderado por España e Italia con casi el 70 % del consumo.



**Figura 2.** Evolución del consumo de aceite de oliva en países de la UE (1990/91-2015/16) [16].

### 2.3.1. Elaboración.

A continuación se describen los pasos a seguir para la elaboración del aceite de oliva [17, 18].

#### I. Recolección de la aceituna.

Las aceitunas deben recolectarse de los olivares a finales de otoño y comienzos de invierno, temporada en la cual poseen su máximo nivel de ácidos grasos en la pulpa. Para obtener un aceite de calidad se debe prestar atención a recolectar la aceituna en el momento óptimo de maduración, esto ocurre cuando la gran mayoría ha cambiado de color verde a violáceo, término conocido como *envero*, véase **Figura 1**. Los métodos de recolección pueden ir desde una recolección manual, que requiere mayor esfuerzo por parte del olivarero (persona dedicada al cultivo del olivo) y gran cantidad de mano de obra, hasta el uso de maquinaria vibratoria denominada como *vareador eléctrico*, que induce la caída de las aceitunas. Lo más importante es que el fruto se maltrate en la menor medida posible trasladándose inmediatamente a la almaraza. Una vez ahí las aceitunas se limpian y criban eliminando toda clase de residuos como hojas, tallos, tierra o pequeñas piedras. Posteriormente se lavan con agua fría para eliminar otras impurezas como polvo, barro y restos posibles de herbicidas. Por último se almacenan en pequeñas pilas a la espera de ser molidas.

#### II. Molturación.

La molienda o prensado es el primer proceso al que son sometidas después de su recolección. Consiste en un mortero o molino de rulo donde se trituran los frutos para romper los tejidos en los que se encuentra el aceite. La mayoría de las almarazas cuentan con molinos de martillos de eje horizontal, donde se va introduciendo la aceituna de forma automatizada mientras recibe el impacto de los martillos metálicos que giran a gran velocidad. El molino cuenta con una criba de diámetro determinado; la aceituna molida sólo puede salir hasta haber alcanzado el tamaño adecuado para pasar a través de la criba.

#### III. Batido.

La pasta de molturación obtenida es batida con el fin de sacar el aceite creando gotas de mayor tamaño por agregación. Las batidoras empleadas tienen palas que mueven de manera lenta pero continua la pasta en un recipiente semicilíndrico, también contienen una camisa por donde circula agua caliente para facilitar la extracción del aceite de la masa batida.

#### IV. Separación.

La separación de la parte oleosa y acuosa después del batido puede realizarse por medio de una técnica conocida como *extracción por presión*, en la cual la pasta se somete a una presión en frío. Otro método empleado con mayor frecuencia a nivel industrial es la centrifugación, en el cual la pasta una vez batida se centrifuga sin añadir productos químicos y/o calor; gracias a la distinta densidad de los líquidos, los productos extraídos se separan, quedando en la parte



exterior de la centrífuga los componentes más pesados (agua y orujo) y al centro, los menos pesados (aceite).

La pasta restante aún contiene cantidades de aceite y puede ser sometida al proceso de separación al menos tres veces más. El aceite de mayor calidad es aquel que se extrae de la pasta en la primera prensada en frío o bien en la primera centrifugación, y según se va exprimiendo se van obteniendo aceites de diferente calidad.

#### V. Almacenamiento.

Para conservar inalteradas las cualidades del aceite, se almacenan en depósitos de acero inoxidable o trujales vitrificados, en oscuridad y tranquilidad, a temperaturas bajas y constantes (alrededor de 15 °C). Para evitar enranciamientos o enturbiamientos, los depósitos deben ser de un material inerte, opaco e impermeable y no deben absorber olores.

### 2.3.2. Denominaciones.

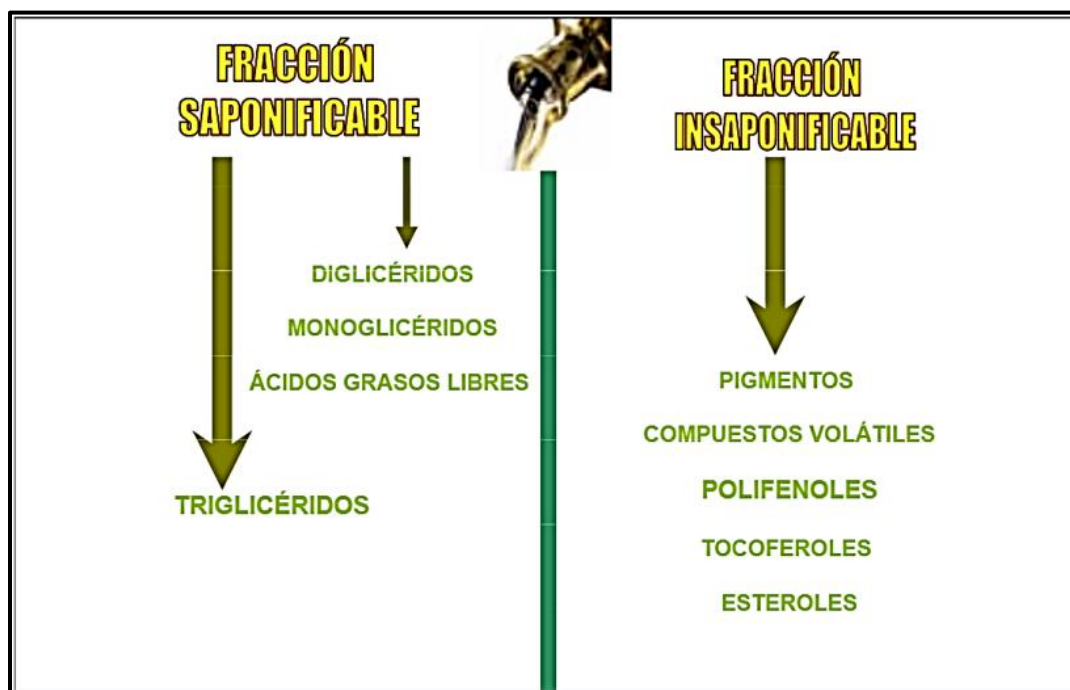
El aceite de oliva se comercializa bajo diferentes denominaciones, dependiendo de su manera de obtención y el valor de acidez libre, las cuales se definen a continuación de acuerdo a la **Norma Mexicana NMX-F-109-SCFI-2014:**

- a. **Aceite de oliva virgen**, es el aceite obtenido del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos o por otros medios físicos en condiciones especialmente térmicas, que no produzcan la alteración del aceite. Que no haya tenido más tratamiento que el lavado, decantación, centrifugación y filtrado. Posee una acidez libre, expresada como ácido oleico, de no más de 2.0 g por 100 g. Dentro de los aceites de oliva vírgenes se encuentra la siguiente clasificación:
  - Aceite de oliva virgen extra, aceite virgen de oliva con una acidez libre de no más de 0.8 g por 100 g.
  - Aceite de oliva virgen ordinario, aceite virgen de oliva con una acidez libre de no más de 3.3 g por 100 g.
- b. **Aceite de oliva refinado**, aceite de oliva obtenido de aceites vírgenes de oliva por métodos de refinación que no llevan a alteraciones en la estructura glicérica inicial. Tiene una acidez libre de no más de 0.3 g por 100 g.
- c. **Aceite de oliva - contiene exclusivamente aceite de oliva refinados y aceites de oliva vírgenes**, aceite que consiste de una mezcla de aceite de oliva refinado y aceites vírgenes de oliva adecuada para consumo humano, tiene una acidez libre de 1.0 g por 100 g.

- d. **Aceite de orujo de olivo crudo**, es el aceite obtenido por el tratamiento de la pasta del orujo del olivo con solventes u otros tratamientos físicos, con la exclusión de aceites obtenidos por procesos de re-esterificación y de cualquier mezcla con aceites de otro tipo.
- e. **Aceite refinado de orujo de oliva**, aceite obtenido del aceite crudo de orujo de oliva por métodos de refinación que no llevan a alteraciones de la estructura glicérica inicial. Tiene una acidez libre, expresada como ácido oleico de no más de 0.3 g por 100 g.
- f. **Aceite de orujo de oliva**, aceite que consiste de una mezcla de aceites refinados de orujo de oliva y aceites de oliva vírgenes. Tiene una acidez libre de no más de 1.0 g por 100 g.

### 2.3.3. Composición.

La composición del aceite de oliva varía en función de diversos factores como son: variedad de la aceituna, grado de maduración, condiciones agronómicas y características tecnológicas de producción. De manera general, su composición puede dividirse en dos fracciones: (1) fracción mayoritaria o saponificable, que representa del 98 % al 99 % del peso total del aceite y (2) fracción minoritaria o insaponificable, que alcanza cerca del 2 % del peso del aceite de oliva, **Figura 3**. Asimismo, pueden encontrarse algunos compuestos volátiles y aromáticos. [2].



**Figura 3.** Composición del aceite de oliva [2].

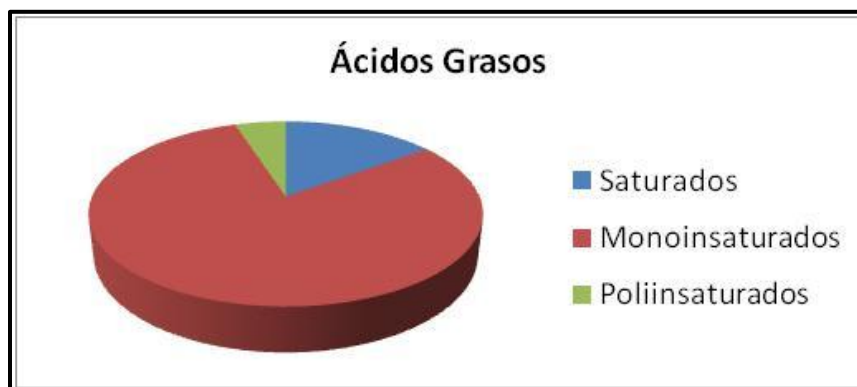
### 2.3.3.1 Fracción mayoritaria.

Entre los constituyentes de esta fracción están los triglicéridos, siendo el componente principal del aceite de oliva. También se encuentran presentes en una fracción mucho menor: diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres.

- Ácidos Grasos.

Los ácidos grasos son moléculas de naturaleza lipídica que se constituyen por una cadena lineal hidrocarbonada de diferente longitud en cuyo extremo hay un grupo carboxilo, por lo que pueden ser considerados como ácidos orgánicos de cadena larga. Se clasifican en tres grupos principales dependiendo del número de insaturaciones que presenta: **(1)** Saturados, **(2)** Monoinsaturados y **(3)** Poliinsaturados. El aceite de oliva es una grasa vegetal que, a diferencia de otros aceites vegetales, posee un alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados, **Figura 4**.

La presencia de ácidos grasos libres da al aceite su carácter ácido, dependiendo de su concentración. Sin embargo, los ácidos grasos se encuentran libres en el aceite sólo en pequeñas concentraciones debido a que tienden a formar triglicéridos al combinarse con glicerol.

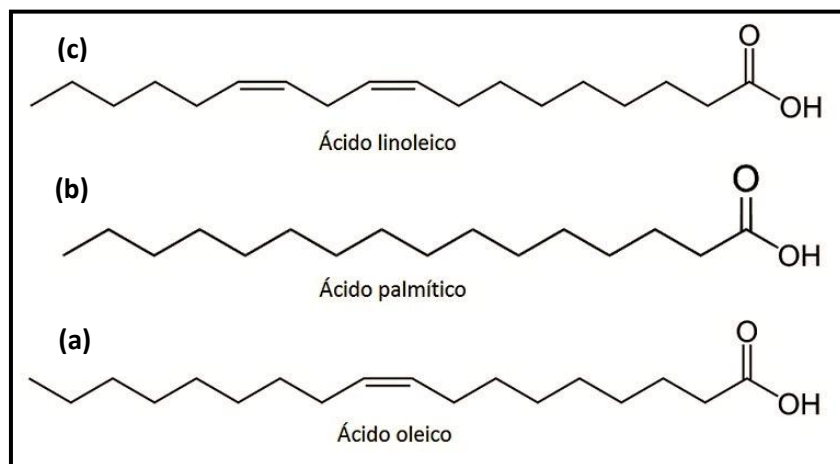


**Figura 4.** Distribución de la composición de ácidos grasos en aceite de oliva.

Los ácidos grasos presentes en el aceite de oliva son: mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), heptadecanoico (C17:0), heptadecenoico (C17:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoléico (C18:2), linolénico (C18:3), araquídico (C20:0), eicosenoico (C20:1), behénico (C22:0) y lignocérico (C24:0).

La composición en ácidos grasos difiere de una muestra a otra dependiendo de la zona de producción del aceite de oliva. Los factores principales que afectan a la composición son: latitud, condiciones climáticas, variedad y grado de madurez de las aceitunas recogidas. Generalmente el ácido oleico, ácido graso monoinsaturado, representa una concentración mayor, del 68 al 81.5 %, que otros ácidos grasos como el linoleico, palmítico y esteárico.

En la **Figura 5** se presentan las estructuras químicas de los ácidos grasos mayoritarios de cada categoría (monoinsaturado, saturado y poliinsaturado) en el aceite de oliva.



**Figura 5.** Ácidos grasos mayoritarios en el aceite de oliva.

(a) Ácido oleico, ácido graso monoinsaturado mayoritario; (b) Ácido palmítico, ácido graso saturado mayoritario y (c) Ácido linoleico, ácido graso poliinsaturado mayoritario.

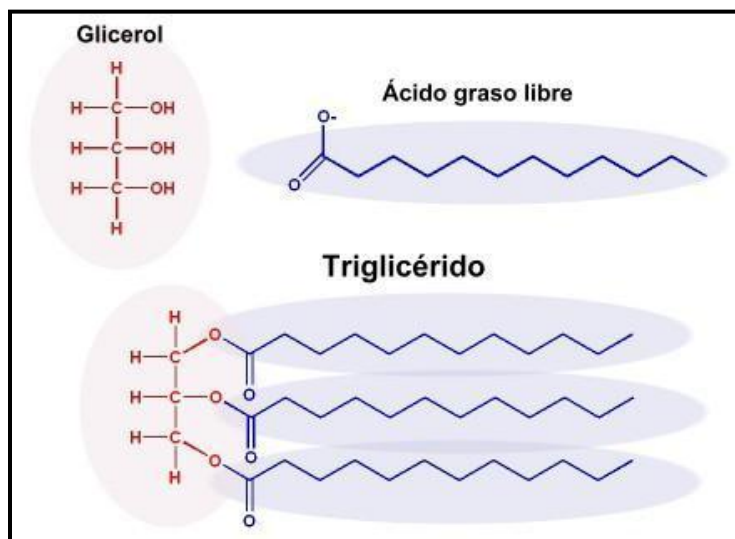
- Triglicéridos.

Son los componentes mayoritarios de la fracción saponificable. Son ésteres provenientes de la unión del glicerol (1,2,3-Propanotriol) con ácidos grasos (**Figura 6**), estos últimos pueden ser tres iguales con el mismo número de átomos de carbono, dos iguales y uno diferente, o bien los tres diferentes. En el aceite de oliva, la distribución de los ácidos grasos en las moléculas de triglicéridos muestra una asimetría en las posiciones 1, 2 y 3 del trialcohol. Los ácidos grasos en la posición central, o posición 2 de la molécula son insaturados, por ejemplo, el ácido linoléico resulta favorecido frente a los ácidos oleico y linoleico para ocupar esta posición.

Teóricamente, se pueden presentar más de 70 triglicéridos en el aceite de oliva, sin embargo, el número de triglicéridos que realmente lo componen es muy inferior, ya que hay algunas distribuciones de los ácidos grasos en las diferentes posiciones del glicerol nunca aparecen y otros lo hacen en cantidades despreciables. De esta manera los triglicéridos totalmente saturados como lo son PPP: Palmítico-Palmítico-Palmítico; EEE: Esteárico-Esteárico-Esteárico; PEP: Palmítico-Esteárico-Palmítico y EPE: Esteárico-Palmítico-Esteárico, nunca se encuentran en el aceite de oliva.

Aunque los triglicéridos del aceite de oliva muestran una asimetría en la distribución de los ácidos grasos, es posible encontrar una única molécula simétrica: la Trioleína OOO, formada por glicerol esterificado con tres moléculas de ácido oleico, que representa poco más de la mitad del

total de estos compuestos. En la **Tabla 1** se localizan los triglicéridos presentes en el aceite de oliva indicando su porcentaje correspondiente.



**Figura 6.** Representación esquemática de la formación de un triglicérido.

**Tabla 1.** Composición de triglicéridos en aceite de oliva.

Triglicérido	%
Oleico-Oleico-Oleico (OOO)	61.96
Palmítico-Oleico-Oleico (POO)	29.35
Oleico-Oleico-Linoleico (OOL)	4.05
Estéarico-Oleico-Oleico (SOO)	1.82
Palmítico-Oleico-Linoleico (POL)	1.17
Palmítico-Palmítico-Oleico/Palmítico-Linoleico-Esteárico (PPO/PLS)	1.02
Palmítico-Linoleico-Linoleico/Palmítico-Oleico-Linolénico (PLL/POLn)	0.20
Palmítico-Oleico-Esteárico (POS)	0.16
Oleico-Linoleico-Linoleico/Oleico-Oleico-Linolénico (OLL/OOLn)	0.14
Palmítico-Palmítico-Linoleico/Palmítico-Esteárico-Linolénico (PPL/PSLn)	0.05
Linoleico-Linoleico-Linoleico (LLL)	0.01
Palmítico-Palmítico-Palmitoleico (PPPo)	0.01

- Mono- y Di-gliceridos.

La presencia de mono- y di-glicéridos es debida en parte a una biosíntesis incompleta, pero principalmente a la hidrólisis del aceite; pueden encontrarse 1,2-diglicéridos provenientes de la síntesis incompleta de triglicéridos, así como 1,3-diglicéridos debido a la hidrólisis de los triglicéridos. Las condiciones de almacenamiento afectan la relación de estos dos tipos de

diglicéridos. Los 1,2-diglicéridos presentes en el aceite recién prensado tienden a isomerizarse a su forma más estable formando 1,3-diglicéridos, este reordenamiento provoca un cambio significativo en las cantidades relativas de ambos, lo que ayuda a establecer condiciones de almacenamiento y edad de los aceites. Cuando los diglicéridos están presentes en forma libre, el aceite de oliva es considerado de baja calidad y por ende, la determinación de dichos compuestos ha servido para evaluar su calidad, ya que ciertas relaciones de 1,2-diglicéridos y 1,3-diglicéridos se emplean para relacionar la acidez de aceites de oliva virgen extra o para diferenciar entre las distintas denominaciones de aceites (virgen, virgen extra, refinado, etc.)

### 2.3.3.2. Fracción minoritaria.

Aunque esta fracción representa sólo un pequeño porcentaje de toda la composición del aceite de oliva, incluye una gran variedad de compuestos químicos, tantos, que es extremadamente difícil determinar de manera precisa la totalidad de los compuestos minoritarios, debido a su naturaleza compleja y baja concentración. Además, algunos de estos constituyentes sólo es posible localizarlos en el aceite crudo, y el proceso de refinación los elimina, como es el caso de los compuestos fenólicos.

Las diversas clases de constituyentes menores pueden dividirse en dos grupos: **(1)** derivados de ácidos grasos y **(2)** compuestos no relacionados químicamente con ácidos grasos, los cuales se localizan en la **Figura 7**.



**Figura 7.** Clasificación de los constituyentes de la fracción minoritaria del aceite de oliva.

➤ Derivados de ácidos grasos.

• Fosfolípidos.

Los principales fosfolípidos son: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilserina. El ácido oleico es el ácido graso predominante en la estructura de los fosfolípidos y presenta una tendencia similar a la de los triglicéridos (**Figura 8**). El aceite de oliva recién producido puede contener cantidades pequeñas de fosfolípidos, entre 40 y 135 mg/kg.

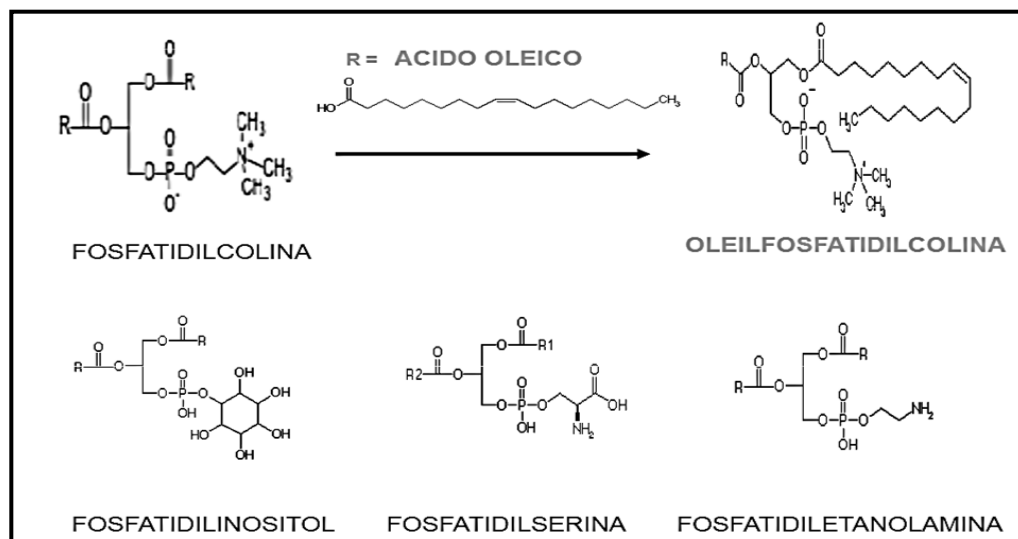


Figura 8. Estructura química de los principales fosfolípidos presentes en el aceite de oliva [2].

• Ceras.

Las ceras se producen mediante una esterificación entre alcoholes presentes en el aceite y ácidos grasos libres. Cuando se produce una hidrólisis de los triglicéridos se aumenta el contenido de ácidos grasos libres, originándose un aumento en la velocidad de reacción de esterificación. Las principales ceras de los aceites de oliva son de número de carbono par, es decir, ésteres C-36 a C-46 y la cantidad máxima que puede estar presente en el aceite de oliva virgen extra es de 250 mg/kg.

• Ésteres de esteroides.

Los esteroides pueden estar presentes de forma libre o esterificada. Aproximadamente, el 10-15 % de los esteroides totales están presentes como esteril ésteres. La esterificación de los esteroides se produce entre los grupos hidroxilos que tienen con ácidos grasos libres.

➤ Compuestos no relacionados con ácidos grasos.

- Hidrocarburos.

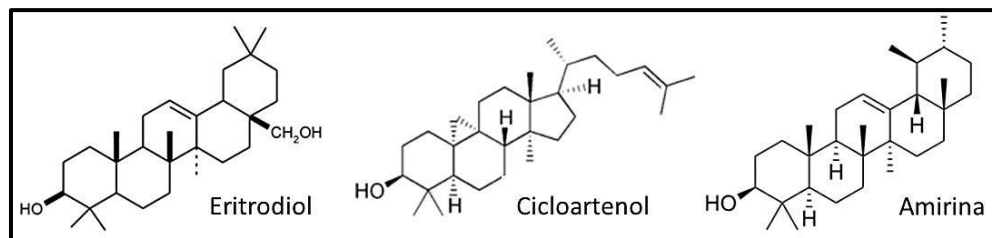
La naturaleza de los hidrocarburos presentes en el aceite puede ser muy variada, estos pueden ser terpénicos, esteroideos o policíclicos aromáticos. Dentro de los primeros se han encontrado cantidades considerables de escualeno y  $\beta$ -caroteno. Por su parte los hidrocarburos esteroideos no se encuentran de forma natural ya que aparecen en los procesos de refinado, al que no es sometido el aceite de oliva virgen. Los hidrocarburos policíclicos aromáticos presentes en el aceite entre otros son: naftaleno, fenantreno, fluorantreno, 1,2-benzoantraceno, criseno y perileno, estos se encuentran en cantidades muy pequeñas desde 1 hasta 700  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

- Alcoholes alifáticos.

Son compuestos de estructura lineal, según el número de átomos de carbono pueden ser monoconasol (C-21), diconasol (C-22), triconasol (C-23), tetraconasol (C-24), pentaconasol (C-25), hexaconasol (C-26), heptaconasol (C-27) y octaconasol (C-28). Estos compuestos son precursores de la formación de ceras, así, un alto contenido de alcoholes puede traer como consecuencia que el contenido en ceras aumente con el tiempo. El contenido total de este grupo de compuestos está en torno a 200  $\text{mg}/\text{kg}$  de aceite.

- Alcoholes triterpénicos.

Son también denominados 4,4-dimetilesteroles. Los principales alcoholes triterpénicos en el aceite de oliva son:  $\beta$ -amirina, cicloartenol y eritrodiool (**Figura 9**). Éste último tiene la característica de presentar actividad antioxidante y antiinflamatoria, su concentración puede variar de 1000 a 1500  $\text{mg}/\text{kg}$  de aceite.



**Figura 9.** Estructura química de alcoholes triterpénicos en aceite de oliva.

- Esteroles.

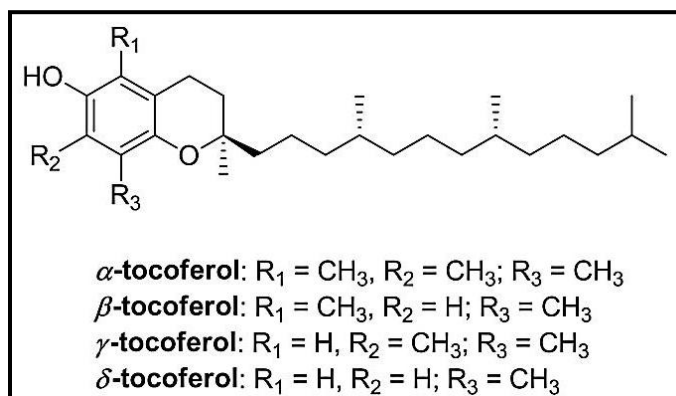
Los esteroles comprenden un amplio grupo de compuestos que presentan una estructura molecular análoga, que deriva del ciclopentanoperhidrofenantreno. Pueden estar presentes en su forma libre o esterificada con ácido grasos. La diferencia entre los diversos esteroles está en el número y posición de los dobles enlaces y en la naturaleza de la cadena lateral. Los



principales esteroides del aceite de oliva son:  $\beta$ -sitosterol,  $\delta$ -5-avenasterol y campesterol. Se establecen valores comprendidos entre 1130 a 2650 mg/kg de aceite.

- Tocoferoles.

También clasificados como fenoles lipofílicos, con compuestos heteroácidos de alto peso molecular. Se conocen 8 compuestos en la serie de tocoferoles que se producen en la naturaleza, derivados del 6-cromanol. Se han identificado varios tocoferoles aislados designados como  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -tocoferol; todos poseen un núcleo de cromanol sustituido con grupos fenólicos y metilos y una cadena lateral saturada de 16 átomos de carbono con tres esqueletos de isopreno, véase **Figura 10**. En el aceite de oliva se encuentran presentes únicamente en forma libre (sin esterificar). El  $\alpha$ -tocoferol representa aproximadamente del 90 a 95 % de los tocoferoles totales, las formas  $\beta$  y  $\gamma$  se encuentran por debajo del 10 % y la forma  $\delta$  en proporciones prácticamente despreciables. Se caracterizan por tener propiedades antioxidantes y su concentración varía entre 70 a 300 mg/kg de aceite.



**Figura 10.** Estructura químicas de los tocoferoles presentes en aceite de oliva.

- Pigmentos.

El color del aceite de oliva es considerado un parámetro importante a evaluar para conocer su calidad. Puede variar desde el verde (oscuro o claro) al dorado o amarillo. Este color es debido al contenido de pigmentos presentes en el aceite y depende en gran medida del grado de maduración del fruto. Los pigmentos pueden dividirse en dos grupos:

(1) Clorofilas y feofitinas son las responsables del color verde de los aceites. Las estructuras moleculares de la clorofila y feofitina contienen cuatro grupos pirrólicos con un átomo de magnesio, en el caso de la clorofila y dos átomos de hidrógeno en el caso de la feofitina; éstas pueden ser *a* o *b*, la diferencia entre ellas consiste en que la *a* posee un grupo metilo en el carbono número 3, mientras que la *b* un grupo formilo (**Figura 11**). Su contenido varía entre 1 y 20 mg/kg predominando la feofitina *a*, la cual representa del 70 al 80 % del total de los pigmentos, y además si el aceite se extrae de aceitunas negras, es el único pigmento de esta clase.

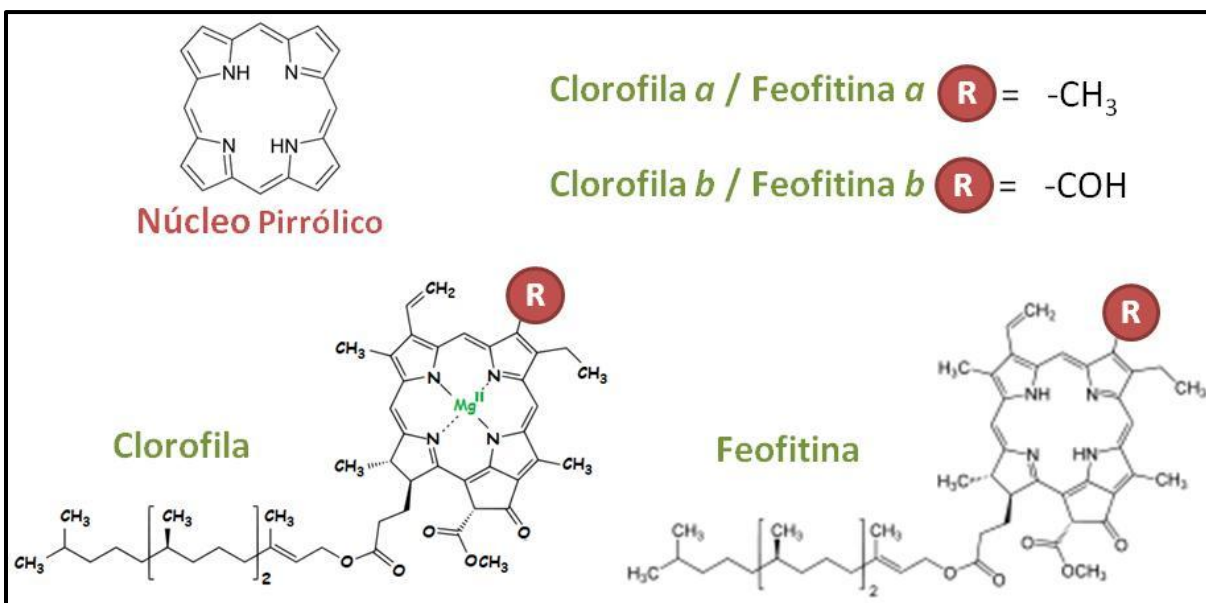


Figura 11. Estructura química de los pigmentos presentes en el aceite de oliva.

(2) Carotenoides, son los responsables del color amarillo estando presentes la luteína, el  $\beta$ -cateroteno, vialaxantina y neoxantina. Químicamente se clasifican como terpenoides y se consideran biosintéticamente como derivados del ácido mevalónico, metabolito intermediario que aporta la unidad básica estructural. Su estructura química comprende 8 unidades de isopreno, de tal forma que la unción de cada unidad se invierte en el centro de la molécula, véase **Figura 12**. El contenido de este tipo de pigmentos en el aceite varía de 1 a 20 mg/kg, siendo el mayoritario la luteína.

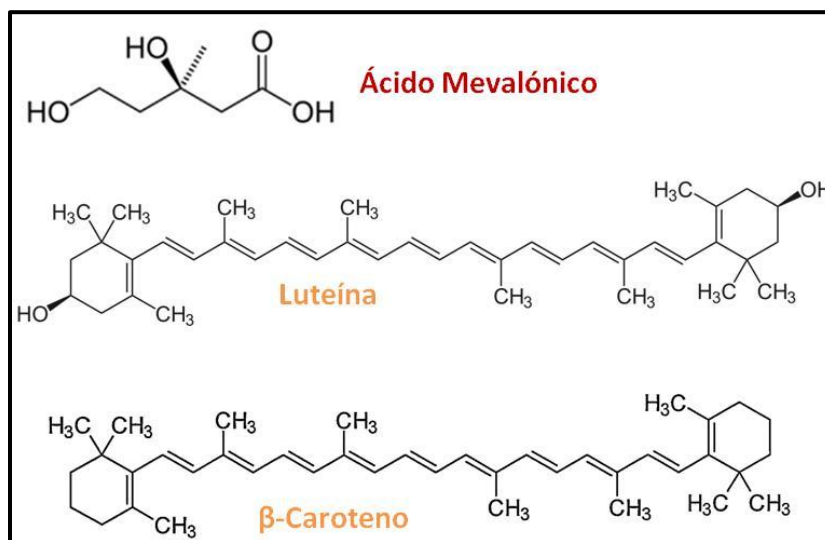


Figura 12. Estructura química de los pigmentos carotenoides presentes en el aceite de oliva.

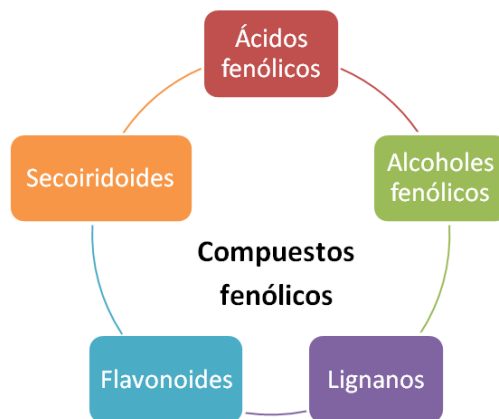
### 2.3.3.2.1. Compuestos fenólicos

La fracción fenólica consiste en una mezcla heterogénea de componentes en donde se engloba a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol, nombre popular del hidroxibenceno, unidas a estructuras aromáticas o alifáticas [19], estos se localizan en el mesocarpio (pulpa) de la aceituna y no se encuentran presentes en ningún otro aceite vegetal; se presentan en concentraciones entre 20 y 50 g/kg de pulpa, sin embargo, los aceites contienen concentraciones mucho menores debido a la naturaleza hidrofílica de los polifenoles, ya que estos tienden a perderse en la fase acuosa en el paso de extracción durante la elaboración del aceite [20]. Son considerados como una parte importante del sistema químico de defensa del fruto y se les atribuyen funciones diversas, entre las que podemos destacar actividad antimicrobiana y propiedades antioxidantes.

La presencia de los polifenoles en el aceite obtenido afecta su estabilidad frente a la oxidación, su sabor y aroma, asimismo se consideran como los principales responsables de las propiedades antioxidantes del aceite de oliva virgen extra y se han relacionado con la astringencia y el sabor amargo característico de los mismos. Los márgenes fijados para la concentración de compuestos fenólicos en aceites de oliva van desde 200 hasta 1500 mg/kg [2], siendo tan amplio debido al gran número de factores que afectan su contenido como son:

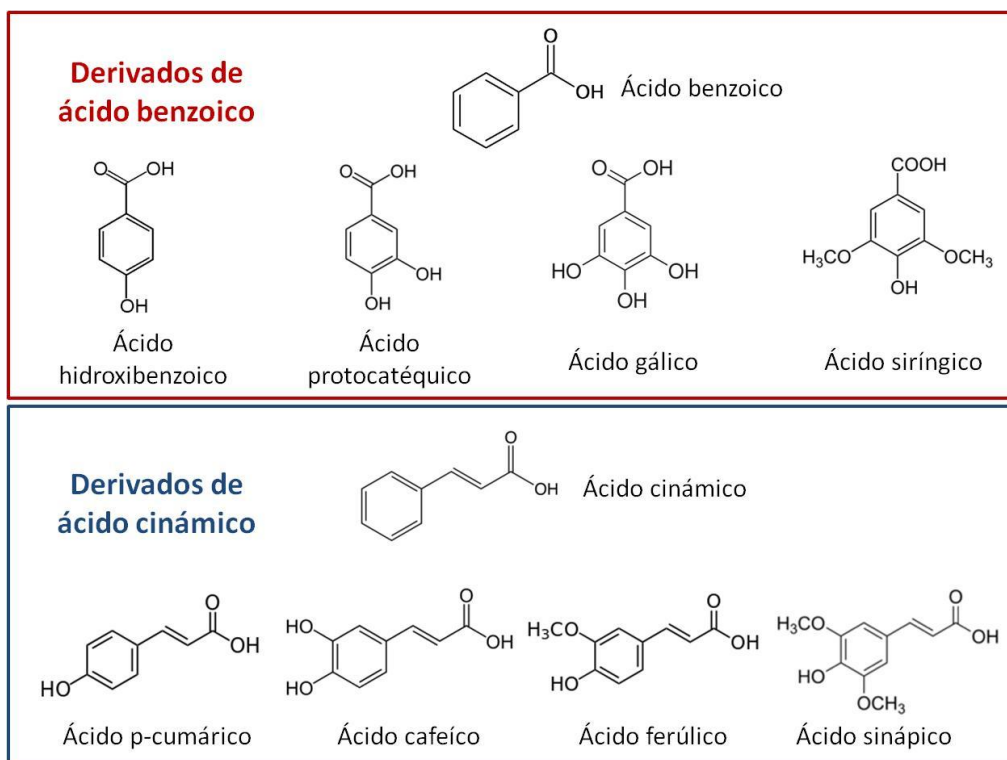
- La maduración del fruto.
- El sistema de extracción empleado.
- Variables que intervienen en el proceso de extracción en el molino: diferencias en la maquinaria de molienda, tiempos de contacto del aceite con el agua en proceso de extracción, volumen de agua empleado, etc.
- Proceso de filtración.
- Variables climatológicas y agronómicas del cultivo.
- Variedad de aceituna.

El tipo de polifenoles presentes en el aceite de oliva se resumen en la **Figura 13**.



**Figura 13.** Compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva.

**Ácidos fenólicos.** Son metabolitos secundarios que se encuentran presentes en pequeñas cantidades, alrededor de 1 mg de analito/kg de aceite. De acuerdo a su estructura química se subdividen en dos grupos: (1) Derivados de ácido benzoico con una estructura química básica C6-C1 y (2) Derivados de ácido cinámico con una estructura base C6-C3 (**Figura 14**). Estos compuestos se han asociado con las cualidades sensoriales y organolépticas (sabor, astringencia y dureza), así como las propiedades antioxidantes.



**Figura 14.** Ácidos fenólicos presentes en el aceite de oliva.

**Alcoholes fenólicos.** Los alcoholes fenólicos presentes en el aceite de oliva son el tirosol [(p-hidroxifenil)etanol] e hidroxitirosol [(3,4-dihidroxifenil)etanol], véase **Figura 15A**.

**Secoiridoides.** Los secoiridoides se caracterizan por la presencia en su estructura química de ácido elenólico o sus derivados; están formados por un fenil etil alcohol (hidroxitirosol y tirosol), ácido elenólico y en ocasiones por un residuo glucosídico. Están presentes en cantidades de 27 a 32 mg/kg de aceite. La oleuropeína es el principal compuesto de esta familia presente en el aceite de oliva, químicamente es un éster del ácido elenólico con hidroxitirosol y es responsable del sabor amargo de las aceitunas inmaduras. Otro secoiridoide que se puede encontrar en el aceite de oliva es el ligustrósido, el cual tiene una estructura parecida a la oleuropeína pero con tirosol en lugar de hidroxitirosol (**Figura 15B**).

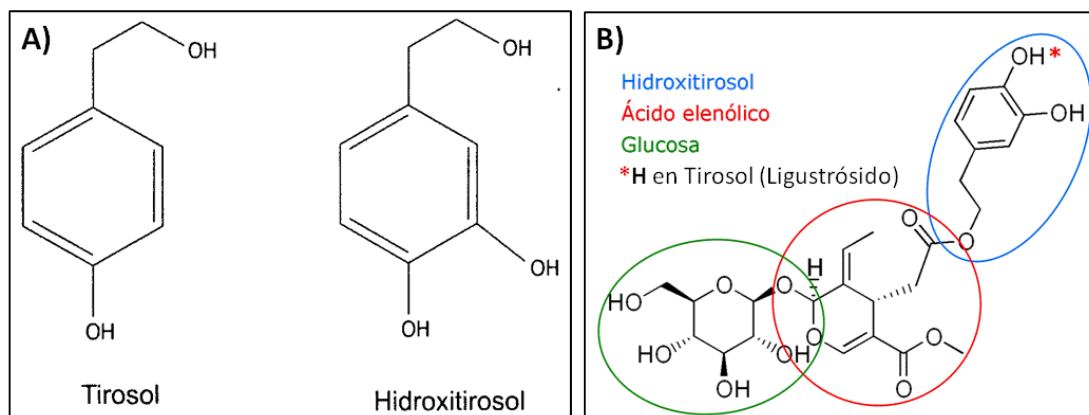


Figura 15. A) Alcoholes fenólicos y B) Secoiridoides presentes en el aceite de oliva.

**Lignanos.** Desde el año 2000 se ha descrito la presencia de (+)-1-Pinoresinol y (+)-1-Acetoxipinoresinol dentro de la fracción fenólica de los lignanos en diversas muestras de aceite de oliva [21-23]. Se pueden encontrar alrededor de 100 mg/kg de aceite.

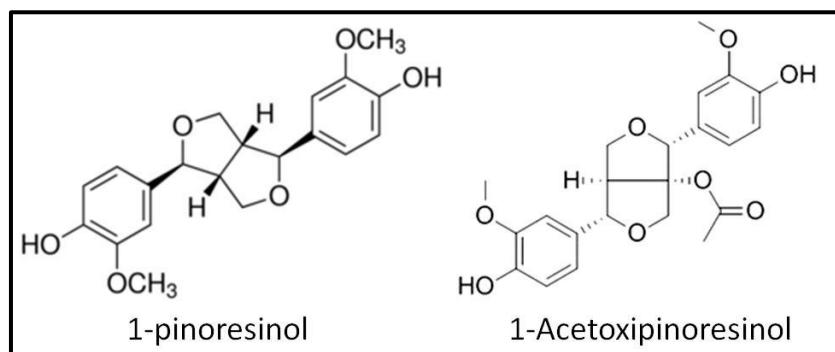
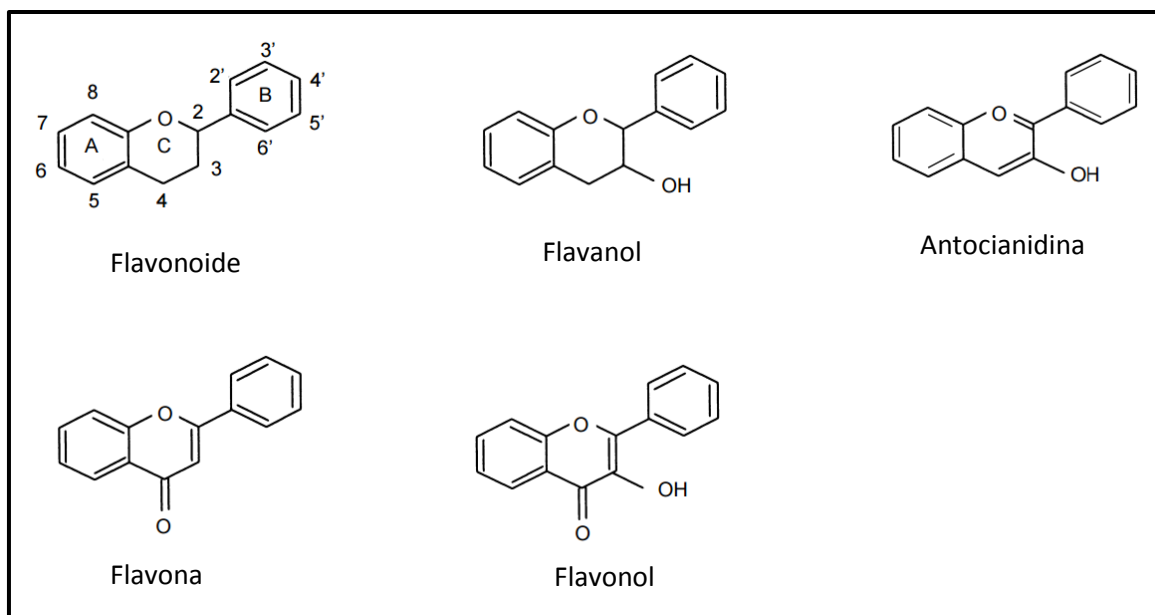


Figura 16. Lignanos presentes en el aceite de oliva.

**Flavonoides.** Son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), véase **Figura 17**. Están constituidos por dos anillos de fenilo (A y B) ligados a través de un anillo de pirano (C).

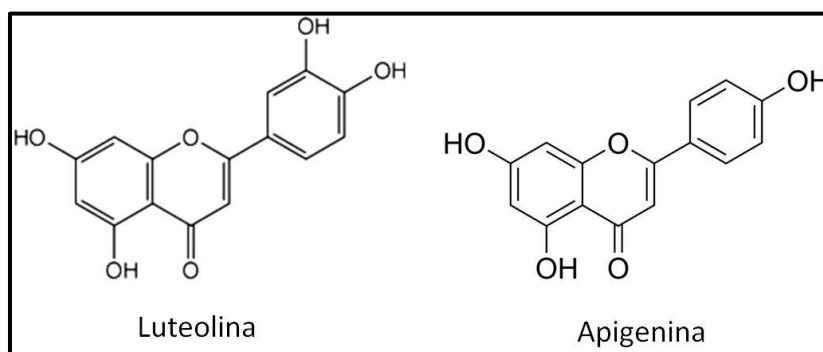
En función de sus características estructurales se pueden clasificar en [24]:

- 1) Flavanoles, con un grupo –OH en posición 3 del anillo C.
- 2) Flavonoles, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo –OH en posición 3 del anillo C.
- 3) Flavonas, con un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carece un grupo hidroxilo en la posición 3 del mismo anillo.
- 4) Antocianidinas, que tienen unido el grupo –OH en posición 3 y además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.



**Figura 17.** Estructura básica y tipos de flavonoides [24].

Dentro de las flavonas, en el aceite de oliva se encuentran la apigenina y luteolina cuyas estructuras químicas se localizan en la **Figura 18**.



**Figura 18.** Estructura de flavonas presentes en el aceite de oliva.

### 2.3.3.3. Compuestos volátiles y aromáticos.

El particular aroma del aceite de oliva, el cual lo distingue entre los diferentes aceites alimenticios, es debido a la gran cantidad de compuestos aromáticos de diversa naturaleza que posee. Estos se producen por acción de enzimas que actúan durante el aplastamiento de la aceituna y se incorporan a la fase oleosa; la enzima lipoxigenasa da origen a aldehídos, mientras que la enzima alcohol deshidrogenasa da lugar a alcoholes.

Hay diferencias cuantitativas entre los componentes volátiles de las diferentes variedades de aceitunas, ya que estas diferencias están en función de diferentes factores como el grado de maduración y el proceso de extracción. Así, el nivel de compuestos volátiles disminuye en el transcurso de maduración del fruto. Algunos de los compuestos volátiles presentes en el aceite de oliva virgen extra se contienen en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Compuestos volátiles que pueden encontrarse en el aceite de oliva [2].

Alcoholes	Cetonas	Aldehídos	Ácidos	Ésteres
Etanol	Acetona	Acetaldehído	Ácido acético	Etilacetato
Butanol	Pectan-3-ona	Butan-1-al	Ácido propanóico	Etil propianato
2-metilpropan-1-ol	Hexan-2-ona	2-metilbutan-1-ol	Ácido butanóico	Metil butanato
Pentan-1-ol	1-octen-3-ona	Pental-1-al	Ácido hexanóico	Etil butanoato
Hexan- 1-ol	Nonan-2-ona	Trans-pental-1-al		Metil hexanoato
Trans-2-hexen-1-ol		Heptan-1-al		Hexil acetato
Cis-3-hexen-1-ol		Octan-1-al		Octil acetato
Heptan-1-ol		Decan-1-al		Etil decanoato
Octen-1-ol		Trans-2-decen-1-al		
Nonan-1-ol		Benzaldehído		
		Fenilacetaldehído		

#### 2.3.4. El aceite de oliva en la dieta y salud humana.

La dieta mediterránea es rica en verduras, cereales, frutas, pescado, leche, vino y aceite de oliva; el consumo de estos alimentos ha sido relacionado con funciones biológicas benéficas. Estudios han demostrado una menor incidencia de arterosclerosis, enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer en la zona Mediterránea [25]. El consumo de aceite de oliva provee la principal fuente de grasa en esta dieta, y sus efectos saludables pueden atribuirse no sólo a la elevada relación entre ácidos grasos insaturados/ácido grasos saturados, sino también a las propiedades antioxidantes de algunos de sus componentes, los cuales se muestran en la **Tabla 3**, especialmente los compuestos fenólicos, estos últimos son muy susceptibles a ser oxidados y al mismo tiempo impiden que los metales catalicen reacciones de oxidación actuando como quelantes y formando complejos con metales di- o tri-valentes, hierro o aluminio.

Tabla 3. Componentes antioxidantes presentes en el aceite de oliva.

Componente	Cantidad o proporción	Función
<b>Hidrocarburos terpénicos:</b>		
β-carotenos	1-20 mg/kg aceite	Provitamina antioxidante A
Licopeno	Trazas	Antioxidante
<b>Alcoholes triterpénicos:</b>		
Eritrodiol	1000-1500 mg/kg aceite	Antioxidante y antiinflamatorio
<b>Compuestos fenólicos</b>	200-1500 mg/kg aceite	Antioxidante y antiinflamatorio Propiedades organolépticas
<b>Tocoferoles:</b>	70-300 mg/kg aceite	Vitamina E
α-tocoferol	90-95 %	Actividad antioxidante
β-γ-tocoferol	≤ 10 %	α < β < γ < δ
δ-tocoferol	Trazas	

Actualmente, hay un creciente interés hacia los compuestos fenólicos debido a su capacidad antioxidante, tanto captadores de radicales libres como quelantes de metales. Estas propiedades antioxidantes son el motivo de sus posibles alcances en la salud humana, como la prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares o enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. También se les ha relacionado con actividad estrogénica (isoflavonas y lignanos) y propiedades antimicrobianas, véase **Tabla 4** [19, 25-27].

#### 2.3.4.1. Capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos.

Las Especies Reactivas de Oxígeno (*ROS*, del inglés *Reactive Oxygen Species*), que son continuamente formadas en un organismo vivo debido a procesos metabólicos aerobios, pueden oxidar y dañar macromoléculas celulares guiando posiblemente al desarrollo de enfermedades degenerativas como arterosclerosis, Alzheimer, Parkinson, cáncer, diabetes, artritis reumatoide y enfermedades inflamatorias [25]. No obstante, el organismo posee sus propios mecanismos de defensa para hacer frente a la acción de las especies oxidantes, pero en determinadas situaciones las defensas antioxidantes pueden verse superadas por la excesiva generación de radicales libres procedentes del oxígeno [28]. Este desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes se conoce como estrés oxidativo, el cual es asociado al desarrollo de enfermedades mencionadas anteriormente y al proceso normal de envejecimiento [29]. El consumo de antioxidantes exógenos en la dieta (como es el caso de los polifenoles en el aceite de oliva) es importante ya que incrementa la cantidad de agentes antioxidantes presentes en el organismo, protegiendo contra diversas enfermedades.

El principal mecanismo de acción como antioxidante de los polifenoles se relaciona con su habilidad para capturar radicales, a través de la interrupción de una cadena de reacciones desencadenada por los radicales libres. Las propiedades antioxidantes de los *o*-difenoles se



relacionan con su capacidad para formar puentes de hidrógeno intramoleculares entre el grupo hidroxilo y los radicales fenólicos. Estudios han demostrado que el grado de capacidad antioxidante de flavonoides está relacionado con el número de grupos hidroxilo; de esta manera, el número de grupos –OH y su posición en el anillo aromático influyen directamente sobre la capacidad antioxidante de los polifenoles [25].

La actividad antioxidante de compuestos fenólicos, en especial la oleuropeína y su subproducto hidroxitirosol, ha sido estudiada desde hace dos décadas a través de diferentes modelos: empleando metales de transición, la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la formación de ROS como radicales superóxido [30-32]. Una estimación de la actividad antioxidante con base en su capacidad para inhibir formación de peróxido, ha demostrado que el hidroxitirosol y los ácidos cafeico y protocatéquico tienen una mayor actividad [33].

**Tabla 4.** Propiedades biológicas de los polifenoles del aceite de oliva [25].

Compuesto fenólico	Mecanismo de acción	Efecto benéfico en la salud humana
Oleuropeína, hidroxitirosol, ácidos cafeico y protocatéquico	Inhibición de la oxidación de LDL; inhibición de HMG-CoA reductasa; inhibición de tromboxano B <sub>2</sub> y como consecuencia la agregación de plaquetas	Prevención de enfermedades cardiovasculares
Secoiridoides (hidroxitirosol y tirosol) y lignanos	Acción inhibitoria sobre la actividad de xantina oxidasa y reducción de la formación de superóxido; los lignanos actúan como anti-estrógenos e incrementan la globulina fijadora de hormonas sexuales	Prevención de enfermedades tumorales
Hidroxitirosol y otros polifenoles	Acción inhibitoria sobre ciclo-oxigenasa y lipo-oxigenasa; reduce la formación de moléculas pro-inflamatorias como tromboxano B <sub>2</sub> y leucotrieno B <sub>4</sub> .	Actividad anti-inflamatoria
Oleuropeína (hidroxitirosol y tirosol)	Inhibición de crecimiento de virus y bacterias	Actividad antimicrobiana y antiviral

HMG-CoA: 3-Hidroxi-3-metilglutaril-coenzimaA

## 2.4. Métodos de extracción de compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos se localizan no sólo en el aceite de oliva, sino en gran variedad de alimentos como frutas y verduras, entre los que podemos destacar: uvas, semillas de chía, té, romero, orégano, savia, así como en vinos [34]. La búsqueda de formas eficientes de extracción

de la fracción fenólica de diversas matrices de alimentos ha sido ampliamente estudiada, debido al creciente interés por la determinación de la capacidad antioxidante de los alimentos [35-38].

El método de extracción se considera uno de los pasos más importantes para el tratamiento de la muestra, ya que influye directamente en la determinación cuantitativa del extracto; éste consiste típicamente en un proceso de separación en donde el analito (compuesto fenólico) es distribuido entre dos fases inmiscibles, generalmente una fase acuosa y orgánica. El procedimiento descrito anteriormente se conoce como Extracción Líquido-Líquido (*LLE*) y debe desarrollarse con un disolvente adecuado y bajo condiciones analíticas ideales de temperatura y pH, con la finalidad de eliminar o reducir cualquier posible interferente presente en la matriz [39], el esquema general de una separación a través de esta metodología se ejemplifica en la **Figura 19**.

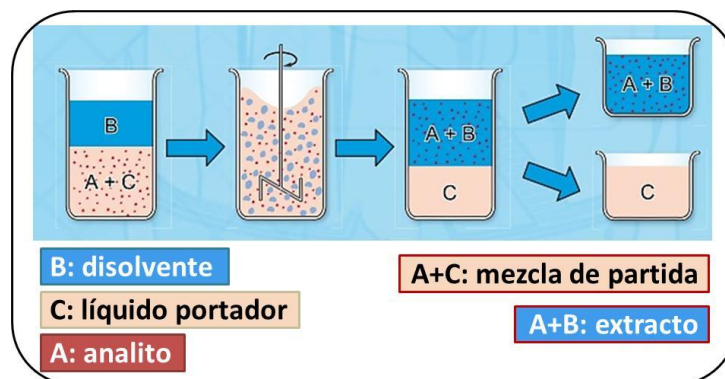
Considerando la estructura química de los compuestos fenólicos y la presencia de múltiples grupos hidroxilo que le otorgan cambios en su polaridad, resulta difícil optimizar un sólo método de extracción para estos compuestos; además hay que considerar la reducción de costos y tiempo de tratamiento. Por esta razón, nuevas técnicas de extracción se han desarrollado como alternativas para reducir considerablemente el uso de disolventes y acelerar el proceso de extracción. Estas técnicas modernas incluyen: Extracción en Fase Sólida (*SPE*), Extracción con Fluidos Supercríticos (*SFE*), Extracción con Líquidos Presurizados (*PLE*), Extracción asistida por microondas (*MAE*), Extracción Asistida por Ultrasonido (*UAE*) y Microextracción en Fase Líquida (*LPME*) [40].

Actualmente es posible consultar trabajos donde se compara la eficiencia de diversos métodos de extracción de compuestos fenólicos en aceite de oliva [34], sobre todo *LLE* y *SPE*, encontrando discrepancia entre los resultados cuantitativos de la fracción fenólica al aplicar cada uno de ellos.

#### 2.4.1. Extracción Líquido-Líquido (*LLE*).

La extracción líquido-líquido (*LLE*, *Liquid-Liquid Extraction*, en inglés), es el método analítico oficial actual para la extracción de la fracción fenólica de aceite de oliva, adoptado por el Consejo Oleícola Internacional (COI) [14]; consiste en el empleo de una mezcla metanol/agua 80:20 v:v que se pone en contacto con el aceite de oliva, enseguida se realiza una agitación vigorosa empleando un vórtex y un baño de ultrasonido, después del proceso de centrifugación ambas fases son separadas debido a diferencias de densidad, obteniéndose el extracto. Metodologías similares se han reportado en diversos trabajos [41,42] con pequeñas diferencias como la proporción metanol/agua (V:V), la adición de disolventes orgánicos como n-hexano, así como un mayor número de pasos de extracción. Todas estas metodologías tienen en común el empleo de grandes cantidades de disolventes que pueden ser contaminantes y peligrosos para

la salud debido a la generación de residuos, además el requerimiento de diversos pasos durante el desarrollo de la extracción se traduce en un mayor tiempo de análisis por muestra, guiando a posibles degradaciones causadas principalmente por factores externos como la luz, el aire y la temperatura, además un mayor número de pasos de extracción puede guiar a la pérdida del analito o posibles contaminaciones. Estas desventajas son las principales causas por las que se ha buscado el desarrollo de metodologías alternativas, sin embargo, *LLE* sigue siendo el método más empleado debido a su facilidad y costos en comparación con técnicas modernas.



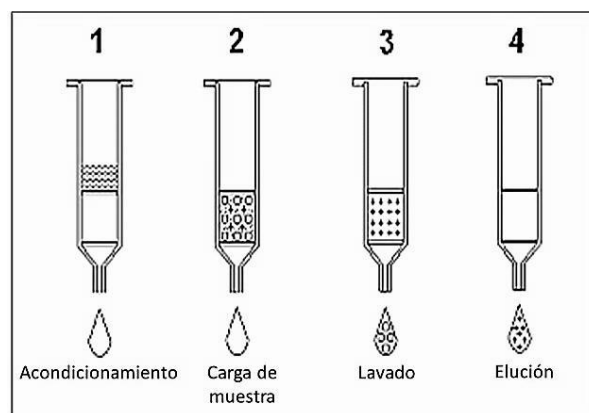
**Figura 19.** Esquema general del proceso de extracción líquido-líquido.

#### 2.4.2. Extracción en Fase Sólida (*SPE*).

La extracción en fase sólida (*SPE*, *Solid Phase Extraction*, en inglés), ha cobrado cada vez mayor importancia, consiste en poner en contacto una muestra líquida, gaseosa o extractos líquidos procedentes de muestras sólidas, con una fase sólida sobre la que el analito de interés es adsorbido selectivamente. De esta manera el principio de separación es debido a la diferente afinidad que presentan los analitos contenidos en la muestra por la fase sólida o bien por el disolvente que los contiene [43]. En otras palabras, al hacer pasar la muestra por una fase sólida (polar, apolar, intercambio iónico, etc.) algunos compuestos quedarán retenidos sobre la superficie, mientras que otros pasarán inalterados. Posteriormente, los analitos retenidos podrán ser eluidos con un pequeño volumen de disolvente [44], en la **Figura 20** se ejemplifican los cuatro pasos que comprenden una extracción en fase sólida.

Se encuentran disponibles una gran variedad de fases sólidas con diferentes tamaños y adsorbentes por lo que es necesario seleccionar la adecuada para cada muestra. La determinación de compuestos fenólicos en uvas o vinos tiene buenos resultados empleando un polímero de estireno-divinilbenceno [45]. En el caso particular de muestras de aceite de oliva se ha encontrado que las fases  $C_{18}$  son menos adecuadas para extraer los componentes polares de la matriz no polar [46]. Empleando este método pueden resolverse algunos inconvenientes que se presentan al realizar *LLE*, como por ejemplo el empleo de grandes cantidades de solventes

orgánicos o una incompleta separación de fases; sin embargo, hay que tener presente que el equipo requerido para SPE es más costoso en comparación con LLE.



**Figura 20.** Procedimiento para extracción en fase sólida.

### 2.4.3. Microextracción en Fase Líquida (LPME).

La búsqueda de nuevas metodologías de extracción más rápidas y efectivas, con una reducción de costos, no sólo económicos sino también ambientales, ha llevado a la aplicación de la microtecnología y al desarrollo de técnicas conocidas como microextracción en fase líquida (LPME, *Liquid Phase Microextraction*, en inglés), la cual puede definirse como una técnica de preparación de muestras empleando volúmenes de disolvente en el orden de  $\mu\text{L}$  para la extracción del analito [47].

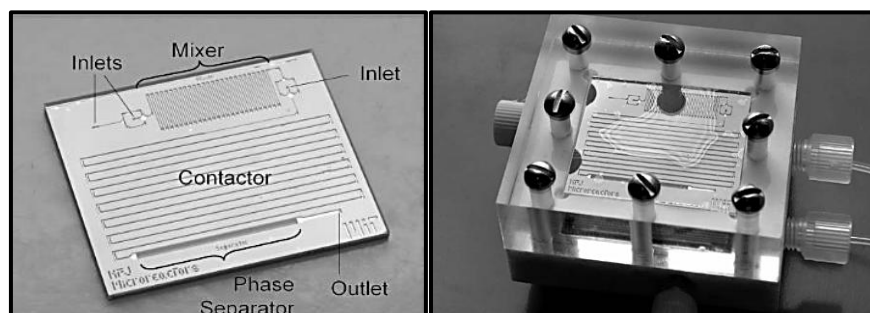
Dentro de las tendencias e innovaciones en LPME se encuentran algunas modalidades con características particulares como [48,49]:

- ♦ Microextracción con Gota Suspendida (*Single-Drop Microextraction*, por sus siglas en inglés, *SDME*): esta modalidad es reconocida por su reducción significativa de disolvente, ya que es necesario formar sólo una pequeña gota (con volumen en el orden de nanolitros a microlitros) de disolvente orgánico inmisible con el agua que se pone en contacto con la muestra. Los analitos migrarán desde la muestra hacia el aceptor orgánico en función de su polaridad y afinidad [50].
- ♦ Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*, por sus siglas en inglés, *DLLME*): se basa en un sistema ternario de disolventes, en donde con la ayuda de un disolvente dispersante pequeñas gotas de disolvente extractante entran en contacto con la muestra; el disolvente dispersante debe ser completamente miscible con la muestra y el extractante, por su parte la fase extractante debe ser miscible con el disolvente dispersante, pero insoluble con la muestra y con una densidad

mayor. El equilibrio de extracción se consigue rápidamente debido a la extensa superficie de contacto entre las gotitas de disolvente extractante y la muestra [51-53].

Las metodologías *LPME* pueden ser adaptadas a dispositivos de microfluídica, para ello se requiere del diseño y construcción de canales adecuados para realizar la extracción líquido-líquido continua; se han reportado el uso de: micromezcladores con el fin de favorecer la extracción, así como la aplicación de microextractores tubulares o membranas selectivas para una separación de fases [54,55]; los trabajos de extracción haciendo uso de microdispositivos son diversos [50-52,54-57]. Una vez obtenido el extracto de la fracción fenólica su análisis se realiza por métodos de separación [58] como cromatografía de líquidos de alta resolución (*CLAR*) [59,60], cromatografía de gases (*CG*) [61,62] o electroforesis capilar (*EC*) [63]. En la **Figura 21** se ejemplifica un microdispositivo de policarbonato fabricado para realizar una microextracción en flujo continuo con posterior separación de fases.

El uso de técnicas de microextracción tiene ciertas ventajas sobre los métodos de extracción líquido-líquido tradicionales, ya que reduce el número de errores que pueden ser cometidos al realizar un procedimiento multipasos, además, el impacto negativo al ambiente y salud se ve minimizado al disminuir la cantidad de disolventes orgánicos empleados durante el proceso de extracción, lo que se traduce en una menor generación de residuos y una disminución significativa de costos.



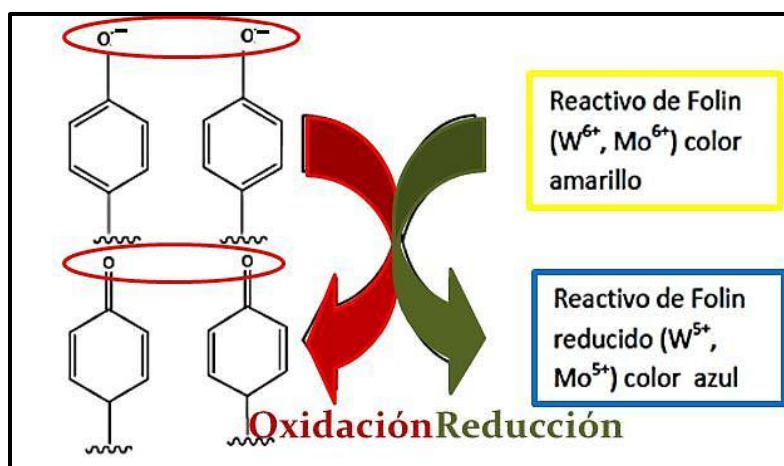
**Figura 21.** Dispositivo de policarbonato para realizar *LPME* [55].

## 2.5. Cuantificación de polifenoles: ensayo de Folin-Ciocalteu.

El método más empleado para la determinación de contenido total de compuestos fenólicos en matrices alimenticias es el ensayo de Folin-Ciocalteu; éste consiste en el uso de un reactivo color amarillo del mismo nombre, desarrollado por primera vez por Otto Folin y Vintila Ciocalteu en 1927 [64], que posee sales tungstato ( $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ ) y molibdato ( $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ) solubilizadas en medio ácido ( $HCl$  y  $H_3PO_4$ ). La naturaleza química del reactivo de Folin-Ciocalteu (reactivo F-C) no se ha elucidado por completo debido a su complejidad, pero se cree que se compone de heteropoli-fosfotungstatos/molibdatos en forma de complejos octaédricos

hidratados con los óxidos metálicos coordinados alrededor de un fosfato central ( $3H_2O \cdot 13WO_3 \cdot P_2O_5 \cdot 5MoO_3 \cdot 10H_2O$  y  $3H_2O \cdot 14WO_3 \cdot P_2O_5 \cdot 4MoO_3 \cdot 10H_2O$ ) [65], en donde el tungsteno y molibdeno presentan estado de oxidación 6+, siendo incoloro y amarillo respectivamente. La adición de polifenoles a pH básico ( $\approx 10$ ) proporciona la presencia de iones fenolato que, al entrar en contacto con el reactivo F-C, inician una secuencia de reacciones de transferencia de electrones llevando a la reducción del mismo a un estado de oxidación 5+, y generando especies color azul posiblemente de la forma  $(PMoW_{11}O_{40})^{4-}$  [66], ver **Figura 22**, que son detectables espectrofotométricamente a  $\lambda = 730$  nm.

La aplicación del ensayo de Folin-Ciocalteu suele ser simple y conveniente para la cuantificación de compuestos fenólicos totales, sin embargo presenta la desventaja de carecer de especificidad ya que el reactivo F-C es susceptible a ser reducido no sólo por todos los polifenoles, sino también por otros reductores como son el ácido ascórbico, azúcares (glucosa y fructuosa), aminas aromáticas, sales de hierro (II), ciertos aminoácidos, dióxido de azufre, entre otros [67]. Por lo que, al realizar este método es importante tener presente los posibles interferentes no-polifenólicos que pudiera contener la muestra, ya que no dar el tratamiento adecuado provocaría una sobreestimación en el valor real de compuestos fenólicos totales.



**Figura 22.** Mecanismo de acción del ensayo de Folin-Ciocalteu.

## 2.6. Detección óptica: espectrofotometría UV-Vis.

La espectrofotometría UV-Vis es una técnica analítica que permite determinar la concentración de analitos en solución. Se fundamenta en la absorción selectiva de la radiación electromagnética (UV cercano  $\lambda = 200-400$  nm y Vis  $\lambda = 400-800$  nm) de las moléculas, lo que ocasiona un salto desde un estado energético basal a un estado de mayor energía (estado excitado), de esta manera, sólo es absorbida la energía que permite la transición al estado excitado. Así, cuando un rayo de luz a una determinada longitud de onda de intensidad  $I_0$  incide

perpendicularmente sobre una disolución, se absorberá una parte de la radiación incidente y dejará pasar el resto ( $I$ ); la absorbancia ( $A$ ) será la respuesta obtenida y se define como la relación logarítmica entre la intensidad de la radiación que incide en la muestra y la intensidad emergente a una longitud de onda específica, **Ecuación 1** [68].

$$A^\lambda = \log \frac{I_0^\lambda}{I^\lambda} \quad (1)$$

$A$  = Absorbancia

$I_0$  = Intensidad de radiación incidente

$I$  = Intensidad de radiación emergente

$\lambda$  = Longitud de onda

A través de la ley de Lambert-Beer (**Ecuación 2**), la absorbancia medida es directamente relacionada con la concentración, en el caso particular de esta investigación, la absorbancia del complejo azul formado en el ensayo de Folin-Ciocalteu corresponde directamente a la concentración de polifenoles totales, expresada como miligramos equivalentes de ácido gálico, ácido tánico o ácido cafeico por masa o volumen de muestra. En el análisis de muestras de aceite de oliva las unidades típicas son miligramos equivalente de estándar por kilogramo de muestra (mgE/kg aceite).

$$A = l C \varepsilon \quad (2)$$

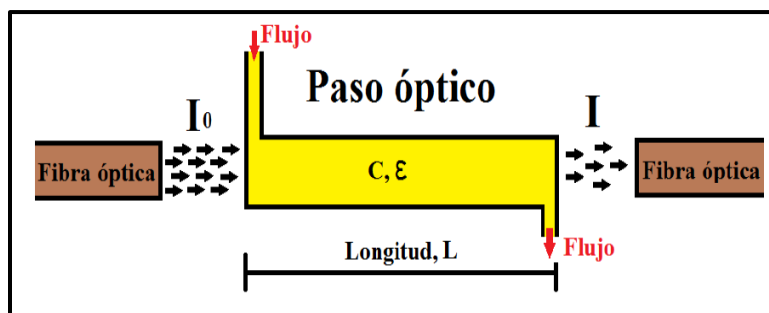
$A$  = Absorbancia

$l$  = Longitud de paso óptico (cm)

$C$  = Concentración de la disolución (mol/L)

$\varepsilon$  = Coeficiente de absorvidad molar (cm L/mol)

Cuando se trabaja en flujo continuo es común el uso de una celda de flujo para realizar la detección espectrofotométrica, éstas pueden ser de diversos materiales como teflón, plexiglás, poliéter étercetona (PEEK), etc. Su volumen puede ir desde 2 hasta 260  $\mu$ L con una longitud de paso óptico de 2.5 a 100 mm. La celda de flujo es conectada con fibras ópticas, las cuales son capaces de transportar la radiación electromagnética a grandes distancias con pérdidas muy pequeñas en su intensidad. La radiación procedente de la fuente debe acoplarse ópticamente a la fibra óptica así como la radiación emitida por la muestra debe acoplarse al detector [69]. La representación del funcionamiento de un sistema de detección de espectrometría UV-Vis en una celda de flujo se ejemplifica en la **Figura 23**.



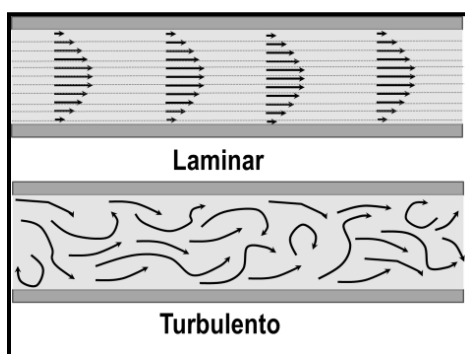
**Figura 23.** Esquema de una detección de espectrometría UV-Vis en una celda de flujo [70].

Al cruzar el paso óptico de longitud  $L$ , que contiene una concentración de analito  $C$ , con absorptividad molar  $\epsilon$ ,  $I_0$  es mayor que  $I$ .

## 2.7. Microfluídica: comportamiento del flujo a microescala.

La microfluídica es la ciencia y tecnología que utiliza sistemas miniaturizados con gran variedad de formas y funcionalidades para procesar y manipular cantidades pequeñas de fluidos, desde femtolitros ( $10^{-15}$  L) a microlitros ( $10^{-6}$  L), mediante canales cuyo tamaño está entre decenas y cientos de micras [71].

Un fluido es una sustancia que cambia su forma continuamente (fluye) siempre que esté sometida a un esfuerzo cortante, sin importar que tan pequeño sea [72]. Dentro de la definición anterior pueden englobarse líquidos y gases. El flujo laminar se define como un fluido que se mueve en forma de capas o laminas, donde una capa se desliza suavemente sobre otra que se encuentra adyacente con solo un intercambio molecular de cantidad de movimiento. El flujo turbulento, a diferencia, se desplaza de manera errática con un intercambio de movimiento violento (**Figura 24**).



**Figura 24.** Diferencia de orden entre el flujo laminar y flujo turbulento.

Es importante recalcar que la mecánica de los fluidos a microescala no es la misma que cuando se trabaja a macroescala. Las diferencias existentes son considerables y deben tenerse presentes cuando se emplean estos sistemas. Cuando un sistema es reducido en tamaño su



relación superficie/volumen aumenta, mejorando la transferencia de masa y dando como resultado el predominio de los efectos de superficie sobre los efectos volumétricos. Por lo tanto, al trabajar a longitudes microscópicas, los efectos de las fuerzas superficiales, como las fuerzas viscosas, fuerzas electrostáticas/electrodinámicas o las fuerzas de tensión superficial, que no son tan importantes a escala macroscópica, pueden jugar un papel decisivo en la regulación de las funcionalidades de los dispositivos de microfluídica [73].

Con la finalidad de tener un indicativo de las fuerzas relativas que actúan sobre un sistema particular, existen diferentes números adimensionales. Un ejemplo es el número de Reynolds ( $Re$ ), cuyo valor se refiere a la relación de las fuerzas de inercia y las fuerzas viscosas mostrando el comportamiento del flujo de un líquido dentro de los canales, véase **Ecuación 3**. Así, este valor nos indica si el flujo es laminar  $Re \leq 2000$  o turbulento  $Re \geq 4000$ . Para sistemas microfluídicos  $Re < 2000$ , situación en la que el flujo del líquido es considerado esencialmente laminar [74].

$$Re = \frac{D v \rho}{\mu} \quad (3)$$

$Re$  = Número de Reynolds

$D$  = Diámetro del conducto (m)

$v$  = Velocidad promedio del líquido (m/s)

$\rho$  = Densidad del fluido ( $\text{kg/m}^3$ )

$\mu$  = Viscosidad del líquido ( $\text{kg/m s}$ )

## 2.8. Dispositivos Lab-on-a-chip (LOC).

Durante las décadas pasadas, la demanda por la realización de mediciones continuas y con respuesta rápida empleando volúmenes y concentraciones de muestra pequeños ha sido el motor para la búsqueda de nuevas metodologías en diversas áreas de la química analítica [75,76]. Lo anterior condujo a la aparición de los *sistemas de análisis total* (*Total Analysis System*, *TAS* por sus siglas en inglés), donde se efectúan todas las etapas para tener un análisis químico completo en línea, éstas pueden incluir: pretratamiento de muestra, reacciones químicas, separaciones analíticas y detección del analito. Siguiendo la misma filosofía, en 1979, se presentó como un nuevo sistema de microfluídica integrado el primer cromatógrafo de gases miniaturizado a base de silicón [77,78], iniciando una “revolución en dispositivos de microfluídica” e impulsando la miniaturización de sistemas analíticos [79]. Así, Manz et al. [80] acuñó el término de *microsistemas de análisis total* ( $\mu$ TAS) a la fabricación de sistemas miniaturizados, hoy en día mejor conocidos como *Lab-on-a-chip* (*LOC*), es decir laboratorio en un solo microchip, cuyo desarrollo y aplicación ha crecido exponencialmente de manera interdisciplinaria en diversas áreas de la química (diagnósticos químicos [81,82], ácidos

nucleicos [83,84], proteínas [85,86], estudios celulares [87,88], e investigación en general [89,90]) y un gran número de aplicaciones han sido publicadas.

El objetivo de estos sistemas de análisis de microfluídica, es automatizar procesos estándar de laboratorio para conducir al análisis químico miniaturizado, con las ventajas de mayor número de análisis en función del tiempo, menor consumo de reactivos y muestra y baja generación de residuos, lo que conduce inevitablemente a una disminución de costos, además de brindar un laboratorio “portátil” [91].

Los componentes de una metodología *LOC* deben ser tales que permitan realizar funciones típicas de laboratorio como la preparación de muestra, la reacción entre la muestra y reactivos, procesos de separación y subsecuentemente la detección del analito de interés. Para implementar los procesos antes mencionados diferentes componentes con una función específica pueden ser incorporados en un sólo microchip; dichos componentes se clasifican en siete grupos principales: **(1,2)** inyector y transportador, **(3)** preparador, **(4)** mezclador, **(5)** reactor, **(6)** separador, **(7)** detector. En la **Figura 25** se ilustran los posibles componentes de un sistema *lab-on-a-chip* [92].

1. Inyector: los inyectores empleados ayudan a la entrada de la muestra y reactivos, estos deben asegurar la precisión de volúmenes en el orden de micro/nanolitros. Dentro de los más empleados se encuentran las bombas de jeringa y las pipetas electrónicas.
2. Transportador: hace referencia al control de la duración y dirección del flujo (caudal) y la secuencia de los fluidos. Estos pueden clasificarse como transportadores activos y pasivos, en los primeros es indispensable la aplicación de energía para actuar mientras que en los pasivos no es requerida. Dentro de los transportadores activos más empleados están las bombas peristálticas.
3. Preparador: su función es la de dar tratamiento previo y aislar el analito de interés de muestras heterogéneas para su posterior análisis, lo anterior con la finalidad de reducir la intervención humana y el tiempo. Los típicos pretratamientos son filtración, preconcentración, ruptura celular y derivatización.
4. Mezclador: debido al bajo número de Reynolds dentro de los microcanales de este tipo de dispositivos, es necesario la adición de un mezclador, el cual debe cumplir la función de generar “turbulencia” para un mejor y más rápido mezclado de los fluidos. Ya que sin la presencia de éste la difusión sería únicamente a través de flujo laminar. Dentro de los mezcladores pueden encontrarse el ultrasonido o bien el cambio de la velocidad del flujo por medio de la generación de remolinos y vórtices.
5. Reactor: en él se realiza, mantiene y controla la formación del producto químico, puede ser equipado con calentadores para un control térmico de la reacción. La longitud del microcanal del reactor es tan largo o corto según se requiera (velocidad de reacción) y suele tener forma de serpentín.

6. Separador: se emplean para tener un control selectivo del producto deseado (en el caso de que haya la formación de más de un producto) o la separación de fases después de los procesos de mezclado y reacción. Aquí pueden encontrarse el uso de membranas permeables o columnas cromatográficas.
7. Detector: consiste en la transducción de una señal física del analito a una señal eléctrica útil para el análisis. Existen muchos métodos de detección incluyendo ópticos, electroquímicos, espectrometría de masas, fluorescencia, etc.

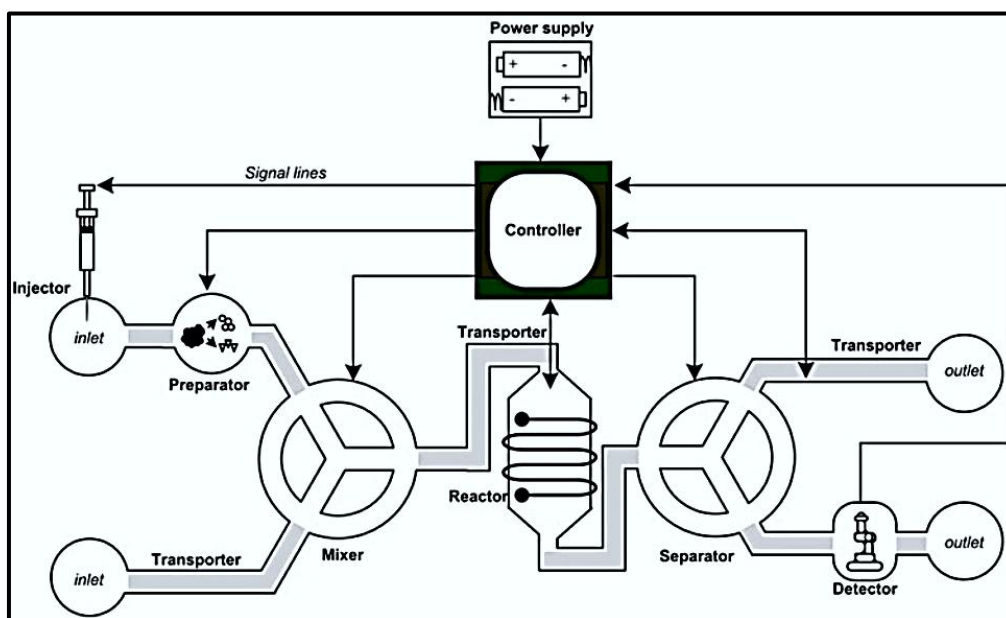


Figura 25. Vista general de los componentes de un sistema *Lab-on-a-chip* (LOC) [92].

### 2.8.1. Métodos de fabricación.

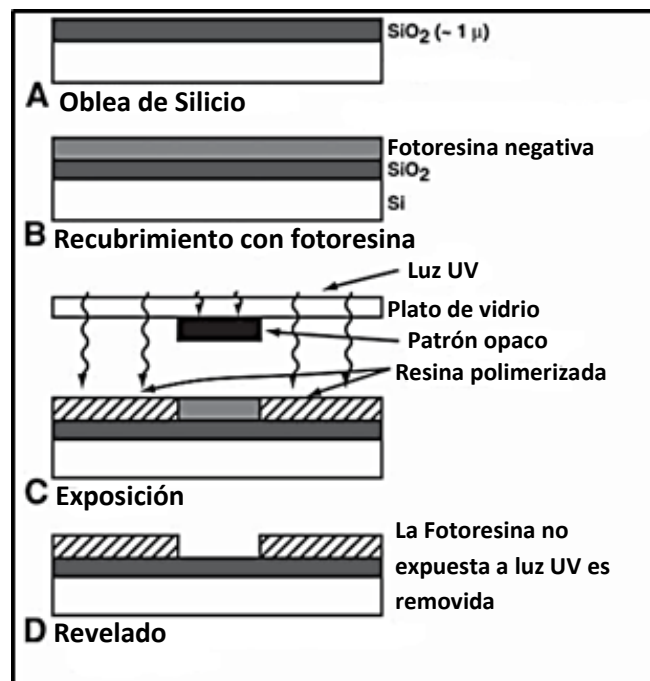
Dependiendo del material requerido y de las restricciones dadas por la aplicación final del microdispositivo, así como el costo, los equipos y las tecnologías disponibles, existen diferentes métodos de fabricación, entre los que se pueden destacar: estampado en caliente, moldeo por inyección, ablación con láser, poliéster termoestable, fotolitografía y litografía suave. De manera general, la mayoría de las técnicas involucran la generación de alguna máscara o molde lo que requiere de una serie de pasos mínimos con un consumo determinado de tiempo; lo anterior ha conducido a la búsqueda de nuevos materiales y nuevas formas de fabricación más rápidas y fáciles como el uso de la impresión 3D [93-97].

A continuación, se explicarán a detalle las técnicas de fotolitografía y litografía suave, las cuáles se emplearon para la construcción de los microchips en el presente trabajo.

### 2.8.1.1. Fotolitografía.

La fotolitografía consiste en la transferencia de un patrón a un polímero fotosensible (resina fotosensible o fotoresina) al ser expuesto a una fuente de luz UV a través de una máscara óptica con el diseño deseado [98]. Las fotoresinas pueden ser clasificadas de acuerdo al efecto que la radiación UV tenga sobre ellas, de esta manera pueden ser positivas y negativas, en la primera la reacción fotoquímica provoca que la resina se debilite y sea retirada con facilidad con el uso de algún disolvente, por el contrario en la segunda la radiación fortalece al polímero y la fotoresina no expuesta es removida con facilidad.

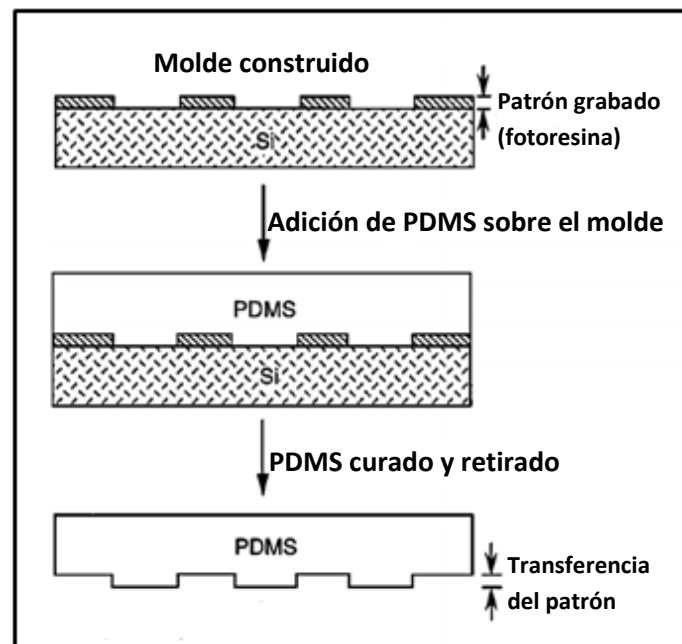
Los pasos principales para la fabricación de un molde por este método se resumen en la **Figura 26**, en donde se emplea como ejemplo una oblea de silicio y una fotoresina negativa para transferir el patrón grabado en la máscara. En la figura una oblea de silicio (A) es recubierta por una capa de resina fotosensible empleando un recubridor por rotación conocido como *spin-coater* (B). Posteriormente se coloca la máscara sobre la superficie y se realiza el proceso de exposición a luz UV (C), después de la exposición, se realiza el revelado, en donde la oblea es sumergida en un disolvente con la finalidad de remover la parte de la resina que no fue expuesta, construyéndose el molde con el patrón deseado (D).



**Figura 26.** Pasos básicos del proceso de fotolitografía con fotoresina negativa [98].

### 2.8.1.2. Litografía suave.

La litografía suave emplea un elastómero como molde para la generación de micropatrones; dentro de estos métodos el moldeo por micro-transferencia es el más utilizado [93]. Éste consiste en la adición de un pre-polímero líquido sobre un molde (generalmente construido con los microcanales por la técnica de fotolitografía), que al polimerizarse toma su forma, véase **Figura 27**. Una vez teniendo el polímero con el patrón deseado, éste es retirado, cortado y sellado con descargas de plasma sobre una superficie, ya sea vidrio u el mismo polímero. El proceso de polimerización puede acelerarse térmicamente, con temperaturas de alrededor de 40 a 70 °C dependiendo del material [99,100]. La elección de elastómeros para realizar litografía suave es debida principalmente a que poseen un adecuado contacto con la superficie del molde y pueden ser fácilmente removidos de superficies rígidas y complejas debido a su elasticidad [101]. La mayor ventaja de la litografía suave es su tiempo de respuesta, ya que es posible diseñar diversas réplicas en un tiempo menor a 24 horas, además de ser de bajo costo y contar con un gran número de materiales como polímeros precursores.

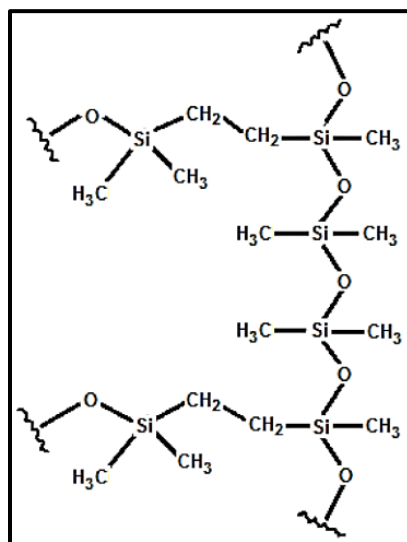


**Figura 27.** Esquema de los pasos de litografía suave empleado PDMS [101].

### 2.8.2. Materiales de fabricación: Polidimetilsiloxano (PDMS).

Existen diversos materiales que pueden emplearse para la fabricación de microchips, entre los más típicos se encuentran el vidrio y polímeros como el polidimetilsiloxano, policarbonato, poliestireno, etc. La elección del material adecuado para la fabricación depende de diversos criterios: la técnica de fabricación empleada, la disponibilidad y precio del material, propiedades ópticas, eléctricas, mecánicas y químicas, toxicidad y biocompatibilidad [102].

El PDMS es un polímero con fórmula  $[-(CH_3)_2SiO]-$  perteneciente a la familia de las siliconas, nombre con que se le conoce a los polímeros que contienen en su estructura química la unidad repetitiva Si-O (**Figura 28**); se ha convertido por mucho en el material más popular y con mayor uso para la construcción de microchips debido a la facilidad de fabricación de réplicas empleando principalmente la técnica de litografía suave, además no requiere de condiciones especiales, es barato en comparación con otros materiales, flexible, inerte, posee baja polaridad, es ópticamente transparente en la región UV y visible, biocompatible y permeable a gases (lo que lo hace un material adecuado para el estudio de células vivas) [93,94].



**Figura 28.** Semiestructura del polímero PDMS [98].

Las estructuras de PDMS pueden ser tratadas sobre su superficie lisa con plasma de oxígeno para formar enlaces irreversibles al ser selladas sobre vidrio o el mismo PDMS; la exposición de la superficie a descargas de plasma introduce al grupo silanol (Si-OH), destruyendo los grupos metilo (Si-CH<sub>3</sub>) otorgándole propiedades hidrofílicas, éstas pueden mantenerse indefinidamente manteniendo la superficie en contacto con agua o disolventes orgánicos polares, por otra parte, si la superficie se deja en contacto con aire, sufre un rearrreglo en su estructura recuperando su hidrofobicidad [101,104].

Sin embargo, pese al gran número de propiedades ideales para la construcción de microchips, no se trata de un material universal útil para cualquier aplicación en microfluídica, presentando las siguientes desventajas: se encoje cerca del 1% de su tamaño después del curado, adsorbe pequeñas moléculas hidrofóbicas y se hincha al contacto con disolventes orgánicos (por ejemplo tolueno y diclorometano), volviéndose inevitablemente importante el estudio de la compatibilidad del material con los disolventes en tres aspectos: **(1)** la solubilidad del PDMS en el disolvente, ya que ésta influye en el grado de hinchamiento; **(2)** la partición del soluto contenido en el disolvente entre éste y el PDMS, debido a que existe la posibilidad latente de pérdida y **(3)** la disolución de oligómeros de PDMS en el disolvente, pues su presencia puede considerarse como posible contaminante en los productos de reacción.

El hinchamiento de los microcanales construidos con PDMS ha sido ampliamente estudiado con gran número de disolventes de uso común, los cuales se muestran en la **Tabla 5**, ya que trae consigo diversas implicaciones: cambia la sección transversal del canal y, por lo tanto, el caudal y perfil de flujo. Los resultados de estos estudios han demostrado que disolventes con solubilidad similar al PDMS suelen hincharlo en mayor medida en comparación con disolventes con parámetros de solubilidad diferentes. La unión del PDMS sobre una superficie de vidrio ayuda a inhibir en cierta medida su hinchamiento, ya que el vidrio no se expande o hincha en contacto con disolventes orgánicos [104].

**Tabla 5.** Parámetro de solubilidad ( $\delta$ ) y relación de hinchamiento ( $S$ ) de disolventes orgánicos en contacto con PDMS.

Disolvente	$\delta^a$	$S^b$	Rank <sup>d</sup>
Perfluorotributilamina	5.6	1.00	32
Perfluorodecalina	6.6	1.00	33
Pentano	7.1	1.44	3
Polidimetilsiloxano	7.3	$\infty$	-
Diisopropilamina	7.3	2.13	1
Hexano	7.3	1.35	8
n-hetpano	7.4	1.34	10
Trietilamina	7.5	1.58	2
Éter	7.5	1.38	6
Ciclohexano	8.2	1.33	11
Tricloroetileno	9.2	1.34	9
Dimetoxietano (DME)	8.8	1.32	12
Xileno	8.9	1.41	4
Tolueno	8.9	1.31	13
Acetato de etilo	9.0	1.18	19
Benceno	9.2	1.28	14
Cloroformo	9.2	1.39	5
2-butanona	9.3	1.21	18
Tetrahidrofurano (THF)	9.3	1.38	7
Dimetilcarbonato	9.5	1.03	25
Clorobenceno	9.5	1.22	15
Cloruro de metileno	9.9	1.22	16
Acetona	9.9	1.06	22
Dioxano	10.0	1.16	20
Piridina	10.6	1.06	23
N-metilpirrolidona (NMP)	11.1	1.03	26
Ter-butilalcohol	10.6	1.21	17
Acetonitrilo	11.9	1.01	31
1-propanol	11.9	1.09	21
Fenol	12.0	1.01	29
Dimetilformamida (DMF)	12.1	1.02	27
Nitrometano	12.6	1.00	34
Alcohol etílico	12.7	1.04	24
Dimetilsulfoxido (DMSO)	13.0	1.00	35
Carbonato de propileno	13.3	1.01	30
Metanol	14.5	1.02	28
Etilenglicol	14.6	1.00	36
Glicerol	21.1	1.00	37
Agua	23.4	1.00	38

$\delta^a$  es el parámetro de solubilidad en unidades de  $\text{cal}^{1/2}\text{cm}^{-3/2}$ .  $S^b$  hace referencia a la relación de hinchamiento medida experimentalmente,  $S=D/D_0$ , donde  $D$  es la longitud del PDMS en el disolvente y  $D_0$  es la longitud del PDMS seco. **Rank<sup>d</sup>** ordena a los disolventes de mayor a menor habilidad de hinchamiento. [104]



### 3. Objetivos

#### General:

Diseñar, fabricar y evaluar microdispositivos de polidimetilsiloxano para la extracción líquido-líquido de compuestos fenólicos en aceite de oliva virgen extra.

#### Específicos:

- ◆ Conocer y utilizar las técnicas de fotolitografía y litografía suave para la fabricación de microdispositivos empleando como material el polímero polidimetilsiloxano.
- ◆ Optimizar la extracción líquido-líquido de los compuestos fenólicos evaluando parámetros como caudal, longitud de extracción, pH, concentración de reactivo de Folin-Ciocalteu y solución amortiguadora.
- ◆ Acoplar y evaluar la detección espectrofotométrica de los polifenoles fuera del microdispositivo empleando una celda de flujo con fibras ópticas.
- ◆ Con la metodología optimizada construir la curva de calibración y determinar sus parámetros estadísticos, así como validar el método.
- ◆ Analizar muestras de aceite de oliva virgen extra realizando la extracción de los compuestos fenólicos con el microdispositivo y con dos metodologías convencionales para demostrar las ventajas del uso de dispositivos de microfluídica.

## 4. Metodología

### 4.1 Equipos, instrumentos y reactivos.

De manera práctica, los equipos, instrumentos y reactivos empleados durante el desarrollo experimental se dividen en dos bloques:

- (1) Fabricación y caracterización de los microdispositivos.
- (2) Metodología de extracción líquido-líquido y posterior cuantificación de polifenoles.

Los cuales se muestran en la **Tabla 6** y **7**, respectivamente.

**Tabla 6.** Equipos, instrumentos y reactivos para la fabricación y caracterización de los microdispositivos.

<b>Equipo o instrumento</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>
<i>Spin-coater</i>	Laurell Technologies	WS-650MZ-23NPPB
Generador de plasma	Electro-Technic Products	BD-20AC
Lámpara UV	UVP	Black Ray B-100AP
Oblea de silicio	Silicon Valley Microelectronics	Diámetro 3 in; Espesor 381±25 µm
Horno	Heating Incubator Prolab	DHP-9032
Parrilla	CIMAREC	SP46925
Balanza	Scout Ohaus	SC2020
Microscopio óptico	LEICA	DMI3000B
Microscopio óptico	STEINDORFF	877.877.7274
Cámara phantom	AMETEK	MIRO M110
<b>Reactivo</b>	<b>Marca</b>	<b>Pureza</b>
Resina SU-8 3035	MicroChem	-
Kit elastómero de silicona	SYLGARD 184	-
Propilenglicol monometil éter acetato (PM-Acetato)	Sigma-Aldrich	99.5 %
2-Propanol	J.T. Baker	99.8 %

**Tabla 7.** Equipos, instrumentos y reactivos para la extracción líquido-líquido y cuantificación de los polifenoles en aceite de oliva virgen extra.

<b>Equipo o instrumento</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>
Bomba de jeringa	New Era Pump Systems	NE-300
Bomba peristáltica	ISMATEC	RS-232
Jeringa de vidrio 5 mL	Hamilton	59000-45
Tubería teflón, ID 0.022 in	Cole Parmer	EW-06417-21
Tubería Tygon, ID 0.76 mm	ISMATEC	070535-08i-ND-SC0056T
Celda de flujo SMA-Z paso óptico 1cm	-	-
Fibras ópticas 400 $\mu$ m	Ocean Optics	-
Fuente de luz UV-Vis-NIR	Ocean Optics	DT-MINI-2-GS
Detector UV-Vis	Ocean Optics	USB4000
Balanza analítica	Ohaus	E12140
Potenciómetro	OAKTON	105762
Parrilla con agitación	CIMAREC	SP131325
Micropipeta 100-1000 $\mu$ L	BIOHIT	PROLINE
Baño de ultrasonido	Branson	2510R-MT
Centrífuga	Hettich-Zentrifugen	EBA-20
Vortex Maxi Mix II	Barnstead Thermolyne	M37615
Jeringa de plástico 5 mL	BD	-
Acrodisco 0.45 $\mu$ m	Whatman	NYL W/GMF
Espectrofotómetro UV-Vis Cary 1E	Varian	-
Celda de cuarzo paso óptico 1 cm	A. Daigger & Company	-
<b>Reactivo</b>	<b>Marca</b>	<b>Pureza</b>
Reactivo de Folin-Ciocalteu	Merck	-
Hidróxido de sodio	Fermont	98.0 %
Ácido Tánico	Sigma-Aldrich	-
Bicarbonato de sodio	J.T. Baker	100 %
n-Hexano	J.T. Baker	85.0 %
Metanol	Sigma-Aldrich	99.8 %
2,4,6-Triclorofenol	Sigma-Aldrich	99.0 %
2,4-Diclorofenol	Sigma-Aldrich	98.0 %

## 4.2. Softwares.

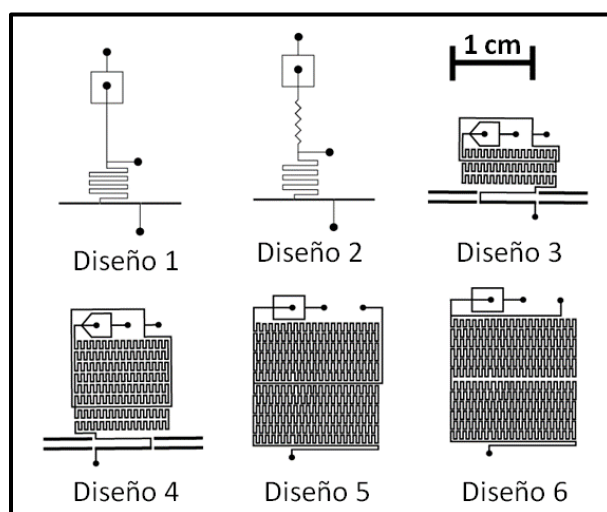
Los programas computacionales empleados durante y después del desarrollo experimental fueron: *Adobe Illustrator CC 2014*, para el diseño de los microcanales; *SpectraSuite 6.1*, para el control de la medición y registro de las señales de absorbancia por detección espectrofotométrica; *ImageJ* y *PCC v2.7.756.2*, para la caracterización de los microchips; *STATGRAPHICS Centurion XVI.1* y *Microsoft Excel 2010*, para el tratamiento estadístico de los datos registrados.

## 4.3. Fabricación de los microdispositivos.

Para la fabricación de los microdispositivos se siguieron una serie de pasos fundamentales, los cuales se explican a detalle a continuación.

### 4.3.1. Diseño de los microcanales.

La propuesta de los diferentes diseños, véase **Figura 29**, se realizó considerando trabajos previos de extracción líquido-líquido empleando microdispositivos y sistemas LOC en general [61,70,105]. El diseño de los microcanales se efectuó en el software *Adobe Illustrator CC 2014* dentro de una circunferencia de 69 mm de diámetro (considerando que la oblea de silicio tiene un diámetro de 76 mm) aprovechando al máximo el tamaño disponible; así los diseños 1,2 y 5,6 se colocaron en parejas, con cuatro diseños por circunferencia (dos de cada uno). Los diseños 3,4 ya habían sido construidos en un trabajo previo del equipo de investigación [70]. Posteriormente los prototipos se imprimieron en negativos de acetato en la empresa Gráficos Digitales Denver, con la intención de que cumplieran el papel de máscaras en la técnica de fotolitografía.

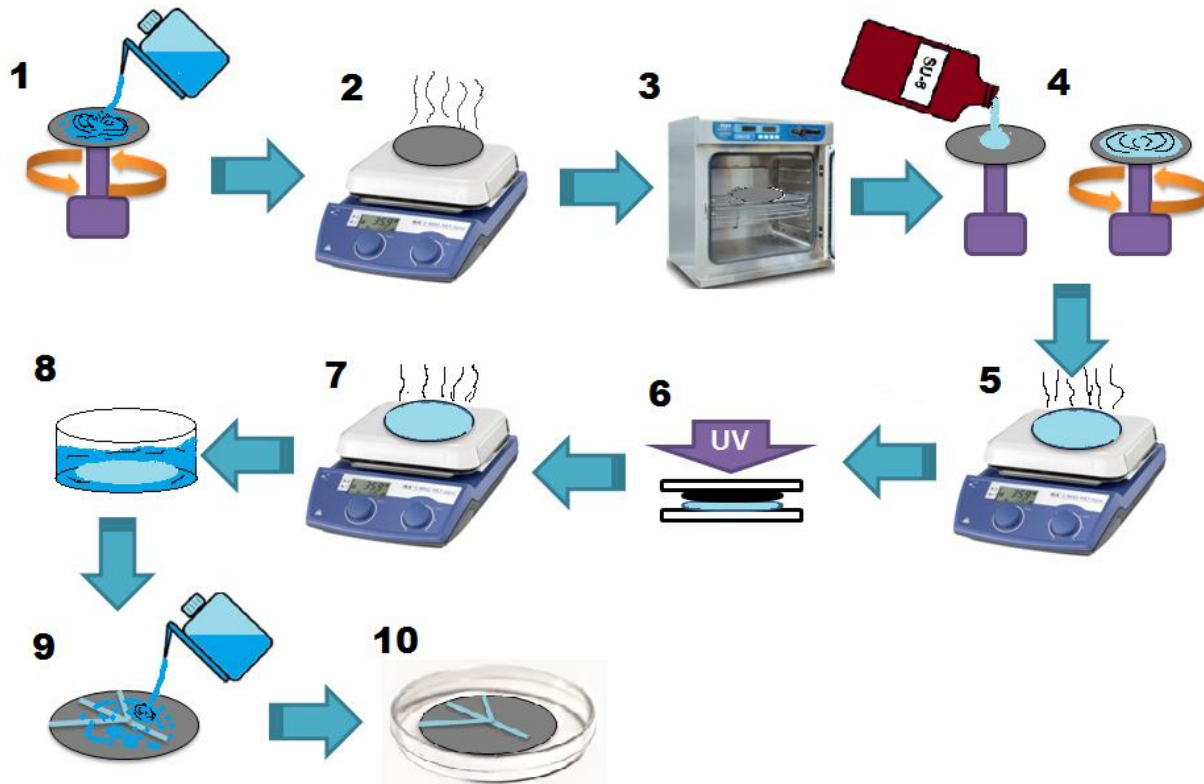


**Figura 29.** Diseño de los microcanales para la construcción de los microchips. Diseños 1 y 2 aprox. 100  $\mu\text{m}$  de ancho x 100  $\mu\text{m}$  de profundidad; diseños 3 a 6 aprox. 200  $\mu\text{m}$  de ancho x 100  $\mu\text{m}$  de profundidad.

#### 4.3.2. Fotolitografía y litografía suave.

El procedimiento seguido para la construcción del molde por fotolitografía se explica a continuación [106], véase **Figura 30**.

1. La oblea de silicio se colocó en el *spin-coater* y se aplicó el siguiente programa:
  - 10 s a 500 rpm con aceleración de 100 rpm/s.
  - 30 s a 2000 rpm con aceleración de 300 rpm/s.Aproximadamente durante los primeros 10 s del programa se adicionó 2-propanol con el propósito de lavar la superficie de la oblea.
2. Una vez limpia se colocó sobre una parrilla a 200 °C por un tiempo de 10 min.
3. Con el fin de que la oblea de silicio alcanzara la temperatura ambiente con mayor facilidad, se transfirió al horno a una temperatura de 70 °C durante 5 min, posteriormente se retiró y se dejó sobre una superficie.
4. Se volvió a colocar la oblea en el *spin-coater* teniendo especial cuidado en centrarla para evitar movimientos erráticos. Se adicionaron aproximadamente 3 mL de resina SU-8 3035 en el centro de la oblea y nuevamente se aplicó el programa descrito en el paso 1. Logrando una capa de resina de aproximadamente 50 µm.
5. Se retiró la oblea del *spin-coater* para realizar el “cocinado suave” con el fin de evaporar todos los disolventes de la resina a 105 °C por 15 min. Después de permitir a la oblea alcanzar la temperatura ambiente, se repitieron los pasos 4 y 5 para lograr una profundidad de canal aproximada a 100 µm. Para esta repetición el “cocinado suave” fue a 105 °C por 30 min.
6. Se realizó la exposición colocando la máscara de negativo con los microcanales deseados sobre la oblea de silicio y haciendo una especie de “sandwich” con dos superficies de vidrio de 4 mm de espesor. Se hizo incidir luz UV sobre cada diseño por separado a una distancia de 30 cm por 45 s. Posteriormente, se retiró la máscara de la oblea dejando los microcanales polimerizados en su superficie.
7. La oblea se colocó sobre una parrilla a 75 °C para llevar a cabo el cocinado post-exposición durante 1 min, enseguida se puso sobre otra parrilla a 105 °C por 5 min, con la finalidad de unir a la resina polimerizada a la superficie de la oblea de silicio.
8. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, la oblea se depositó en un recipiente con revelador (PM-Acetato) durante 15 min haciendo pequeños movimientos circulares para eliminar toda la resina que no fue polimerizada por la luz UV.
9. Los microcanales ya grabados sobre la oblea de silicio se enjuagaron con 2-propanol.
10. Se permitió el secado del molde elaborado dentro de una caja Petri.



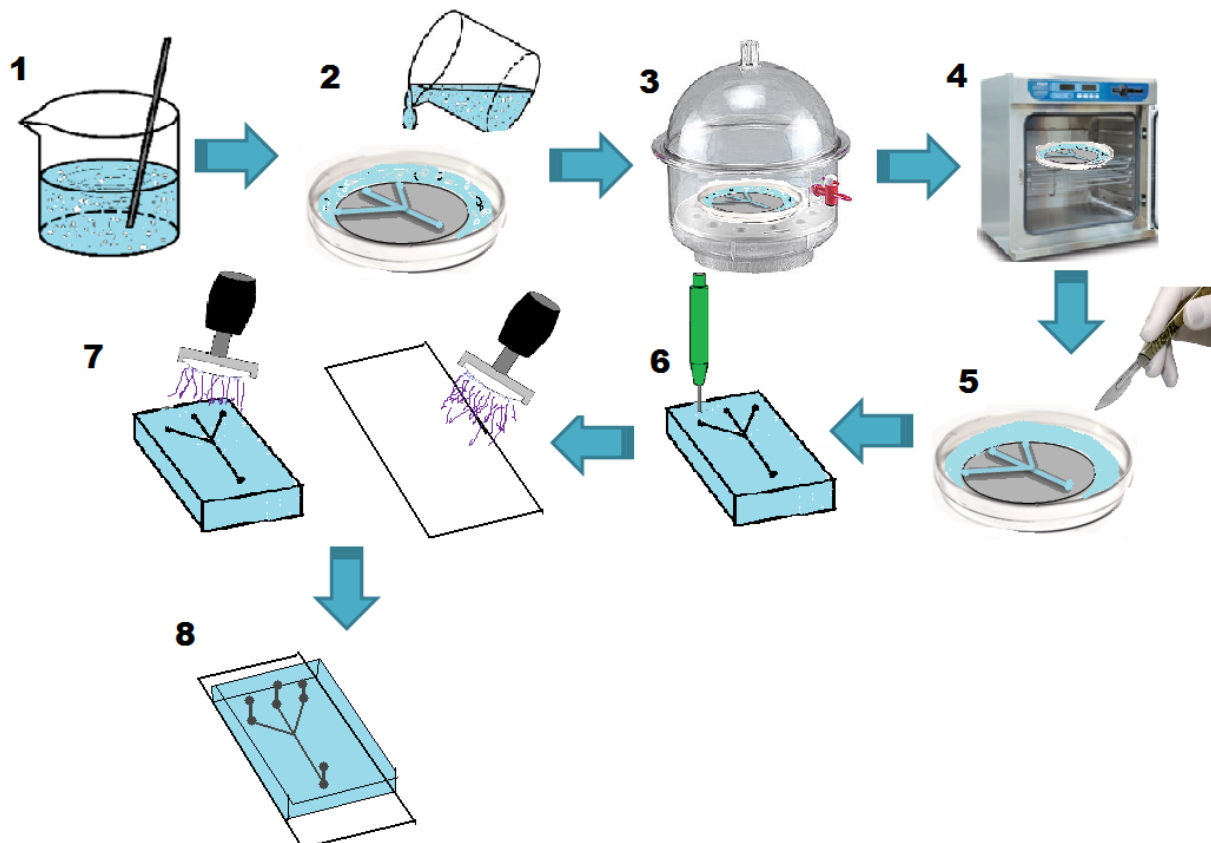
**Figura 30.** Procedimiento ilustrado para la construcción del molde por fotolitografía.

(1) Lavado de la oblea de silicio en el *spin-coater* con 2-propanol; (2) Deshidratación de la oblea; (3) Calentamiento en horno; (4) Adición de la resina SU-8 para la formación de la capa en el *spin-coater*; (5) Cocinado suave; (6) Exposición a luz UV con la máscara sobre la oblea; (7) Cocinado; (8) Revelado con PM-Acetato; (9) Lavado del molde; (10) Secado del molde en caja Petri.

Una vez construido el molde, se realizaron los siguientes pasos para la fabricación de réplicas del microchip por litografía suave, véase **Figura 31**.

1. En un vaso de plástico desechable se pesaron cerca de 30 g de mezcla de prepolímero de PDMS y agente curante en proporción 10:0.9 y se mezclaron perfectamente.
2. La mezcla se adicionó al molde dentro de la caja Petri hasta alcanzar una altura entre 4.0 y 5.0 mm.
3. El molde se introdujo a un desecador conectado a vacío con el propósito de eliminar todas las burbujas de la mezcla.
4. Ya sin burbujas el molde con el PDMS se colocó en el horno a una temperatura de 70 °C y se dejó ahí durante 24 h para la completa polimerización.
5. La caja se retiró del horno y se dejó enfriar a temperatura ambiente, enseguida se realizó el corte con ayuda de un bisturí teniendo cuidado en no cortar los microcanales.

6. Se perforaron las entradas y salida de los microcanales con un horador de 0.75 mm de diámetro.
7. Se limpió perfectamente el PDMS con cinta adhesiva *Scotch* para eliminar cualquier partícula sobre su superficie y se aplicó descarga de plasma durante 15 s para el sellado, los canales se pegaron sobre vidrio (portaobjetos), el cual fue previamente lavado con agua y jabón, acetona, etanol y enjuagado nuevamente con agua, una vez seco se le aplicó descarga de plasma por 1 min.
8. Para el pegado del PDMS sobre vidrio se aplicó presión con las yemas de los dedos para asegurar el sellado de los microcanales y se dejó reposar al menos 48 h ante de su uso.



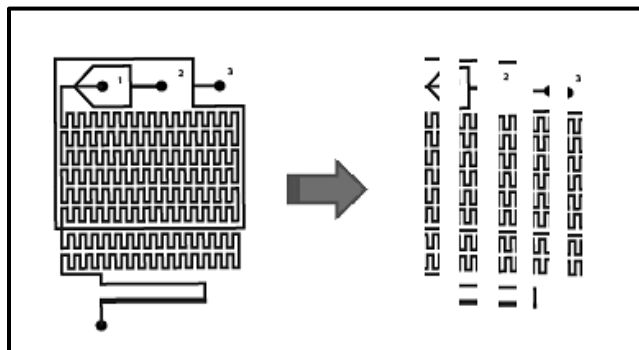
**Figura 31.** Procedimiento para la fabricación de réplicas del microchip en PDMS.

(1) Mezclado del prepolímero y agente curante; (2) Llenado del molde; (3) Eliminación de burbujas a vacío; (4) Polimerización con calentamiento; (5) Corte de los microchips; (6) Horadación de entradas y salida; (7) Sellado de los microcanales; (8) Microchip construido.

### 4.3.3. Caracterización de los microchips.

Se observó al microscopio la máscara de acetato impresa en negativo con el patrón deseado y se hizo una comparación con los microcanales una vez fabricado el microchip en PDMS para descartar la transferencia de posibles irregularidades de la máscara al diseño final.

Posteriormente, la caracterización de los prototipos fabricados se efectuó en el Microscopio óptico LEICA empleando un objetivo 20x y la cámara Phantom, a través de la relación de la foto de una retícula microscópica y la imagen de los microcanales. Para ello se realizaron cortes a cada uno de los microchips antes de ser sellados sobre vidrio y se observó su sección transversal al microscopio, midiendo la profundidad y ancho los microcanales en varias secciones del mismo hasta un total de 20 mediciones para cada diseño (**Figura 32**). Posteriormente se obtuvo el valor promedio con su desviación estándar. Asimismo, se midió la longitud de los microcanales para calcular el volumen total aproximado dentro del microdispositivo.



**Figura 32.** Ejemplo de los cortes efectuados a un microchip.

Para cada microdispositivo se seleccionaron de forma aleatoria cinco cortes y con cada uno se obtuvieron cinco mediciones de ancho y alto del microcanal respectivamente.

## 4.4. Estudios previos.

Previo al montaje final de la extracción líquido-líquido de polifenoles de aceite de oliva en el microchip, se realizaron una serie de estudios evaluando algunos parámetros como la funcionalidad de bombas, la estabilidad del reactivo de Folin-Ciocalteu en medio básico, algunas pruebas de solubilidad y la detección espectrofotométrica en el microdispositivo.

### 4.4.1. Calibración de la bomba peristáltica.

La bomba peristáltica empleada en la experimentación no nos proporciona directamente un valor de caudal en unidades de mL/min o  $\mu\text{L}/\text{min}$ , sino las revoluciones por minuto (rpm) de la bomba; por lo tanto el caudal estará en función del diámetro interno de la tubería seleccionada. Para conocer dicho valor se realizó una curva de calibración en la cual se midió por triplicado el volumen dispensado por minuto de agua destilada en función de las rpm con una tubería de



tygon de 0.76 mm de diámetro interno (ID). Posteriormente se construyó el gráfico de V(mL)/min vs. rpm y a través de un ajuste por cuadrados mínimos se determinó la ecuación que relaciona el caudal con las rpm seleccionadas de la bomba.

#### 4.4.2. Evaluación del caudal de las bombas de jeringa.

Se verificó el funcionamiento de las tres bombas de jeringa, para lo cual se seleccionó el caudal de 40  $\mu\text{L}/\text{min}$  especificando en la bomba el ID de la jeringa utilizada (10.3 mm). Se midió por triplicado con una probeta graduada, el tiempo que tardaba en dispensar exactamente 1.0 mL de agua destilada y con este resultado se calculó el caudal real experimental de cada bomba junto con su desviación estándar.

#### 4.4.3. Estabilidad del reactivo de Folin-Ciocalteu en medio básico.

El desarrollo experimental se dividió en tres partes, cada una de las cuales se realizó por triplicado:

(1) Preparación del estándar de referencia. En un tubo de ensayo se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de solución de aceite\*, 100  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.5 mol/L y 100  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu 0.2 mol/L aforado en medio acuoso. Se observó la formación del color obtenido.

(2) Reacción con reactivo de Folin-Ciocalteu medio básico recién preparado. En un tubo de ensayo se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de solución de aceite\* y posteriormente 100  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu 0.2 mol/L aforado a 10 mL con NaOH 0.5 mol/L. Se observó la formación del color obtenido.

(3) Reacción con reactivo de Folin-Ciocalteu medio básico después de 10 min de preparación. Después de 10 min de la preparación del reactivo de Folin-Ciocalteu en medio básico, en un tubo de ensayo se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de solución de aceite\*, así como 100  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu 0.2 mol/L preparado en el punto anterior. Se observó la coloración del producto.

\* Solución de aceite de oliva virgen extra (Sierra de Gata) pesando aprox. 2.0 g de aceite y aforando a 5 mL con n-hexano.

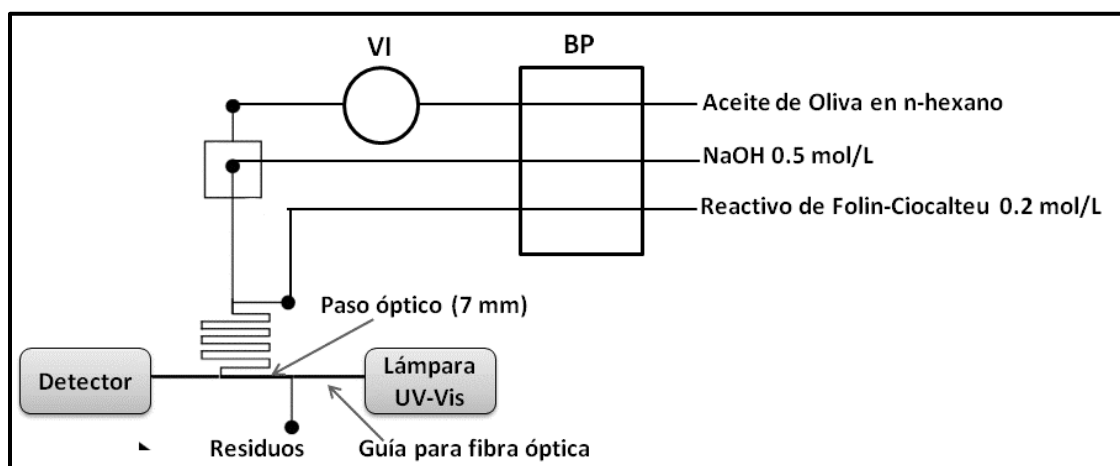
#### 4.4.4. Pruebas de solubilidad de ácido tánico, gálico y cafeico.

En un tubo de ensayo se pesaron aprox. 0.02 g de ácido tánico, en un segundo tubo aprox. 0.02 g de ácido gálico y en un tercer tubo aprox. 0.02 g de ácido cafeico, se adicionaron a cada uno 5 mL de n-hexano y a través de una agitación manual vigorosa se buscó su solubilidad; se repitió el procedimiento variando el disolvente n-hexano por 5 mL de cloroformo y posteriormente 5 mL de aceite de oliva virgen extra (Sierra de Gata).

#### 4.4.5. Estudio de extracción de polifenoles con detección en el microchip.

Con el microchip identificado como diseño 1, se montó una configuración parecida a la realizada previamente por el equipo de trabajo [105], con el fin de llevar a cabo la extracción de polifenoles en el aceite de oliva e integrar su detección por medio de fibras ópticas en el mismo microdispositivo. Para ello se prepararon las siguientes soluciones: aceite de oliva virgen extra (aprox. 2.0 g en 5 mL con n-hexano), NaOH 0.5 mol/L y reactivo de Folin-Ciocalteu 0.2 mol/L. Las soluciones fueron impulsadas dentro del microdispositivo a través de una bomba peristáltica con un caudal de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; la fase acuosa (reactivo de Folin-Ciocalteu e NaOH) se ingresó de manera continua, mientras que el ingreso de la fase orgánica (solución de aceite en n-hexano) fue de manera controlada empleando una válvula de inyección (**Figura 33**).

Se realizaron inyecciones de la muestra de aceite en n-hexano, así como de n-hexano puro, durante diferentes periodos de tiempo (30 s, 20 s y 10 s) y se graficó la respuesta en el detector utilizando como blanco NaOH 0.5 mol/L y reactivo de Folin-Ciocalteu 0.2 mol/L.



**Figura 33.** Montaje experimental para la extracción de compuestos fenólicos en aceite de oliva con detección en el microdispositivo. Bomba peristáltica (BP), Válvula de inyección (VI).

#### 4.5. Optimización de la extracción líquido-líquido en el microdispositivo.

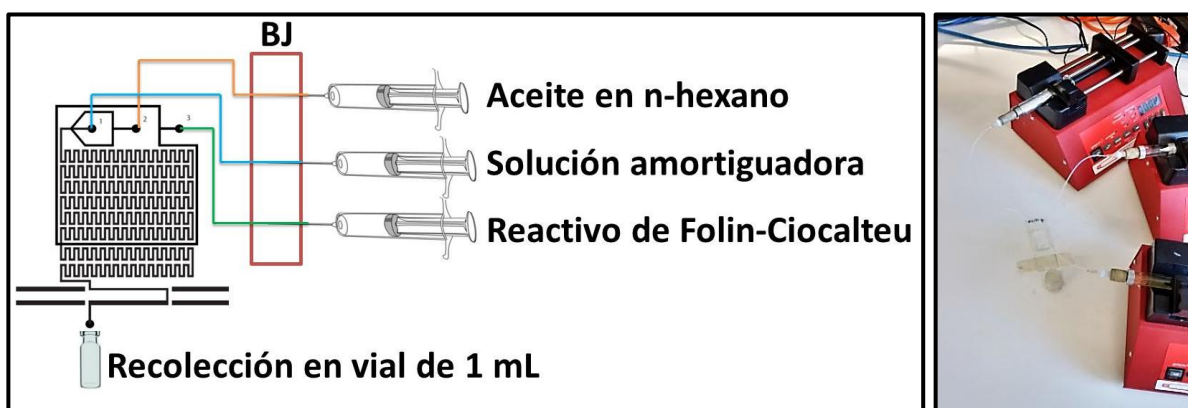
La optimización de la extracción se realizó mediante una serie de experimentos en los que se estudió la influencia del caudal, el pH, la concentración de la solución amortiguadora, la longitud de los microcanales y la concentración del reactivo de Folin-Ciocalteu.

Todas las pruebas de optimización se llevaron a cabo con la muestra de aceite de oliva virgen extra Sierra de Gata, Cáceres Extremadura, España.

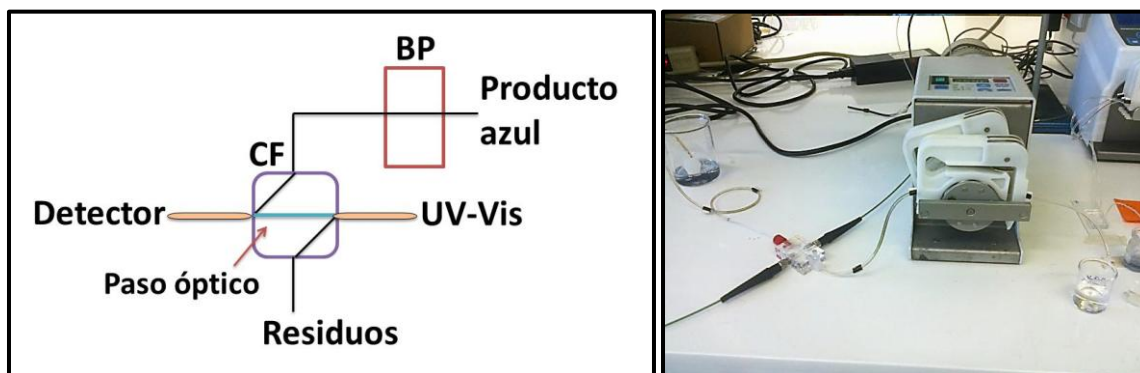
#### 4.5.1. Montaje experimental.

Para la extracción líquido-líquido de los compuestos fenólicos y la formación del producto de reacción color azul, se emplearon tres bombas de jeringa programadas a un mismo caudal en  $\mu\text{L}/\text{min}$ , unidas con tubería de teflón al microdispositivo (**Figura 34**), se recolectó el producto de reacción del extracto en un vial durante 5 min y con un cuentagotas se separó la parte superior correspondiente al aceite de oliva en n-hexano.

La detección se realizó fuera del microdispositivo en una celda de flujo en forma de Z (longitud de paso óptico de 1 cm), empelando como blanco agua destilada. La celda se llenó por 18 s a un caudal de 1 mL/min con el producto colorido contenido en la fase acuosa, una vez llena se detuvo el flujo y se registró la absorbancia por 4 minutos a  $\lambda=730\text{ nm}$ , empleando fibras ópticas, véase **Figura 35**. Para el tratamiento de los datos de absorbancia, dado que las señales registradas no son picos sino mesetas, se consideraron los últimos 20 valores registrados obteniendo un valor promedio ( $A_{\text{prom}}$ ), así, al realizarlo por triplicado se obtuvo  $A_{\text{promprom}}$ .



**Figura 34.** Montaje experimental para la extracción de compuestos fenólicos en aceite de oliva y desarrollo del producto de reacción en el microdispositivo. Bomba de jeringa (BJ).



**Figura 35.** Montaje experimental para la detección espectrofotométrica a través de fibras ópticas del producto de reacción fuera del microdispositivo. Bomba peristáltica (BP), Celda de flujo (CF).

#### 4.5.2. Diseño de experimentos factorial completo $2^4$ .

Se preparó una solución de aceite de oliva virgen extra pesando aprox. 1.0 g de muestra y aforando a 5.0 mL con n-hexano, posteriormente se seleccionaron cuatro factores que influyen en la extracción y formación del producto de reacción y a cada uno se le asignó un valor alto (1) y uno bajo (-1), véase **Tabla 8**. Con ayuda del *software STATGRAPHICS Centurion XVI.I* se construyó la matriz del diseño, realizando un total de 16 experimentos.

**Tabla 8.** Factores evaluados en el diseño experimental.

Factor	1	-1
[NaOH] mol/L	0.50	0.05
[Reactivo F-C] mol/L	0.20	0.04
Caudal $\mu\text{L}/\text{min}$	40	10
Diseño microchip	2	1

En función del caudal empleado (mismo para las tres bombas de jeringa) se esperó el tiempo necesario para recolectar 400  $\mu\text{L}$  de producto de reacción en el vial (cantidad necesaria para el llenado de la celda de flujo). La matriz del diseño de experimentos se muestra en la **Tabla 9**.

**Tabla 9.** Matriz de diseño de experimentos factorial completo  $2^4$ .

No. Experimento	[NaOH] mol/L	[Reactivo Folin] mol/L	Caudal $\mu\text{L}/\text{min}$	Microchip	Tiempo de recolección (min)
1	-1	1	-1	-1	20
2	1	-1	-1	-1	20
3	-1	-1	1	-1	5
4	1	1	1	-1	5
5	1	1	-1	1	20
6	-1	1	1	1	5
7	1	-1	1	1	5
8	-1	-1	-1	1	20
9	-1	1	-1	1	20
10	-1	-1	-1	-1	20
11	-1	1	1	-1	5
12	1	1	-1	-1	20
13	1	1	1	1	5
14	1	-1	-1	1	20
15	-1	-1	1	1	5
16	1	-1	1	-1	5

#### 4.5.3. Evaluación de la influencia del pH.

Se prepararon las siguientes soluciones: aceite de oliva virgen extra pesando aprox. 2.0 g de muestra y aforando a 10.0 mL con n-hexano, bicarbonato de sodio 0.1 mol/L pH 8.9, solución amortiguadora de carbonatos 0.1 mol/L pH 10.6 e hidróxido de sodio 0.1 mol/L pH 13.0. En el microdispositivo denominado diseño 2 y a un caudal de 40  $\mu\text{L}/\text{min}$  se probaron los tres valores de pH, variando la concentración del reactivo de Folin-Ciocalteu (0.20, 0.04 y 0.02 mol/L) y se observó la coloración obtenida después de un tiempo de recolección de 5 minutos en un vial.

#### 4.5.4. Cinética de la reacción.

Con el microdispositivo diseño 2 se realizó por triplicado la extracción bajo las siguientes condiciones: caudal de 40  $\mu\text{L}/\text{min}$ , solución amortiguadora de carbonatos 0.1 mol/L pH 10.6, reactivo de Folin-Ciocalteu 0.02 mol/L, solución de aceite de oliva pesando aprox. 1.0 g de muestra y llevando al aforo con n-hexano a 5 mL. Inmediatamente después del tiempo de recolección en el vial (5 min), se separó la fase correspondiente al aceite, se llenó la celda de flujo con el producto de la reacción y se midió la absorbancia por 60 min.

#### 4.5.5. Efecto del caudal sobre la extracción.

Se preparó una solución de aceite de oliva virgen extra pesando aprox. 0.4 g de muestra y aforando a 5.0 mL con n-hexano, asimismo, se utilizó una solución amortiguadora de carbonatos 0.1 mol/L pH 10.6 y reactivo de Folin-Ciocalteu 0.02 mol/L. Empleando el microchip etiquetado como diseño 2 se llevó a cabo la extracción por triplicado bajo tres caudales: 20, 30 y 40  $\mu\text{L}/\text{min}$  (mismo caudal para cada uno de las tres bombas de jeringa); con un tiempo de recolección en vial de 10.0, 7.5 y 5.0 min, respectivamente.

Las absorbancias registradas para cada caudal se analizaron en el *software* STATGRAPHICS y mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una comparación de muestras múltiples, se determinó si existían diferencias estadísticamente significativas entre las respuestas.

#### 4.5.6. Estudio de la longitud del microcanal de extracción y reacción.

Empleando los prototipos 2 a 6 de los microdispositivos, se realizó con cada uno por triplicado la extracción de una solución de aceite de oliva virgen extra preparada pesando aprox. 2.0 g de muestra y aforando a 10 mL con n-hexano, a un caudal de 40  $\mu\text{L}/\text{min}$  y empleando una solución amortiguadora de carbonatos 0.1 mol/L pH 10.6 y reactivo de Folin-Ciocalteu 0.02 mol/L.

Cada extracto se recolectó en un vial por un tiempo de 5 min e inmediatamente después de la recolección se separó la fase correspondiente al aceite y se introdujo el producto colorido en la celda de flujo midiendo su absorbancia durante 60 min.

#### 4.5.6.1. Longitud del microcanal de extracción: máxima extracción.

Con los diseños 2 a 5 de los microchips fabricados se realizó por triplicado la extracción de los compuestos fenólicos de una solución de aceite de oliva, bajo las mismas condiciones descritas en el punto 4.5.6., con la diferencia que la bomba de jeringa correspondiente al reactivo de Folin-Ciocalteu se encontraba apagada para evitar la entrada de éste al microdispositivo. La recolección se realizó en un vial durante un lapso de 40 min separándose inmediatamente el aceite, y el extracto incoloro ( $\approx 1$  mL) se colocó en una jeringa. Empleando siempre el microchip diseño 1, se ingresaron los extractos de cada prototipo junto con la solución amortiguadora de carbonatos 0.1 mol/L pH 10.6 y reactivo de Folin-Ciocalteu 0.02 mol/L formándose el complejo colorido que se recolectó durante 5 min en un vial, midiendo su absorbancia en la celda de flujo por 60 min.

#### 4.5.7. Influencia de la concentración de la solución amortiguadora.

Se preparó una solución de aceite de oliva pesando aprox. 2.0 g de muestra y aforando a 25.0 mL con n-hexano, una solución de reactivo de Folin-Ciocalteu 0.02 mol/L y solución amortiguadora de carbonatos pH 10.6, la extracción se realizó por triplicado bajo un caudal de 40  $\mu$ L/min en el microdispositivo identificado como diseño 4. En este caso se varió la concentración de la solución amortiguadora de carbonatos (0.10, 0.25, 0.50 y 0.75 mol/L). Inmediatamente después del tiempo de recolección de 5 min se separaron las fases y se midió la absorbancia por un tiempo de 4 min.

### 4.6. Evaluación de la duración de los microdispositivos.

Utilizando un microdispositivo nuevo y bajo las condiciones óptimas, se realizó de manera continua durante 8 horas en un mismo día, la extracción de una solución de aceite de oliva preparada pesando aprox. 0.2 g de muestra en 5.0 mL de n-hexano. A cada extracto acuoso se le midió la absorbancia. Terminado el periodo de extracción se realizó un lavado a los microcanales siguiendo el siguiente orden:

- Agua destilada a un caudal de 10  $\mu$ L/min por 15 min.
- Etanol a un caudal de 10  $\mu$ L/min por 15 min.
- Agua destilada a un caudal de 40  $\mu$ L/min por 5 min.

Al día siguiente empleando el mismo microchip, se realizaron extracciones durante 1 h y se registraron sus correspondientes absorbancias. Se realizó un comparativo entre las señales obtenidas con el microdispositivo nuevo y después de su uso para conocer si influía en la extracción y cuantificación.

#### 4.7. Comportamiento del flujo en los microcanales.

Se observó al microscopio, empleando la cámara phantom a velocidad lenta, la extracción en el microdispositivo trabajando a las condiciones óptimas (sección 4.8). Se analizó el comportamiento del flujo de las dos fases (agua y aceite de oliva/n-hexano) prestando principalmente interés en cuatro zonas del diseño de los microcanales: (1) unión entre la solución amortiguadora de carbonatos 0.75 mol/L pH 10.6 y la solución de aceite de oliva en n-hexano, (2) zona de extracción, (3) adición del reactivo de Folin-Ciocalteu y (4) zona de reacción.

#### 4.8. Validación de la metodología.

Previo a la construcción de la curva de calibración se estimó su intervalo lineal así como sus límites de detección y cuantificación, para ello se prepararon estándares de ácido tánico (ÁT) abarcando concentraciones de 0.03 hasta 18.09  $\mu\text{mol/L}$  (0.05 hasta 30.78  $\mu\text{g/mL}$ ) a partir de la dilución de una solución madre de 670.12  $\mu\text{mol/L}$  (1140  $\mu\text{g/mL}$ ). A las condiciones óptimas establecidas para la extracción de los compuestos fenólicos en el aceite de oliva en el microdispositivo (caudal 40  $\mu\text{L/min}$ , solución amortiguadora de carbonatos 0.75 mol/L pH 10.6, diseño 4 de microchip y tiempo de recolección en vial de 5 min), se formó por triplicado para cada estándar el producto de reacción y se midió su absorbancia por un tiempo de 4 min en la celda de flujo, utilizando agua destilada como blanco.

##### 4.8.1. Determinación del intervalo lineal.

De acuerdo con la referencia consultada [107], se aplicó una prueba de intervalo lineal considerando el promedio de las respuestas obtenidas para cada estándar y la concentración del mismo. Así, se construyó un gráfico de  $A_{\text{promprom}}/[\text{ÁT}]$  vs.  $\log([\text{ÁT}])$  en el que se ubicó, con una línea horizontal al eje X, el promedio del cociente de la respuesta registrada entre la concentración  $\pm$  el 5 %. Todas las concentraciones cuya relación respuesta/concentración entren dentro del intervalo delimitado, corresponden al intervalo lineal de la curva de calibración.

##### 4.8.2. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).

Los límites de detección (LOD, del inglés *Limit Of Detection*) y cuantificación (LOQ, del inglés *Limit Of Quantification*) se estimaron considerando la respuesta analítica y la señal debida al ruido basal. Para el caso del primero, se seleccionó la concentración del estándar de ácido tánico que generó una respuesta con respecto a la muestra blanco en una proporción de por lo menos 3 a 1, mientras que para el límite de cuantificación la proporción de la concentración seleccionada fue de por lo menos 10 a 1 [108].

#### 4.8.3. Construcción de la curva de calibración.

Una vez conocidos los parámetros de las secciones anteriores (4.8.1. y 4.8.2.), se preparó diariamente durante siete días una curva de calibración abarcando las concentraciones de ácido tánico de 1.77 a 11.20  $\mu\text{mol/L}$  (3.01 a 19.06  $\mu\text{g/mL}$ ), a partir de la dilución de la solución madre de 670.12  $\mu\text{mol/L}$  (1140  $\mu\text{g/mL}$ ). A las condiciones óptimas especificadas en la sección 4.8., se formó por triplicado el producto colorido de reacción para cada punto de la curva y se midió la absorbancia en la celda de flujo. Con los resultados y con ayuda del *software STATGRAPHICS*, se construyó una sola curva de calibración.

#### 4.8.4. Precisión: repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio.

Se evaluó la precisión del método analítico en términos de reproducibilidad y repetibilidad dentro del laboratorio, para lo cual se preparó por duplicado, durante siete días a la par de la construcción de la curva de calibración, una solución de aceite pesando aprox. 0.2 g de muestra y aforando a 5.0 mL con n-hexano, a las condiciones óptimas (ver sección 4.8.) se realizó la extracción por triplicado para cada solución y se midió su respuesta obteniendo un promedio de absorbancia. Con la curva de calibración preparada diariamente se cuantificó la cantidad de polifenoles totales en la muestra de aceite como miligramos equivalente de ácido tánico por kilogramo de aceite (mgEÁT/kg de aceite).

Para determinar la repetibilidad y reproducibilidad se hizo un análisis de varianza (ANOVA) de un factor y a través de la aplicación de fórmulas con base en la referencia consultada [109] se calculó la precisión de la metodología.

### 4.9. Análisis de muestras de aceite de oliva virgen extra.

Empleando tres metodologías diferentes, se realizó la extracción de compuestos fenólicos de seis muestras de aceite de oliva virgen extra, en la **Figura 36** se presentan cinco de las seis muestras analizadas:

- Sierra de Gata, Cáceres Extremadura (España).
- Casas Hualdo, Cornicabra (España).
- Las doscientas Blend, Arbequina/Picual (Chile).
- Las doscientas, Picual (Chile).
- Pons Tradicional, Frutado (España).
- Pons Ecológico, Natural (España).

La cuantificación del contenido de polifenoles totales de cada extracto se hizo por medio de la reacción de Folin-Ciocalteu, expresada en miligramos equivalente de ácido tánico por kilogramo de aceite (mgEÁT/kg de aceite)  $\pm$  la desviación estándar (S).





**Figura 36.** Muestras de aceite de oliva virgen extra analizadas.

#### 4.9.1. Extracción en el microdispositivo.

Se prepararon 3 soluciones por muestra de aceite de oliva pesando aprox. 0.2 g y aforando a 5.0 mL con n-hexano. Para cada solución se realizó la extracción por triplicado en el microchip a las condiciones óptimas establecidas (sección 4.8.) y se midió la absorbancia del extracto por un tiempo de 4 min; de esta manera se obtuvo un promedio de la señal para cada muestra de aceite con la se realizó la cuantificación de la fracción fenólica total.

#### 4.9.2. Extracción en lote: Bonoli et al.

La extracción líquido-líquido se llevó a cabo por triplicado para cada muestra, de acuerdo con la metodología reportada por Bonoli et al. [47]: Se pesaron aprox. 2.0 g de aceite de oliva en un tubo de centrifuga y se adicionó 1.0 mL de n-hexano y 2.0 mL de metanol/agua (60:40 v/v). La mezcla se agitó durante 2 min en un vórtex y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min. Transcurrido este tiempo, se separaron las fases colocando la fracción orgánica (aceite/n-hexano) en un nuevo tubo de centrifuga y repitiendo la extracción dos veces más. Los extractos (metanol/agua) se combinaron y filtraron por medio de un acrodisco de 0.45  $\mu\text{m}$ , llevando a un aforo de 10.0 mL con metanol/agua (60:40 v/v). De esta última, se tomó el volumen necesario para preparar una nueva solución cuya absorbancia registrada entrará dentro de la curva de calibración de ácido tánico preparada en la sección 4.8.3.

#### 4.9.3. Extracción en lote: Consejo Oleícola Internacional.

Se siguió la metodología propuesta por el Consejo Oleícola Internacional (COI) para la extracción de los componentes menores polares de naturaleza biofenólica de aceites de oliva [19], la cual se describe a continuación: se pesaron aprox. 2.0 g de aceite de oliva en un tubo de

centrifuga y se adicionaron 5.0 mL de solución de extracción constituida por una mezcla metanol/agua (80:20 v/v). Se agitó durante 1 min en vórtex y posteriormente se extrajo en baño de ultrasonido a temperatura ambiente por 15 min. Enseguida se centrifugó a 5000 rpm durante 25 min. Transcurrido este tiempo se separaron las fases y el extracto se filtró en un acrodisco de 0.45  $\mu\text{m}$ , del filtrado se tomó el volumen necesario para preparar una solución cuya señal entrará dentro de la curva de calibración preparada en medio metanol/agua (cuya construcción se localiza en la 4.9.4.1). Se realizaron tres extracciones por cada muestra.

#### 4.9.4. Comparación de las señales en medio acuoso y metanol/agua.

A partir de la dilución de la solución madre de ácido tánico de 670.12  $\mu\text{mol/L}$  (1140  $\mu\text{g/mL}$ ) se prepararon tres estándares de concentración 9.43  $\mu\text{mol/L}$  (16.05  $\mu\text{g/mL}$ ), uno aforado con agua destilada, otro en metanol/agua (60:40 v/v) y un último en metanol/agua (80:20 v/v). Para cada estándar se desarrolló por triplicado el producto de reacción en el microdispositivo a las condiciones óptimas y se registró la absorbancia. Posteriormente, mediante la aplicación de pruebas de hipótesis se determinó si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las señales obtenidas con el estándar en medio acuoso y las señales en metanol/agua.

##### 4.9.4.1. Construcción de la curva de calibración en metanol/agua (80:20 v/v) en lote.

Empleando matraces volumétricos de 5.0 mL, se prepararon estándares de ácido tánico de 0.29 a 5.90  $\mu\text{mol/L}$  (0.5 a 10.03  $\mu\text{g/mL}$ ), a través de la dilución de una solución estándar de ácido tánico de concentración 29.48  $\mu\text{mol/L}$  (50.15  $\mu\text{g/mL}$ ). La preparación de todos los estándares se realizó en paralelo, partiendo de la solución más diluida a la más concentrada, para lo cual se adicionaron las soluciones en el siguiente orden: **(1)** el volumen necesario del estándar de ácido tánico, **(2)** 1.0 mL de la solución amortiguadora de carbonatos 0.75 mol/L pH 10.6, **(3)** 1.0 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu 0.02 mol/L y **(4)** se llevó hasta la marca de aforo con metanol/agua (80:20 v/v).

Se esperó un tiempo de 40 min para el desarrollo del producto de reacción colorido y enseguida se midió la absorbancia de cada estándar por triplicado a  $\lambda = 730 \text{ nm}$  llenando una celda de cuarzo (1 cm de paso óptico) y empleando como blanco solución amortiguadora con reactivo de Folin-Ciocalteu en metanol/agua (80:20 v/v).

La curva de calibración se preparó diariamente durante tres días y con las señales registradas se construyó una sola curva con el *software* STATGRAPHICS.

#### 4.10. Eficiencia de extracción.

En primer lugar, se emplearon dos estándares de clorofenol, el 2,4,6-Triclorofenol (2,4,6-TCF) y 2,4-Diclorofenol (2,4-DCF) para realizar pruebas y seleccionar el compuesto con el que se extrajera más utilizando el microdispositivo con diseño 4. Para ello, se prepararon soluciones en n-hexano de 2,4,6-TCF a una concentración de 0.076 mmol/L y 2,4-DCF a una concentración de 0.092 mmol/L (ambas a una concentración de 15.00 µg/mL), y bajo las condiciones óptimas de extracción (sección 4.8.) se realizó la extracción por duplicado. Por último, se comparó de manera cualitativa la señal registrada para cada estándar.

##### 4.10.1. Extracción con el estándar 2,4-Diclorofenol.

Se evaluaron las tres metodologías de extracción (sección 4.9.) utilizando 2,4-DCF; con este fin se preparó una solución madre en n-hexano a una concentración de 14.27 mmol/L (2326.50 µg/mL), a partir de la cual se elaboraron diferentes diluciones de acuerdo con la metodología empleada:

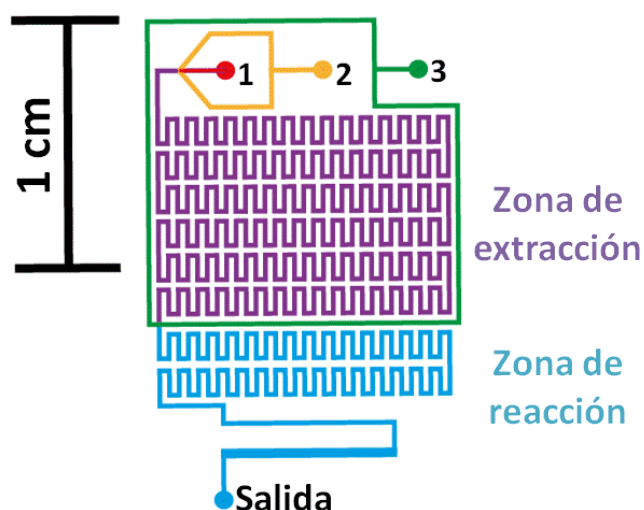
- a) Extracción en el microdispositivo. De la solución madre se tomaron 215 µL y se llevaron a un aforo de 5.0 mL con n-hexano, de esta última se realizó una nueva dilución adicionando 1.0 mL en 5.0 mL de n-hexano para obtener una concentración de 0.12 mmol/L (20.01 µg/mL). Se realizó la extracción del estándar en el microchip por triplicado midiendo la absorbancia.
- b) Extracción Bonoli et al. En un matraz volumétrico de 10.0 mL se adicionó 1.0 mL de la solución madre y se llevó a la marca de aforo con n-hexano para preparar una solución de concentración 1.43 mmol/L (232.65 µg/mL), de ésta se agregaron 2.0 mL en el tubo de centrifuga y se siguió el mismo procedimiento descrito para las muestras de aceite de oliva, ejecutando la extracción por triplicado y midiendo la absorbancia.
- c) Extracción COI. Se tomaron 2.0 mL de la solución madre y se llevaron al aforo a 10.0 mL con n-hexano obteniendo una concentración de 2.85 mmol/L (465.30 µg/mL), de ésta se adicionaron 2.0 mL en el tubo de centrifuga llevando a cabo la extracción tal como se describió para las muestras de aceite de oliva. La metodología se realizó por triplicado y se registró la absorbancia.

La cuantificación del estándar de 2,4-DCF se refirió a miligramos equivalentes de ácido tánico por litro de solución (mgEÁT/L). Enseguida se calculó el porcentaje de recuperación dividiendo la concentración cuantificada entre la concentración real y multiplicando el resultado por 100.

## 5. Resultados y discusión

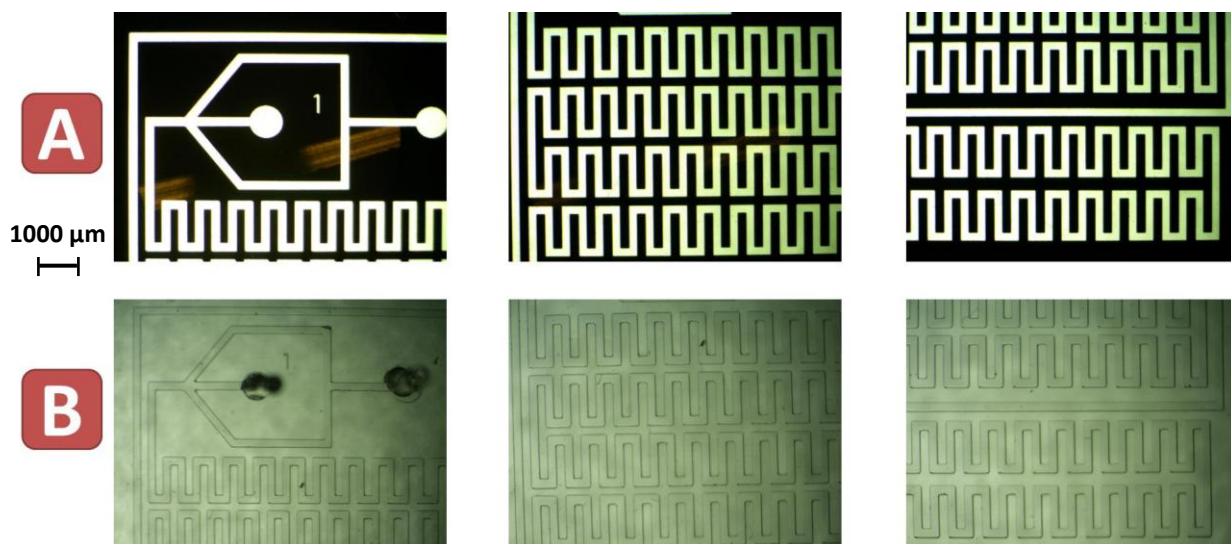
### 5.1. Fabricación y caracterización de los microchips.

El diseño de los microcanales se efectuó considerando tres partes principales (**Figura 37**): (1) Zona de extracción, donde se introducen la muestra de aceite de oliva junto con la solución amortiguadora de carbonatos, abarcando desde su mezclado hasta antes de la entrada del reactivo de Folin-Ciocalteu. La finalidad es lograr que los polifenoles al exponerse a medio básico sean desprotonados y extraídos hacia la fase acuosa debido a su afinidad. (2) Zona de reacción, donde se incorpora el reactivo de Folin-Ciocalteu para la formación del producto de reacción. (3) Salida del microdispositivo, para la posterior recolección en vial.



**Figura 37.** Diseño de los microdispositivos fabricados para la extracción líquido-líquido de polifenoles en aceite de oliva virgen extra. Se aprecian tres entradas al microchip para la inyección de los reactivos y muestra que se identifican de la siguiente manera: (1) solución amortiguadora de carbonato, color rojo; (2) muestra de aceite de oliva, color naranja y (3) reactivo de Folin-Ciocalteu, color verde. Hay un orificio extra para la salida y recolección del producto de reacción. Asimismo, se identifican dos zonas: la zona color morado corresponde a la zona de extracción mientras que la zona color azul a la zona de reacción.

En cuanto a la observación al microscopio del diseño en negativo para su posterior uso como máscara durante el proceso fotolitográfico, no se distinguieron ningún tipo de imperfecciones como pequeñas manchas en la parte positiva de la impresión del acetato que pudieran ser transferidas al molde, por lo que los microcanales de los microchips fabricados estuvieron bien definidos y sin irregularidades. Las imágenes de una sección de la impresión en acetato con su respectivo análogo del microchip en PDMS y la comparación entre la máscara de acetato y el molde construido se encuentran en la **Figura 38 y 39**, respectivamente.



**Figura 38.** Microdispositivo diseño 4, medidas del microcanal aprox. 200  $\mu\text{m}$  de ancho x 100  $\mu\text{m}$  profundidad. Objetivo 10x. **A)** Máscara de acetato impresa en negativo y **B)** Microdispositivo de PDMS.



**Figura 39.** Máscara de acetato (izquierda) y molde con PDMS construido (derecha).

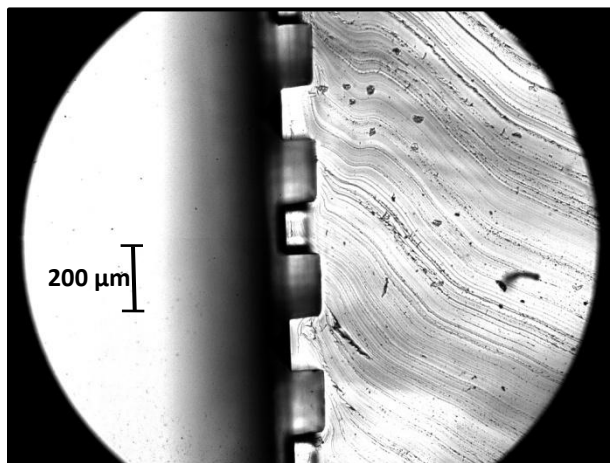
Los resultados de la caracterización de los microchips se muestran en la **Tabla 10**, es importante recalcar que la longitud del serpentín de extracción se midió desde la mezcla de la solución amortiguadora de carbonato y la muestra de aceite hasta antes de la adición del reactivo de Folin-Ciocalteu, mientras que la longitud del serpentín de reacción corresponde desde la entrada del reactivo de Folin-ciocalteu hasta la salida del microchip; la longitud total de los microcanales es la suma de las dos longitudes anteriores más las entradas de los reactivos y muestra antes de ser mezclados.

En la **Figura 40** se muestra un ejemplo de las fotos tomadas de la sección transversal para la medición de la profundidad y ancho de los microcanales, en las cuales es más notoria su forma rectangular definida y sin ningún tipo de defecto en el contorno. Mientras que en la **Figura 41**, se localiza la imagen de los microdispositivos una vez pegados sobre la superficie de vidrio, debido al tamaño de los microdispositivos (2.0 cm de ancho x 2.7 cm de largo) fue posible colocar un máximo de 3 microchips por portaobjeto (3.8 cm de ancho x 7.5 cm de largo).

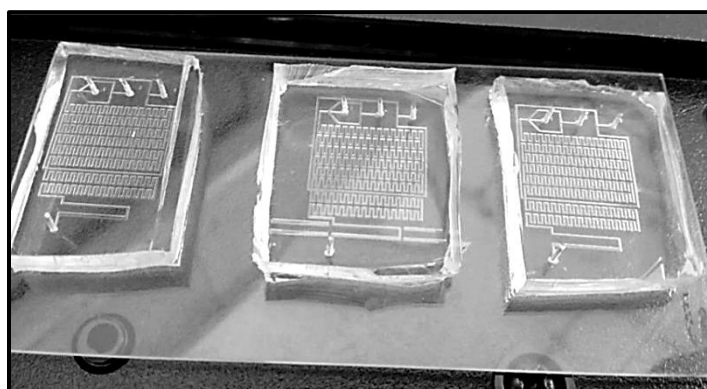
**Tabla 10.** Caracterización de los microdispositivos de los diseños presentados en la Figura 29.

Diseño	Ancho ( $\mu\text{m}$ )	Profundidad ( $\mu\text{m}$ )	LSE (cm)	LSR (cm)	LT (cm)	VT ( $\mu\text{L}$ )
1	$95.54 \pm 2.22$	$91.18 \pm 6.29$	0.75	2.60	5.34	0.46
2	$96.78 \pm 1.97$	$94.45 \pm 7.24$	0.97	2.60	5.53	0.50
3	$211.23 \pm 4.76$	$104.37 \pm 6.18$	4.63	10.74	20.66	4.53
4	$219.42 \pm 5.63$	$100.46 \pm 7.63$	26.36	10.75	44.10	9.66
5	$196.743 \pm 4.59$	$110.39 \pm 6.19$	34.22	36.19	75.07	16.27
6	$201.48 \pm 3.45$	$106.872 \pm 8.29$	70.57		74.41	15.85

\*LSE: Longitud serpentín de extracción, LSR: Longitud serpentín de reacción, LT: Longitud total, VT: Volumen total.



**Figura 40.** Vista al microscopio del corte transversal de los microcanales del microchip diseño 4.



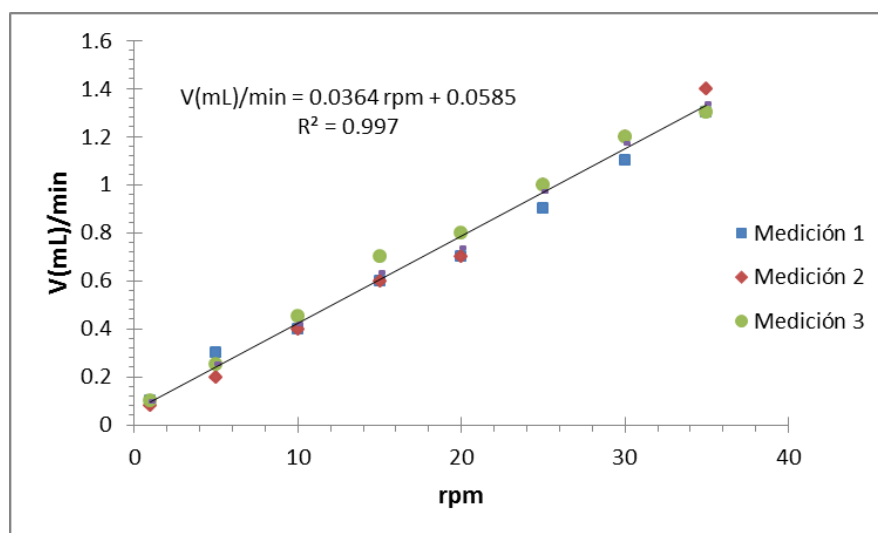
**Figura 41.** Microdispositivos diseño 4 de PDMS pegados sobre superficie de vidrio.

## 5.2. Estudios previos.

Los estudios previos se realizaron con el objetivo de evaluar el funcionamiento de la bomba peristáltica y de jeringa para un correcto desarrollo experimental, así como realizar pruebas sobre el reactivo de Folin-Ciocalteu, los estándares de ácido fenólico e intentando la extracción líquido-líquido de los compuestos fenólicos con detección en el mismo microchip con el fin de proponer la metodología de extracción y cuantificación.

### 5.2.1. Calibración de la bomba peristáltica.

El gráfico de  $V(\text{mL})/\text{min}$  vs. rpm construido a partir de la medición por triplicado del volumen dispensado por una tubería de tygon de 0.76 mm ID se presenta a continuación. En él se aprecia la ecuación de la recta que relaciona de manera proporcional el caudal (mL/min) en función de las rpm, de esta manera fue posible trabajar a al caudal por minuto deseado ajustando las rpm en la bomba peristáltica.



**Gráfica 1.** Curva de calibración del volumen (mL)/min en función de rpm de la bomba peristáltica para una tubería de tygon de 0.76 mm ID.

### 5.2.2. Evaluación del caudal de las bombas de jeringa.

Los resultados del caudal experimental de las tres bombas empleando jeringas de 5.0 mL (10.3 mm ID) y con un flujo programado de 40  $\mu\text{L}/\text{min}$ , se muestran en la **Tabla 11**. Con base en lo especificado por el fabricante (New era Pump Systems), para tener un buen funcionamiento del aparato, es permitida una variación máxima de  $\pm 1\%$  del caudal programado (desde 39.60 hasta 40.40  $\mu\text{L}/\text{min}$ ); en este caso las diferencias entre el caudal programado y el experimental para las tres bombas son 0.12, -0.08 y 0.16  $\mu\text{L}/\text{min}$ , respectivamente, dichos valores únicamente representan el 0.30, 0.20 y 0.40 % de variación del flujo programado, concluyéndose que el

caudal especificado en la bomba de jeringa y el caudal experimental son estadísticamente iguales.

**Tabla 11.** Evaluación del caudal dispensado de agua destilada con tres bombas de jeringa.

Bomba	Caudal programado ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	Caudal experimental ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )				Diferencia ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )
		Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio	
1	40.00	40.08	40.11	40.16	40.12	0.12
2	40.00	39.92	39.98	39.86	39.92	- 0.08
3	40.00	40.18	40.11	40.19	40.16	0.16

### 5.2.3. Estabilidad del reactivo de Folin-Ciocalteu en medio básico.

Este estudio demostró la baja estabilidad del reactivo de Folin-Ciocalteu en medio básico. Dicho reactivo al ser diluido a una concentración 0.2 mol/L en medio acuoso presentó una coloración amarillo claro que se mantuvo estable con el paso del tiempo, sin embargo, cuando se preparó la solución a la misma concentración, pero aforando con NaOH 0.5 mol/L, la coloración, inicialmente amarilla, fue disminuyendo en función del tiempo hasta quedar completamente transparente después de 10 min. La pérdida del color también significó la pérdida de su capacidad oxidante. Cuando la reacción se hizo con la solución de Folin-Ciocalteu en NaOH recién preparada se obtuvo el color azul característico de la reducción del reactivo, pero si la reacción se hacía con la solución del reactivo de Folin-Ciocalteu una vez que había perdido el color amarillo no había formación del producto de reacción.

Lo anterior ayudó a la formulación del diseño del microdispositivo, ya que en un principio se contempló la idea de tener únicamente dos entradas, una para la muestra de aceite de oliva y otra para el reactivo de Folin-Ciocalteu a un pH básico, la cual fue descartada, decidiéndose finalmente que la configuración de los microcanales contaría con entradas independientes para el reactivo de Folin-Ciocalteu y la solución de pH básico.

### 5.2.4. Pruebas de solubilidad de ácido tánico, gálico y cafeico.

Se efectuaron las pruebas de solubilidad de tres estándares de compuestos fenólicos en dos disolventes orgánicos (n-hexano y cloroformo) y en la misma muestra de aceite de oliva. Con la finalidad de proponer la construcción de la curva de calibración, ya sea por patrón externo (extrayendo el estándar disuelto en la fase orgánica) o por adición patrón (adicionando el estándar en la misma muestra de aceite). Los resultados mostraron nula solubilidad de los estándares en cualquiera de los tres medios probados, teniendo como consecuencia que la curva de calibración no pudiera realizarse por las dos formas anteriormente descritas; decidiendo que tendría que construirse por patrón externo en medio acuoso, es decir, en el



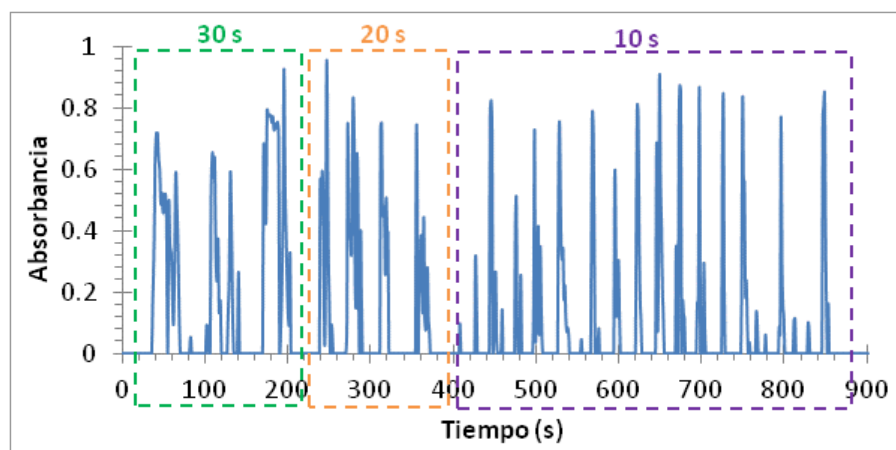
microdispositivo se incorporaría el estándar diluido en agua destilada para su reacción a un valor de pH básico con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

### 5.2.5. Estudio de extracción de polifenoles con detección en el microchip.

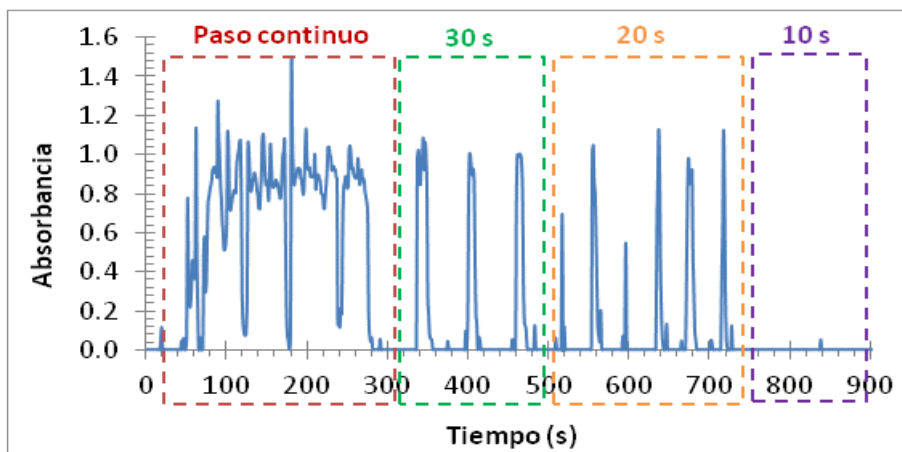
Una vez fabricados los primeros prototipos de microdispositivos, se decidió comenzar con las pruebas de extracción con dos finalidades: corroborar que dentro de los microcanales era posible la separación de la fracción fenólica y el desarrollo del producto de reacción, así como intentar realizar la detección *in situ* acoplando fibras ópticas en el mismo microchip.

A primera instancia fue visible el desarrollo del producto colorido a la salida del microchip diseño 1, por lo que se obtuvieron sus señales de absorbancia al hacer ingresar por diferente tiempo (30 s, 20 s y 10 s) a un caudal de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  la solución de la muestra de aceite de oliva en n-hexano. Se esperaban obtener picos bien definidos con un máximo de absorbancia, sin embargo, éstos eran irregulares y en algunos casos no reproducibles; las “mejores” señales se lograron inyectando la muestra de aceite por un tiempo de 10 s, véase **Gráfica 2**. En cuanto a los resultados de la inyección de n-hexano puro (**Gráfica 3**), también se observa la formación de picos irregulares al ingresar el disolvente por 30 y 20 s con una absorbancia mucho mayor que la dada por la muestra de aceite; no obstante, la incorporación de n-hexano durante 10 s no dio señales apreciables.

Debido a que el disolvente puro también presentó señales de absorbancia pese a que no reacciona con el reactivo de Folin-Ciocalteu a pH básico, no puede ocuparse la detección dentro del microdispositivo sin realizar una previa separación de fases, ya que lo que realmente se detecta es el cambio de medio entre agua y n-hexano/aceite.



**Gráfica 2.** Señales obtenidas para la extracción y detección *in situ* de la fracción fenólica de la muestra de aceite de oliva virgen extra a diferente tiempo de inyección (caudal 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ), empleando el microchip diseño 1.



**Gráfica 3.** Señales obtenidas para la inyección a 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  de n-hexano puro a diferente tiempo, empleando el microchip diseño 1 con detección *in situ*.

Con base en los resultados anteriores, se tomó la decisión de realizar únicamente la extracción en el microchip y acoplar la detección espectrofotométrica fuera de éste empleando una celda de flujo en forma de Z acoplando fibras ópticas, después de separar manualmente las fases orgánica y acuosa.

### 5.3. Optimización de la extracción líquido-líquido en el microdispositivo.

#### 5.3.1. Fundamento de la extracción.

La metodología de extracción líquido-líquido de la fracción fenólica del aceite de oliva propuesta, se fundamenta en la desprotonación de los polifenoles en medio básico al sobrepasar su valor de  $\text{pK}_a$  para formar iones fenóxido, los cuales, al encontrarse cargados negativamente, presentan una mayor afinidad hacia la fase acuosa (solución amortiguadora de carbonatos 0.75 mol/L pH 10.6), logrando su extracción del aceite.

En la **Figura 42** se encuentra la escala lineal de zonas de predominio para el fenol, ejemplificando la formación del anión fenóxido al trabajar a un pH por encima del valor de  $\text{pK}_a$ , en este caso arriba de 10.0. No obstante, el valor de  $\text{pK}_a$  de los polifenoles contenidos en la fracción minoritaria del aceite de oliva varía en función de los grupos funcionales adicionales en la molécula, disminuyendo o incrementando la acidez de los protones y por lo tanto su valor de  $\text{pK}_a$ ; de manera práctica se considera un pH por encima de 10.0 para lograr su desprotonación.

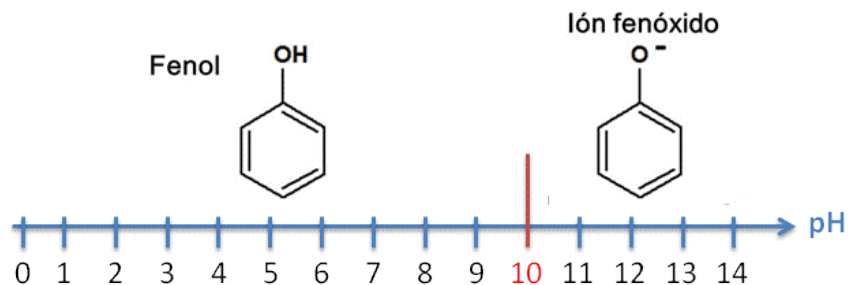


Figura 42. Escala lineal de zonas de predominio para el fenol.

### 5.3.2. Diseño de experimentos factorial completo $2^4$ .

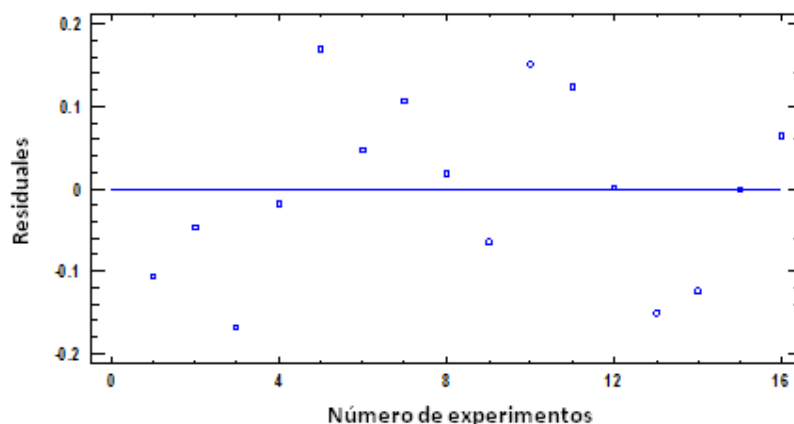
El diseño de experimentos se realizó con la finalidad de determinar qué factores de los seleccionados son estadísticamente significativos al momento de realizar la extracción y posterior cuantificación de los polifenoles, buscando así la optimización de la metodología al considerar todas las posibles combinaciones entre los factores en cuestión. Los resultados de los 16 experimentos realizados se contienen en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Resultados de la matriz de diseño.

No. Experimento	[NaOH] mol/L	[Reactivo Folin] mol/L	Caudal $\mu\text{L}/\text{min}$	Microchip	Absorbancia
1	-1	1	-1	-1	0.239
2	1	-1	-1	-1	0.805
3	-1	-1	1	-1	0.755
4	1	1	1	-1	0.870
5	1	1	-1	1	0.917
6	-1	1	1	1	0.131
7	1	-1	1	1	1.379
8	-1	-1	-1	1	0.542
9	-1	1	-1	1	0.344
10	-1	-1	-1	-1	0.934
11	-1	1	1	-1	0.298
12	1	1	-1	-1	0.944
13	1	1	1	1	0.810
14	1	-1	-1	1	0.628
15	-1	-1	1	1	0.927
16	1	-1	1	-1	1.591

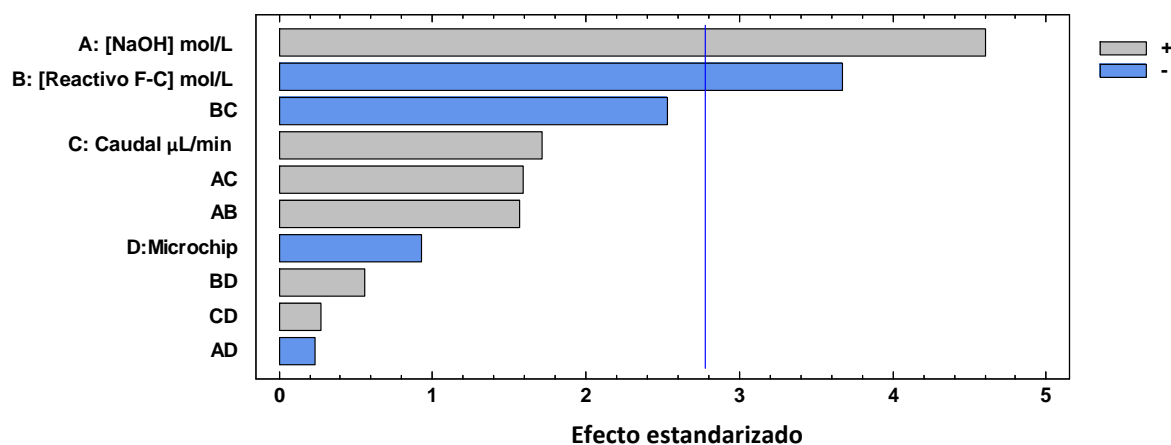
Por medio del *software* STATGRAPHICS se realizó el tratamiento de los datos a través de un ANOVA teniendo como objetivo maximizar la respuesta analítica (absorbancia). De esta manera se obtuvo una ecuación de regresión codificada en términos de 1 y -1 (**Anexo 1**) con la que se predicen los valores teóricos de los experimentos realizados. Posteriormente se analizaron los residuales (diferencia entre el valor predicho y observado) en función del número de

experimento realizado (**Gráfica 4**) sin observar ningún tipo de tendencia que diera indicio de errores sistemáticos que pudieran haberse cometido.

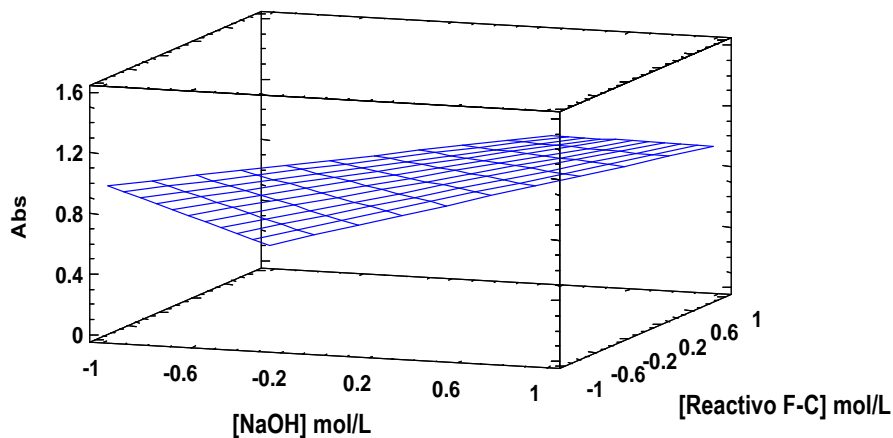


**Gráfica 4.** Análisis de residuales en función del número de experimento del diseño factorial completo  $2^4$ .

Posteriormente con el diagrama de Pareto estandarizado para la absorbancia (**Gráfica 5**), se determinó, con un nivel de significancia de 95 %, qué factores influyen de manera positiva o negativa sobre la respuesta. Aquellos factores que no afecten significativamente la extracción se localizan por debajo a la línea perpendicular a las barras, mientras los que sobrepasan dicho límite, son considerados estadísticamente significativos; en este caso, para los diseños 1 y 2 de los microdispositivos, los únicos factores que influyen en la extracción son la concentración de NaOH y de reactivo de Folin-Ciocalteu, alcanzando la mayor absorbancia cuando la concentración de NaOH es mayor (1) y el reactivo de Folin-Ciocalteu se encuentra menos concentrado (-1), sin embargo, al invertir las concentraciones (NaOH -1 y reactivo F-C 1), la respuesta obtenida es mínima, comportamiento que puede apreciarse en el gráfico de superficie de respuesta estimada en función de ambos parámetros, véase **Gráfico 6**.



**Gráfica 5.** Diagrama de Pareto estandarizado para la absorbancia. Diseño de experimentos factorial completo  $2^4$  para la optimización de la extracción líquido-líquido en los microdispositivos diseño 1 y 2.

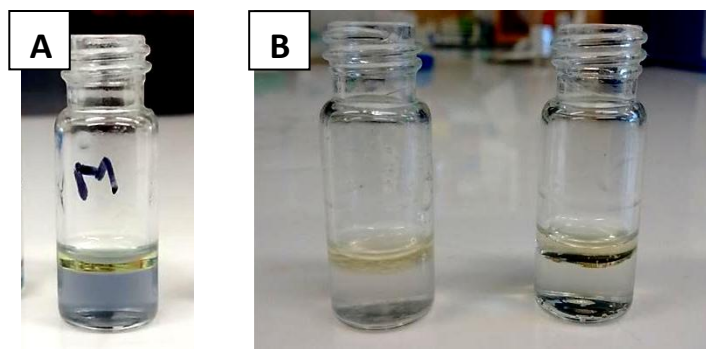


**Gráfica 6.** Superficie de respuesta estimada en función de la concentración de NaOH y reactivo de Folin-Ciocalteu a un caudal fijo de 40  $\mu\text{L}/\text{min}$  con el microdispositivo diseño 1.

El diseño de los microdispositivos no tuvo efecto significativo sobre la señal registrada, debido a que la única diferencia entre los diseños 1 y 2 es la longitud del serpentín de extracción, 0.75 y 0.97 cm respectivamente, siendo tan pequeña (0.22 cm) que no tiene impacto en la extracción. El caudal tampoco fue estadísticamente significativo, por lo que de manera práctica se decidió emplear un flujo de 40  $\mu\text{L}/\text{min}$ , puesto que se requiere menor cantidad de tiempo para recolectar el volumen de extracto necesario para realizar la detección en la celda de flujo. Es importante mencionar que las interacciones entre los factores estudiados tampoco resultaron estadísticamente significativas.

De acuerdo con la serie de experimentos, las condiciones óptimas de extracción se alcanzan con la solución de NaOH 0.5 mol/L y reactivo de Folin-Ciocalteu 0.04 mol/L, sin embargo, se apreció que al realizar las extracciones se formaba cierta turbidez en la fase acuosa recolectada, sobre todo al incrementar la concentración de NaOH, posiblemente debido al proceso de saponificación en medio muy alcalino de ácidos grasos contenidos en el aceite de oliva.

En la **Figura 43A** se muestra un ejemplo del producto de reacción de la fracción fenólica extraída con presencia de turbidez, mientras que en la **Figura 43B** se compara la recolección de los extractos haciendo pasar a través de los microcanales únicamente aceite de oliva y solución de NaOH 0.5 mol/L, así como aceite de oliva y reactivo de Folin-Ciocalteu 0.04 mol/L. Como se aprecia en la imagen, únicamente al mezclar la solución de NaOH y aceite de oliva se forma turbidez en el extracto, ya que el vial que contiene el extracto de reactivo de Folin-Ciocalteu y aceite de oliva se mantuvo translúcido, por lo que en los siguientes experimentos se modificó el pH y la naturaleza de la solución alcalina con la finalidad de erradicar por completo la turbidez, ya que ésta es un interferente sobrevalorando la absorbancia del producto de reacción cuando se realiza la detección espectrofotométrica.



**Figura 43.** A) Producto de reacción del extracto con presencia de turbidez.

B) Comparación de los extractos: aceite de oliva con solución de NaOH 0.5 mol/L (izquierda) y aceite de oliva con reactivo de Folin-Ciocalteu 0.04 mol/L (derecha).

### 5.3.3. Evaluación de la influencia del pH.

Los resultados del diseño de experimentos factorial completo  $2^4$  demostraron que las soluciones de NaOH y reactivo de Folin-Ciocalteu juegan un papel importante durante la extracción en el microdispositivo. Es importante hacer hincapié en la influencia del pH en la estabilidad de los polifenoles en el extracto, estudios demostraron que la acidificación del extractante metanólico con HCl incrementa la cantidad de compuestos fenólicos que serán cuantificados, sin embargo, cuando se emplea NaOH para alcalinizar al extractante, la formación de precipitado es inevitable debido a su baja estabilidad en medio fuertemente básico [119]. Con el objetivo de modificar esta situación se llevaron a cabo una serie de experimentos cualitativos en los que se varió la naturaleza de la solución básica así como el pH de extracción, éste último no pudo ser llevado a valores de pH ácidos debido a que la extracción y desarrollo del producto colorido con el reactivo de Folin-Ciocalteu se realizan en el mismo microdispositivos y la reacción requiere de un pH básico para llevarse a cabo.

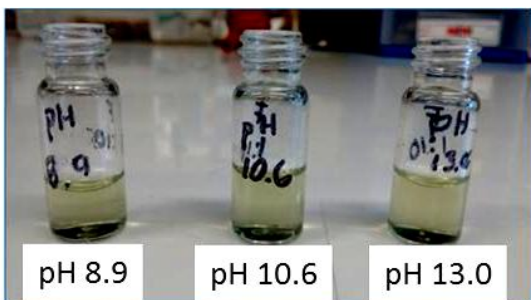
Al realizar las extracciones bajo los tres diferentes pH's con el reactivo de Folin-Ciocalteu 0.20 mol/L no hay desarrollo apreciable del producto de reacción de los polifenoles extraídos, lo anterior no implica que la fracción fenólica no está siendo extraída, sino más bien que el reactivo de Folin-Ciocalteu se encuentra tan concentrado que la coloración amarilla predomina sobre el poco producto formado; al disminuir la concentración a 0.04 mol/L es notoria la mejoría en cuanto a la aparición del color azul, obteniendo mayor coloración a un pH 10.6, sin embargo, la tonalidad del producto de extracción no es completamente azul, más bien azul-verdosa, lo que indica que la concentración de la solución de reactivo de Folin-Ciocalteu sigue siendo un interferente en la coloración final.

Ejecutando la extracción empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu diluido hasta una concentración 0.02 mol/L a un pH 10.6 fue posible eliminar por completo el inconveniente

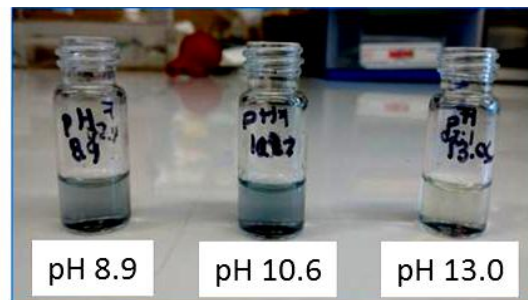
provocado por la coloración amarilla del reactivo sobre el producto de reacción de los extractos, apreciándose una tonalidad en su totalidad azul.

Así, el mejor resultado se obtiene al realizar la extracción en el microchip utilizando la solución amortiguadora de carbonato 0.1 mol/L pH 10.6 y la concentración de reactivo de Folin-Ciocalteu 0.02 mol/L, logrando eliminar por completo la turbidez.

Por otra parte, los resultados cualitativos de las extracciones demostraron que una vez recolectado el producto colorido en el vial, al trabajar bajo un flujo continuo, no se ha alcanzado el equilibrio de la reacción de Folin-Ciocalteu, lo que implica que el color azul sigue desarrollándose los siguientes minutos, situación que puede implicar una fuente de variación de las señales registradas de absorbancia, alterando la precisión de la metodología de extracción (Figura 44).



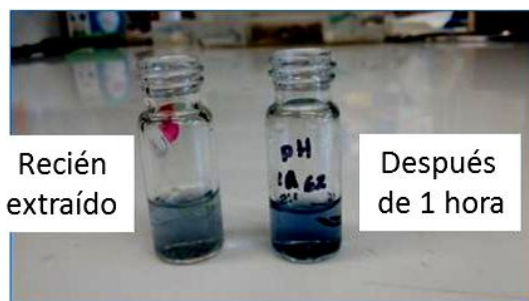
Extracciones a diferentes valores de pH con reactivo de Folin-Ciocalteu 0.20 mol/L



Extracciones a diferentes valores de pH con reactivo de Folin-Ciocalteu 0.04 mol/L



Extracciones a pH 10.6 con reactivo de Folin-Ciocalteu 0.04 y 0.02 mol/L



Comparación del desarrollo de la coloración en función del tiempo

**Figura 44.** Resultados cualitativos para la evaluación de la influencia del pH sobre la extracción de la fracción fenólica de aceite de oliva empleando el microdispositivo diseño 2 a un caudal de 40  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

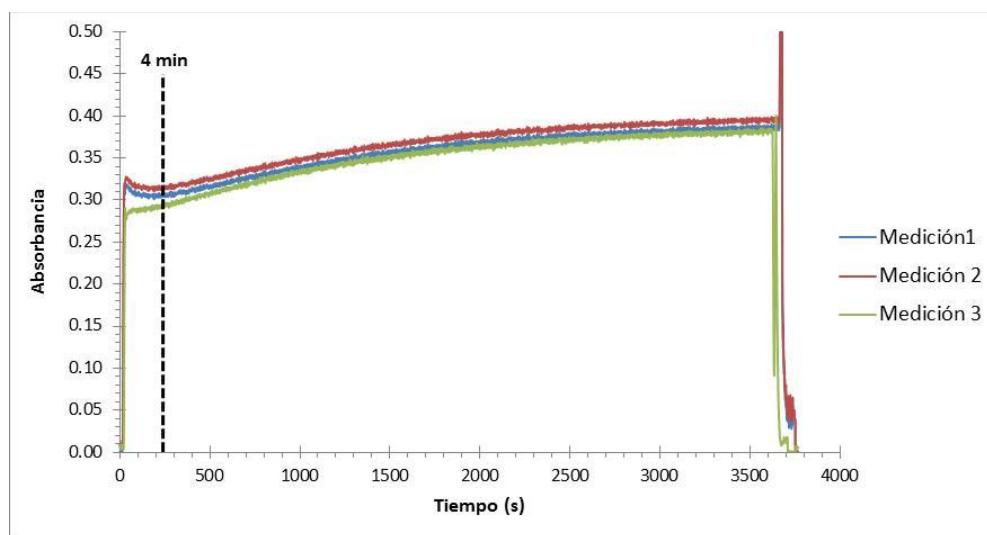
#### 5.3.4. Cinética de la reacción de Folin-Ciocalteu.

Los resultados de este estudio fueron de utilidad para seleccionar, en función del cambio en la absorbancia del producto de reacción del extracto con el tiempo, cuántos minutos había que esperar después de la recolección en el vial del producto de reacción para realizar su detección

y durante cuánto tiempo. Como se muestra en el **Gráfico 7**, la absorbancia se incrementó gradualmente alrededor de 0.10 unidades (de 0.30 a 0.40) después de una hora de medición. Aproximadamente durante los primeros 4 min (240 s) la señal se mantuvo estable, formando una pequeña meseta, para después aumentar gradualmente durante los 3600 s de medición; lo cual brinda dos alternativas para la detección del producto de reacción del extracto:

1. Medir la absorbancia inmediatamente después de la recolección en el vial.
2. Esperar al menos 40 min después de la recolección para tener un completo desarrollo del color.

En este caso, por fines prácticos se seleccionó la primera opción, ya que pese a que la reacción no ha alcanzado el equilibrio, es posible la obtención de señales reproducibles sin la necesidad de esperar por un tiempo prolongado, teniendo como única consecuencia una pequeña disminución en la sensibilidad de la metodología. Así, se decidió introducir el producto de reacción a la celda de flujo inmediatamente después de haber terminado el tiempo de recolección y se midió la absorbancia durante los 4 min en que la señal no tiene grandes variaciones.



**Gráfica 7.** Cinética de la reacción de Folin-Ciocalteu con el extracto de polifenoles de aceite de oliva virgen extra durante un tiempo de 1 h.

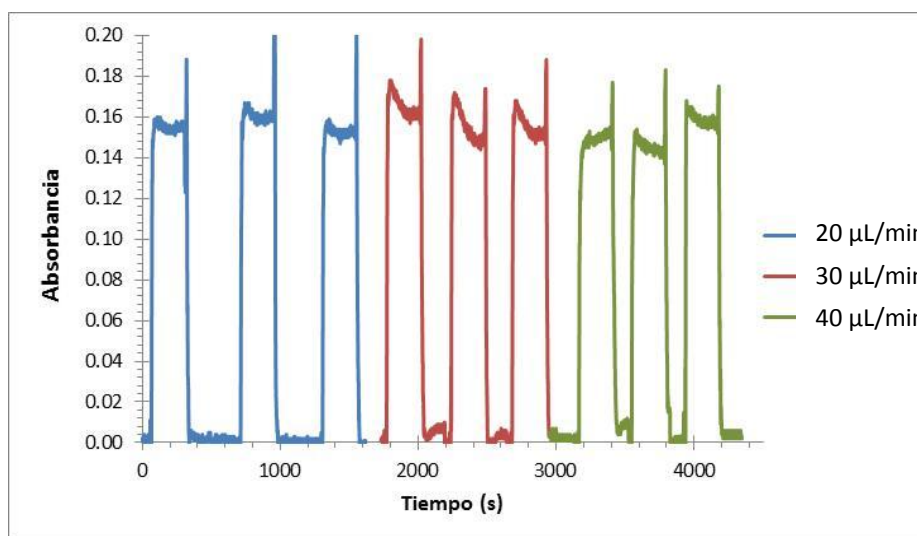
### 5.3.5. Efecto del caudal sobre la extracción.

Anteriormente, con el diseño de experimentos factorial completo  $2^4$ , se había considerado al caudal como un parámetro no significativo sobre la extracción, no obstante, cabe recordar que algunas de las mediciones se realizaron con presencia de turbidez, por lo que se decidió repetir el estudio de la influencia del caudal sobre la extracción con las nuevas condiciones de extracción (sección 4.5.5.).



Los resultados de las señales registradas para los tres diferentes caudales se localizan en la **Gráfica 8**, a simple vista puede parecer que las 9 respuestas son estadísticamente iguales, pero para corroborarlo se llevó a cabo una comparación de muestras múltiples obteniéndose la tabla ANOVA (**Tabla 13**), descomponiendo la varianza de los datos en dos componentes: entre grupos y dentro de los grupos, en donde la razón-F es la relación del cuadrado medio calculado entre grupos y dentro de grupos. Debido a que el valor-P de la prueba de Fisher es mayor a 0.05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de absorbancia obtenidas por los tres caudales con un nivel de confianza de 95 %.

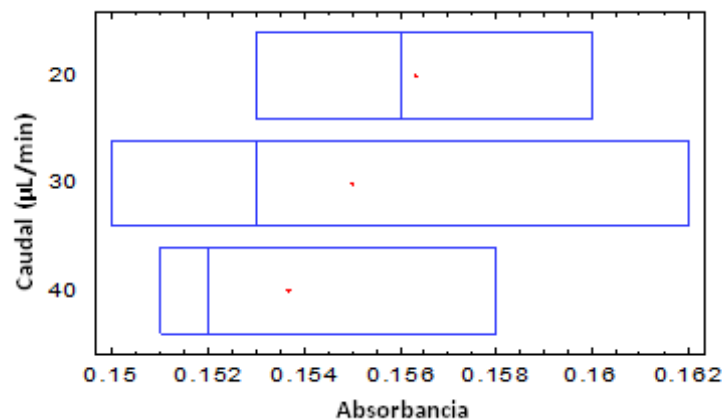
El diagrama de cajas (**Gráfica 9**), muestra la distribución y el comportamiento de los datos, observándose una mayor dispersión de los mismos a un caudal de 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  debido en su totalidad al error aleatorio, sin embargo, también se aprecia claramente al comparar los flujos que no hay diferencia entre las absorbancias obtenidas, con lo que se corrobora que la respuesta no es dependiente del caudal seleccionado. Así, se decidió trabajar con el caudal de 40  $\mu\text{L}/\text{min}$  para disminuir el tiempo de recolección en el vial.



**Gráfica 8.** Señales registradas a tres diferentes caudales ( $\mu\text{L}/\text{min}$ ).

**Tabla 13.** Análisis de varianza (ANOVA) de la señal a diferentes caudales.

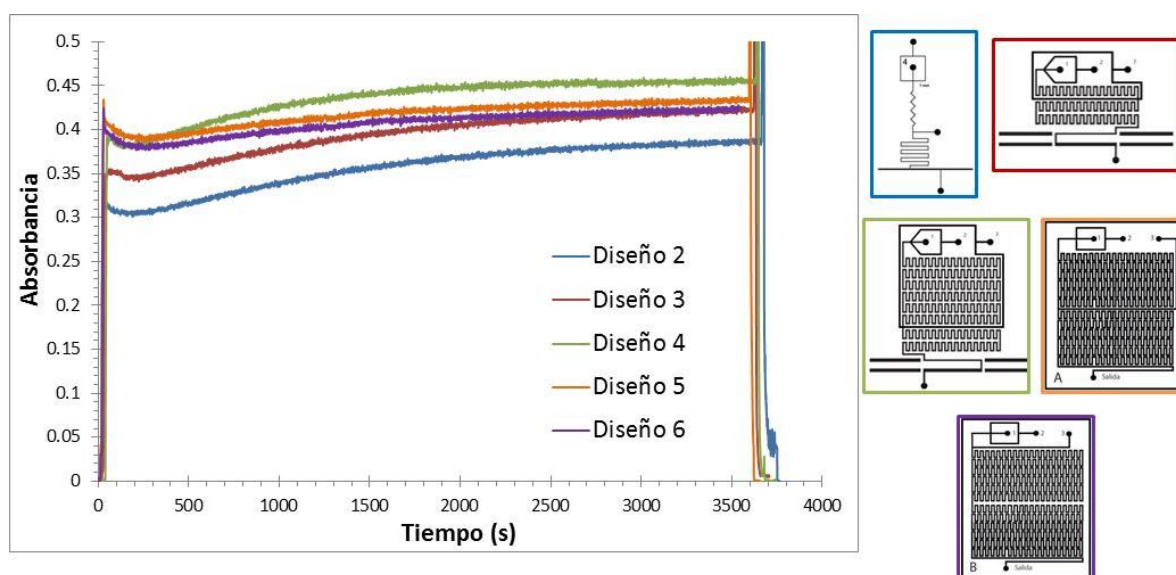
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	$1.06667 \times 10^{-5}$	2	$5.33333 \times 10^{-6}$	0.24	0.7912
Dentro de grupos	$1.31333 \times 10^{-4}$	6	$2.18889 \times 10^{-5}$		
Total (Corr.)	0.000142	8			



**Gráfica 9.** Diagrama de cajas para la respuesta a diferentes caudales ( $\mu\text{L}/\text{min}$ ).

### 5.3.6. Estudio de la longitud de los microcanales de extracción y reacción.

En la **Gráfica 10** se muestran los resultados que demuestran que la señal analítica aumentó al incrementar la longitud del serpentín de extracción, es decir, cuanto mayor sea el tiempo de contacto entre la solución amortiguadora de carbonato y la solución de aceite, la extracción es favorecida (comparación de los microdispositivos diseños 2, 3 y 4). Por su parte, las señales de los microchips identificados como diseño 5 y 6 muestran que no hay diferencia significativa entre ingresar el reactivo de Folin-Ciocalteu junto con la solución de aceite de oliva y amortiguadora de carbonatos o hacerlo después ya que las respuestas obtenidas son muy parecidas. Además al analizar los diseños 4, 5 y 6 se aprecia que, pese a la diferencia en la longitud de los microcanales, no existe un aumento proporcional de la respuesta, lo que sugiera que se ha alcanzado el máximo de extracción como se explica más adelante.



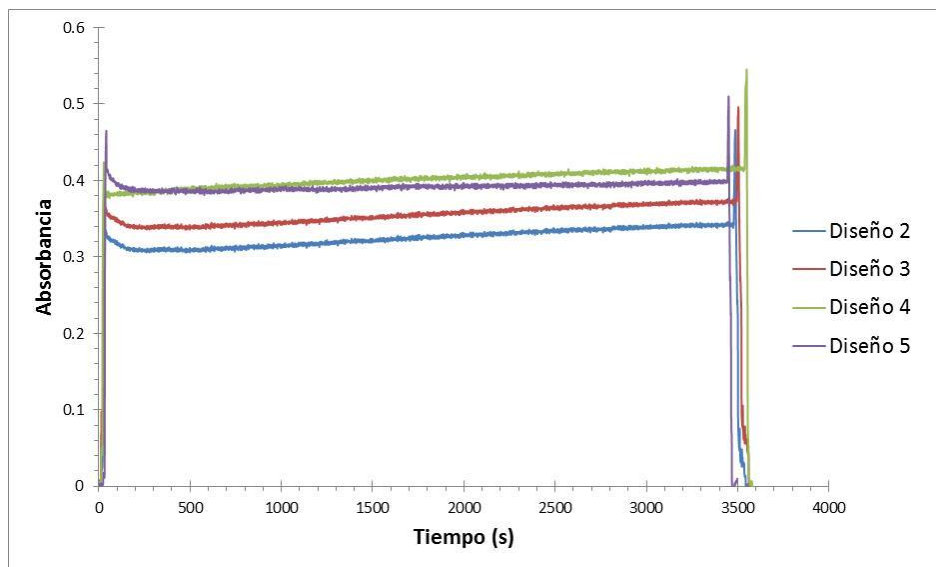
**Gráfica 10.** Estudio de la influencia de la longitud del serpentín de extracción y reacción sobre la señal.

Dado que la longitud del microcanal de extracción está relacionada con la respuesta de absorbancia registrada, se decidió realizar una serie de experimentos para conocer qué tanto debería incrementarse para obtener la máxima extracción con el microdispositivo. Para ello se emplearon los diseños 2 a 5 realizando únicamente la extracción de la fracción fenólica sin la adición del reactivo de Folin-Ciocalteu, de esta manera se incrementó la longitud del serpentín de extracción sin la necesidad de crear nuevos prototipos de microdispositivos. En la **Tabla 14** se muestran las longitudes del serpentín de extracción estudiadas. Los extractos recolectados de cada diseño se ingresaron al microchip diseño 1 para obtener el producto de reacción colorido que fue detectado en la celda de flujo durante 60 min.

Los resultados mostraron que para los microdispositivos 2, 3 y 4 la extracción aumentó conforme aumentaba la longitud (**Gráfica 11**). Sin embargo, al emplear el diseño 5, cuya longitud de serpentín de extracción casi duplica al diseño 4, se observa que no hay diferencia significativa con los resultados del dispositivo 4; así, a pesar de seguir incrementando la longitud ya no será posible extraer más. Por lo tanto se decidió seleccionar el diseño 4 como óptimo.

**Tabla 14.** Longitud del serpentín de extracción (LSE) estudiada en los experimentos.

Diseño Microchip	2	3	4	5
LSE (cm)	3.57	15.37	37.11	70.41

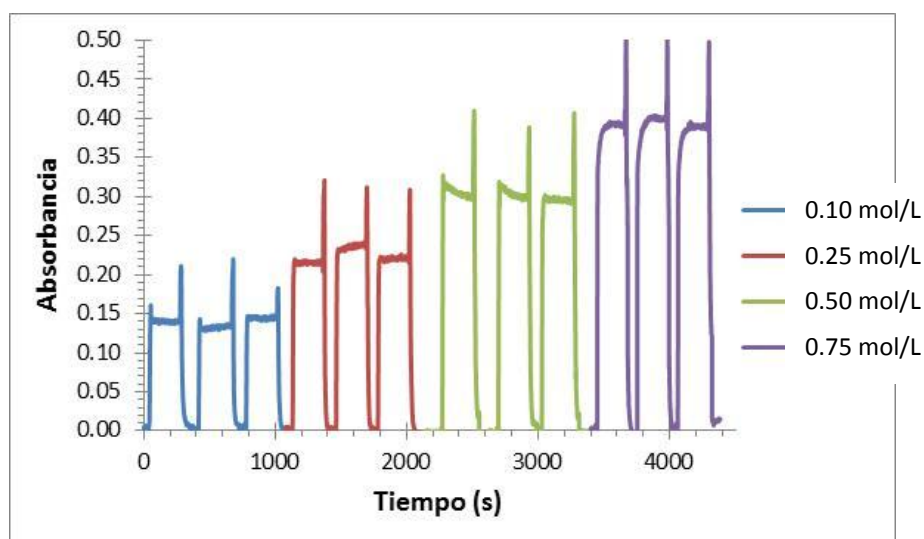


**Gráfica 11.** Estudio de la longitud del serpentín de extracción para alcanzar la máxima extracción.

### 5.3.7. Influencia de la concentración de la solución amortiguadora.

El incremento o disminución de la concentración de la solución amortiguadora de carbonato pH 10.6 influye directamente en la extracción, ya que esto implica una modificación de su fuerza iónica, que es una medida del efecto de las interacciones ión-ión y ión-solvente en una solución electrolítica, matemáticamente se define como *un medio de la sumatoria de la concentración molar de cada ión multiplicada por el cuadrado de su carga*.

En este caso, el aumento en la concentración y fuerza iónica de la solución amortiguadora afecto positivamente la extracción de los polifenoles, como se aprecia en la **Gráfica 11**, y por lo tanto la respuesta obtenida fue mayor a una concentración 0.75 mol/L. Al observar este comportamiento, se intentaron preparar soluciones aún más concentradas con el objetivo de mejorar la extracción, sin embargo, el bicarbonato de sodio no se solubilizó en agua y no fue posible su preparación. Así, se decidió seleccionar la concentración 0.75 mol/L como la concentración óptima de la solución amortiguadora de carbonatos pH 10.6.



**Gráfica 12.** Señales obtenidas al evaluar la influencia de la concentración (fuerza iónica) de la solución amortiguadora de carbonato pH 10.6.

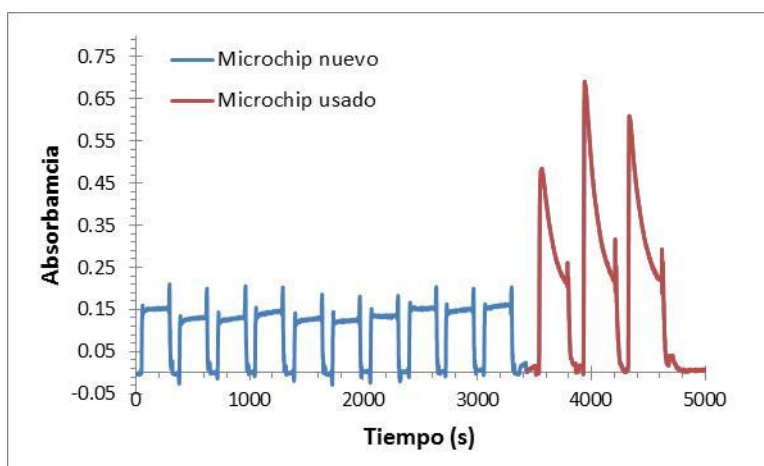
### 5.4. Evaluación del tiempo de vida de los microdispositivos.

La evaluación del tiempo de vida de los microdispositivos de PDMS fabricados es indispensable, debido a que el material presenta cierta solubilidad y tiende a hincharse en presencia de disolventes orgánicos, en este caso n-hexano, lo que puede deformar la forma de los microcanales, provocar fugas en el mismo o bien encontrar la presencia de oligómeros del polímero que pudieran haber sido disueltos, lo que afecta directamente la respuesta del producto de reacción del extracto modificando la cuantificación.

En este caso los microchips una vez pegados sobre la superficie de vidrio se dejaron reposar al menos 48 h antes de su uso, lo que ayudó a evitar fugas en los microcanales, ya que aquellos que se usaron 24 h después del pegado fueron más vulnerables a sufrir desperfectos.

De acuerdo con los resultados experimentales se concluyó que un microdispositivo nuevo puede ser usado durante al menos 8 h continuas en un solo día sin presentar grandes variaciones en las señales registradas, sin embargo, después de su uso y pese a que se haya realizado un lavado de los microcanales, no es posible emplear el mismo microdispositivo al siguiente día para posteriores análisis, ya que el producto de reacción del extracto comienza a presentar una ligera turbidez y la respuesta analítica obtenida cambia drásticamente sin alcanzar una estabilización durante los 4 min de lectura de absorbancia, véase **Gráfica 13**. Estas señales sobrevaloraban la concentración real de polifenoles en la muestra, por lo que el microdispositivo ya no es útil, pudiendo ser empleado sin inconvenientes únicamente durante un día o hasta la aparición de señales deformadas. Dado que los prototipos pueden ser considerados “desechables” es importante conocer el costo aproximado de fabricación por microchip, el cálculo únicamente se realizó con base en el precio del kit de elastómero de silicona SYLGARD 184 con una presentación de 0.5 kg por \$60.90 USD. Una vez construido el molde se requieren de aproximadamente 18 g de PDMS para la construcción de 6 microdispositivos, con un costo aproximado de \$0.37 USD por cada uno.

El cambio en las señales es atribuido en su totalidad a la implementación de n-hexano como diluyente de la muestra de aceite, ya que una vez que entra en contacto con el PDMS cierta fracción se queda alojada en las paredes del material que no es posible retirar aun realizando lavados, lo que provoca el hinchamiento del PDMS y la aparición de oligómeros que son arrastrados por el flujo provocando la turbidez observada en el producto recolectado [104]. Por lo que para el análisis de las diferentes muestras de aceite de oliva se decidió emplear un microchip nuevo cada día para cada muestra.



**Gráfica 13.** Comparación de las señales registradas al trabajar con un microchip nuevo y un microchip después de un día de uso.

## 5.5. Comportamiento del flujo en los microcanales.

El caudal empleado de 40  $\mu\text{L}/\text{min}$  es relativamente alto en comparación con la medida de los microcanales, por lo que fue necesario observar el flujo al microscopio en cámara lenta.

Como se mencionó en el marco teórico (sección 2.7.), al trabajar con dispositivos de microfluídica se obtienen bajos valores del número de Reynolds y el comportamiento del flujo es ordenado (flujo laminar) [73], sin embargo, Thorsen et al. [110] demostraron en el año 2001 que la interacción entre dos fluidos inmiscibles conduce a la inestabilidad y no linealidad del flujo y, aunque el sistema permanece con un valor bajo de número de Reynolds, el flujo no es laminar debido a la competencia entre la tensión superficial y la fuerza de corte en la frontera de los dos fluidos no estáticos, conduciendo a la formación de gotas con diversos patrones [111]. La forma de los microcanales y la presión con la que la fase acuosa y el aceite son inyectados influye directamente en el tamaño, distribución y morfología de las gotas, formando desde estructuras simples como un “collar de perlas” (gotas monodispersas) hasta emulsiones (patrones de las gotas en forma de zigzag).

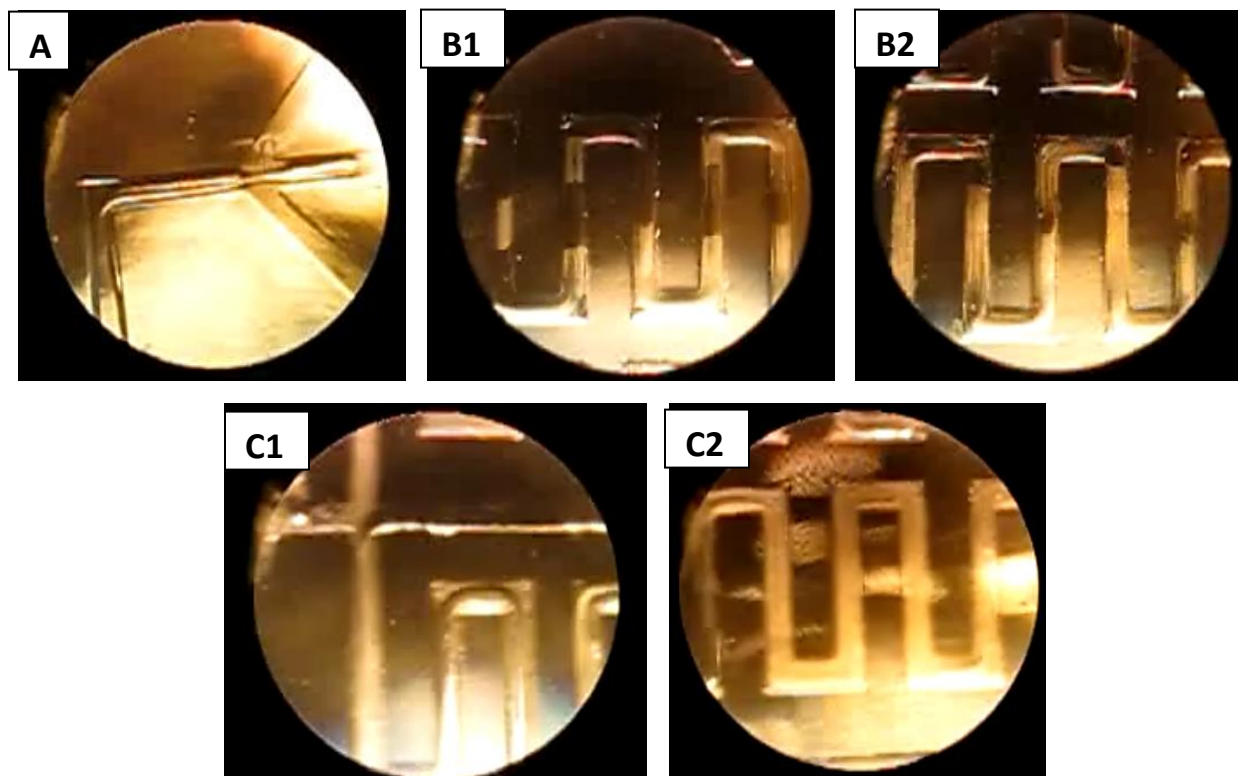
Lo descrito anteriormente fue observado al analizar el comportamiento del flujo en los microcanales, véase **Figura 45**, en donde se presentan algunas imágenes de los videos grabados las cuales se explican a detalle a continuación:

**A)** En la imagen se muestra la intersección entre la solución amortiguadora de carbonatos, la cual se localiza en el microcanal central, y la muestra de aceite de oliva diluida en n-hexano, que ingresa por ambos extremos a través de los microcanales laterales. En ese punto, se aprecia una obstrucción parcial del flujo de la solución amortiguadora por parte de la solución de aceite, provocando una elongación en el flujo de la fase acuosa, debido a la alta fuerza de corte localizada en el borde delantero de la solución de aceite se generan microgotas [61,110].

**B1 y B2)** Las microgotas formadas no son monodispersas, es decir, su tamaño es variante, debido principalmente al caudal seleccionado, ya que se ha observado que a caudales menores, en el orden de  $\mu\text{L}/\text{h}$  se tiene un mejor control del tamaño de las mismas [111]. Las microgotas son claramente distinguibles y se mantienen al inicio del serpentín de extracción, sin embargo, la forma de los microcanales provoca inestabilidad y competencia entre la fuerza de corte y tensión superficial entre ambos líquidos inmiscibles conduciendo a la formación de una emulsión [110].

**C1 y C2)** Conforme ambas fases recorren los microcanales la formación de la emulsión es más notoria hasta llegar a la incorporación del reactivo de Folin-Ciocalteu, éste ingresa por ambos extremos del microcanal central, debido a que el PDMS presenta carácter hidrofóbico, no se favorece el recorrido del reactivo de Folin por la parte externa del microcanal, por lo que se incorpora a la emulsión, la cual se conserva durante todo el serpentín de reacción hasta la salida del microdispositivo.

La extracción en microescala y la formación de una emulsión debido al flujo inestable ocasionado por dos fluidos inmiscibles, favorecen la extracción en comparación con una extracción en macroescala, debido al gran aumento de la relación superficie/volumen lo que incrementa la transferencia de masa [112]. Asimismo, se ha demostrado que la disminución en el tamaño del microcanal (ancho y alto) incrementa el coeficiente de transferencia de masa de una fase a otra [113].



**Figura 45.** Vista al microscopio del comportamiento del flujo en los microcanales. **A)** Intersección entre la solución amortiguadora y aceite de oliva, **B1)** Primera sección del serpentín de extracción, **B2)** Segunda sección del serpentín de extracción, **C1)** Incorporación del reactivo F-C, **C2)** Serpentín de reacción.

## 5.6. Validación de la metodología.

### 5.6.1. Determinación del intervalo lineal.

El intervalo lineal de un procedimiento analítico se define como su habilidad para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración. La linealidad puede corroborarse directamente a través de diluciones a diferente concentración de una solución madre, midiendo la respuesta [107]; en el caso de la experimentación, los estándares de ácido tánico de 0.029 hasta 0.44  $\mu\text{mol/L}$  (0.05 hasta 0.75  $\mu\text{g/mL}$ ) no dieron señales capaces de ser diferenciadas de la señal basal, por lo que para la determinación del intervalo lineal se consideraron las respuestas obtenidas para las concentraciones de 0.51 a 18.09  $\mu\text{mol/L}$  (0.873 a 30.78  $\mu\text{g/mL}$ ).

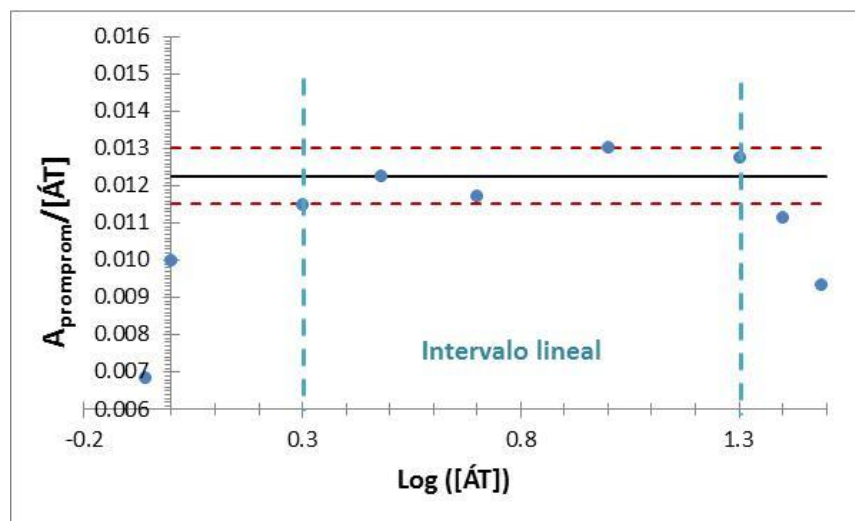


En la **Tabla 15** se muestran los promedio de las absorbancias registradas para cada concentración, así como la relación relativa absorbancia/concentración del estándar y el logaritmo de la concentración, estos últimos se graficaron obteniendo el intervalo lineal de la curva de calibración de ácido tánico de 1.18 a 11.79  $\mu\text{mol/L}$  (2.00 a 20.06  $\mu\text{g/mL}$ ), el cual se encuentra delimitado por líneas punteadas color azul (**Gráfica 14**).

En las **Gráficas 15A y 15B** se presentan los resultados obtenidos para la curva de calibración antes y después de considerar el intervalo lineal.

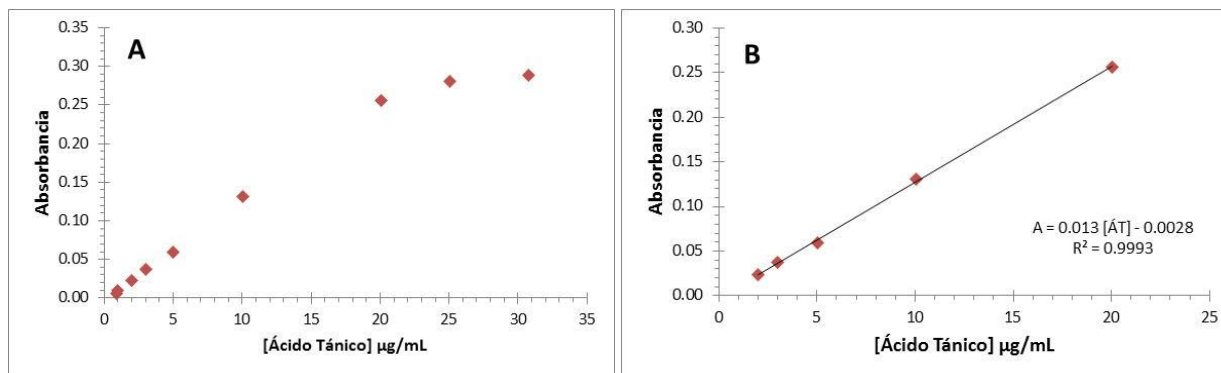
**Tabla 15.** Resultados para el cálculo del intervalo lineal de la curva de calibración con estándar de ácido tánico (ÁT).

[ÁT] $\mu\text{g/mL}$	$A_{\text{promprom}}$	$A_{\text{promprom}}/[\text{ÁT}]$	$\text{Log}([\text{ÁT}])$
0.873	0.006	0.0069	-0.0590
1.00	0.010	0.0100	0.0000
2.00	0.023	0.0115	0.3010
3.01	0.037	0.0123	0.4786
5.02	0.059	0.0118	0.7007
10.03	0.131	0.0131	1.0013
20.06	0.256	0.0128	1.3023
25.08	0.280	0.0112	1.3993
30.78	0.288	0.0094	1.4883



**Gráfica 14.** Determinación del intervalo lineal de la curva de calibración de ácido tánico de 1.18 a 11.79  $\mu\text{mol/L}$  (2.00 a 20.06  $\mu\text{g/mL}$ ).



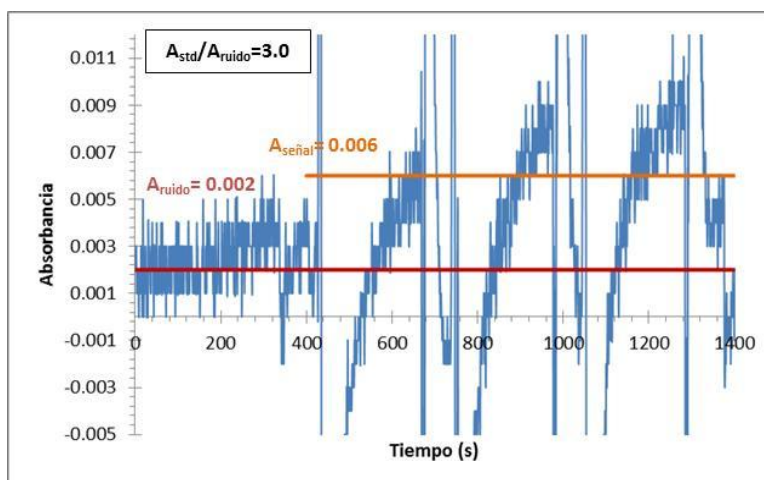


**Gráfica 15.** Comparación de la curva de calibración de ácido tánico en medio acuoso. **A)** Sin considerar el intervalo lineal y **B)** Considerando el intervalo lineal de 1.18 a 11.79  $\mu\text{mol/L}$  (2.00 a 20.06  $\mu\text{g/mL}$ ).

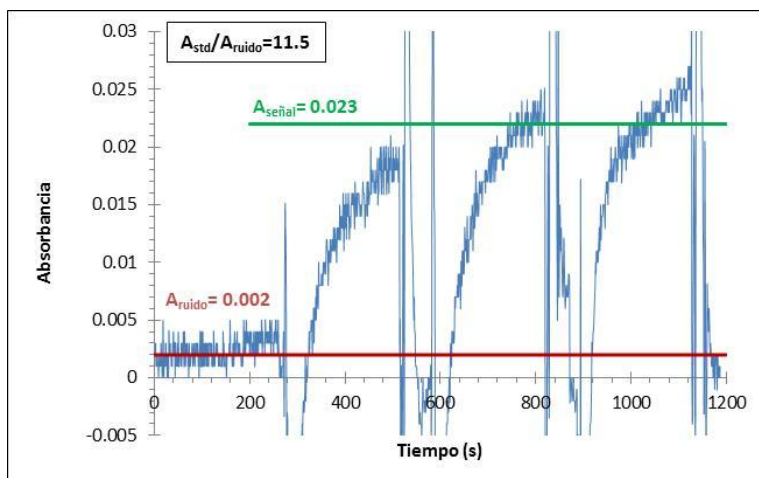
### 5.6.2. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).

Para una metodología analítica, el LOD se define como la cantidad más pequeña de analito que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada, mientras el LOQ es la cantidad más pequeña de analito que puede ser cuantitativamente determinada. Ambos parámetros de validación son calculados por diferentes procedimientos, en este caso se seleccionó la consideración de la señal del ruido, cuyo procedimiento se aplica a métodos que utilizan un instrumento de medición para la respuesta que presenta una señal de ruido basal [108].

En las **Gráficas 16** y **17** se observa el comparativo de las señales registradas para el estándar de ácido tánico y el ruido, encontrando un LOD= 0.51  $\mu\text{mol/L}$  (0.873  $\mu\text{g/mL}$ ) y un LOQ= 1.18  $\mu\text{mol/L}$  (2.00  $\mu\text{g/mL}$ ).



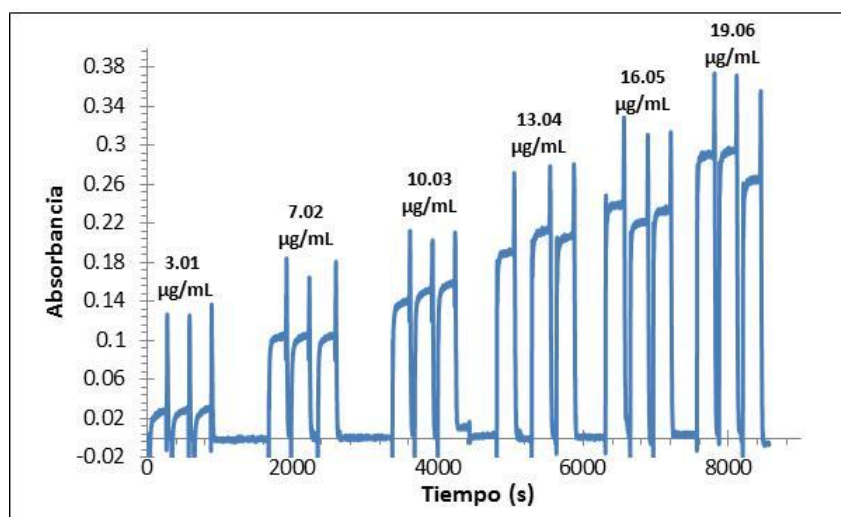
**Gráfica 16.** Comparación de la señal del ruido y del estándar de ácido tánico 0.51  $\mu\text{mol/L}$  (0.873  $\mu\text{g/mL}$ ) para la determinación del LOD. Relación de la señal estándar/ruido igual a 3.0.



**Gráfica 17.** Comparación de la señal del ruido y del estándar de ácido tánico  $1.18 \mu\text{mol/L}$  ( $2.00 \mu\text{g/mL}$ ) para la determinación del LOQ. Relación de la señal estándar/ruido igual a 11.5.

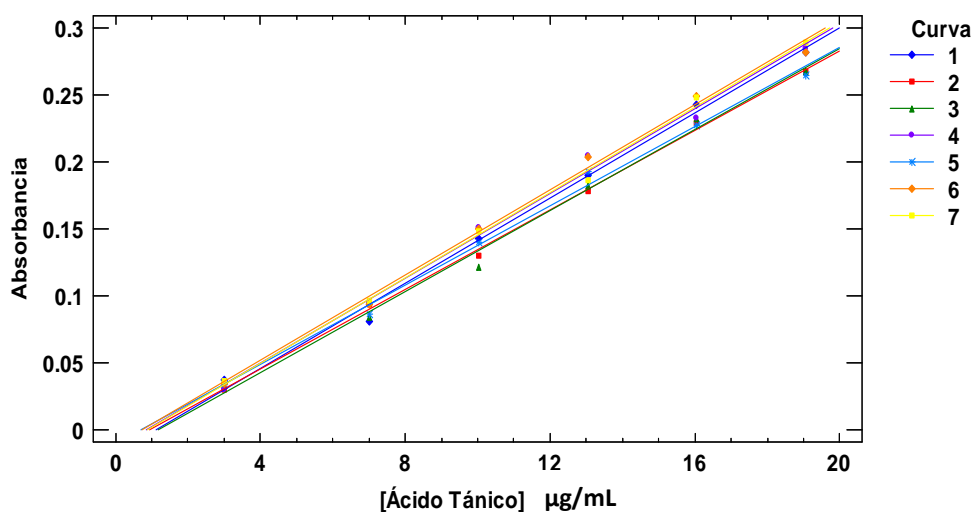
### 5.6.3. Construcción de la curva de calibración.

Las señales obtenidas para la construcción de la curva de calibración tienen forma de mesetas y no de picos, como puede observarse en la **Gráfica 18**, debido a que la celda de flujo se llena con el producto de reacción y posteriormente el flujo es detenido para poder realizar la detección durante 4 min, manteniéndose una absorbancia prácticamente constante hasta el ingreso del blanco para la estabilización de la señal hasta la línea basal; en este caso se decidió emplear agua destilada como blanco en lugar de solución de solución reactivo de Folin-Ciocalteu  $0.02 \text{ mol/L}$  con solución amortiguadora de carbonato  $0.75 \text{ mol/L}$  pH 10.6, debido a que la señal del ruido basal de una mezcla 1:1 de éstos últimos, no tiene diferencia significativa a la registrada por el agua destilada.



**Gráfica 18.** Representación de las señales obtenidas para diferentes concentraciones de ácido tánico en la construcción de la curva de calibración de  $1.77$  a  $11.20 \mu\text{mol/L}$  ( $3.01$  a  $19.06 \mu\text{g/mL}$ ).

El intervalo lineal de la curva de calibración se determinó de 1.18 a 11.79  $\mu\text{mol/L}$  (2.00 a 20.06  $\mu\text{g/mL}$ ), pero para fines prácticos se seleccionó un intervalo de trabajo de 1.77 a 11.20  $\mu\text{mol/L}$  (3.01 a 19.06  $\mu\text{g/mL}$ ). Para corroborar que no hubiera diferencias estadísticamente significativas en la preparación de la curva de calibración entre un día y otro, se decidió construir diariamente durante siete días y se realizó la comparación de los parámetros estadísticos de las rectas de regresión obtenidas. En la **Gráfica 19** se muestran las rectas de las curvas de calibración de ácido tánico preparadas, mientras que en la **Tabla 16** se encuentran sus respectivos parámetros estadísticos.



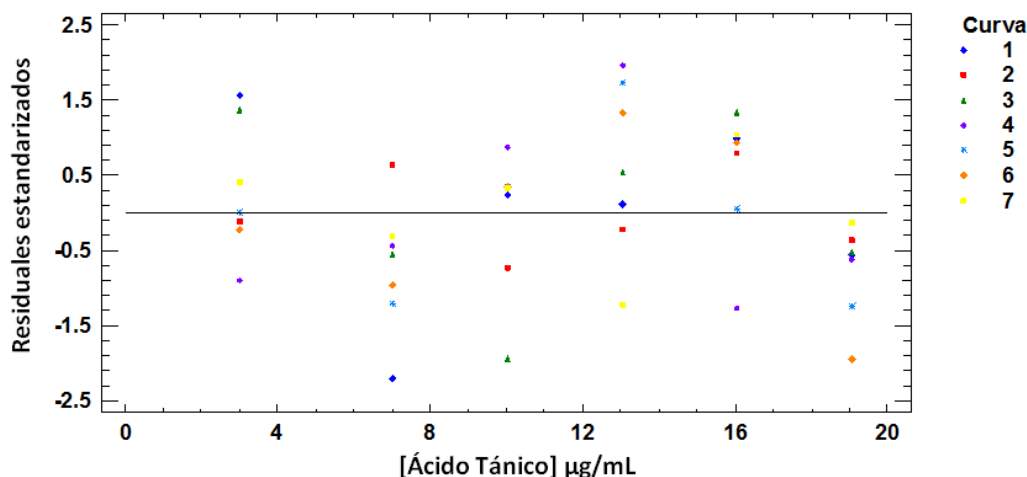
**Gráfica 19.** Comparación de las curvas de calibración de ácido tánico preparadas diariamente durante un periodo de siete días de 1.77 a 11.20  $\mu\text{mol/L}$  (3.01 a 19.06  $\mu\text{g/mL}$ ).

**Tabla 16.** Parámetros estadísticos para cada una de las curvas de calibración de ácido tánico preparadas durante un periodo de siete días.

No. Curva	Ordenada al origen	Error	Pendiente ( $\text{mL}/\mu\text{g}$ )	Error ( $\text{mL}/\mu\text{g}$ )	$R^2$
1	-0.0180	0.0076	0.0159	$6.056 \times 10^{-4}$	0.9942
2	-0.0141	0.0039	0.0148	$3.109 \times 10^{-4}$	0.9982
3	-0.0180	0.0079	0.0151	$6.290 \times 10^{-4}$	0.9931
4	-0.0134	0.0078	0.0158	$6.225 \times 10^{-4}$	0.9938
5	-0.0105	0.0069	0.0148	$5.516 \times 10^{-4}$	0.9945
6	-0.0118	0.0072	0.0159	$5.729 \times 10^{-4}$	0.9948
7	-0.0139	0.0051	0.0159	$4.016 \times 10^{-4}$	0.9975

Se realizó un análisis de los residuales (diferencia entre los valores de absorbancia observados y los predichos por la recta de regresión) a través del gráfico de los residuos en función de la concentración del estándar de ácido tánico, el cual nos proporciona información

sobre la calidad del ajuste de los datos al modelo de regresión seleccionado y de esta manera poder concluir si el modelo es adecuado, de ser así, se espera que en el gráfico la distribución de los residuos no siga ningún patrón y se encuentren distribuidos aleatoriamente a lo largo y ancho de la gráfica; cuando esto ocurre se dice que los datos tienen varianza homocedástica y la aplicación de una regresión lineal tipo 1 es adecuada. Los residuales mostraron una distribución aleatoria y sin ningún tipo de tendencia al variar la concentración, como puede apreciarse en la **Gráfica 19**.



**Gráfica 19.** Residuos en función de la concentración del estándar de ácido tánico para las regresiones lineales de las curvas de calibración preparadas diariamente durante siete días de 1.77 a 11.20  $\mu\text{mol/L}$  (3.01 a 19.06  $\mu\text{g/mL}$ ).

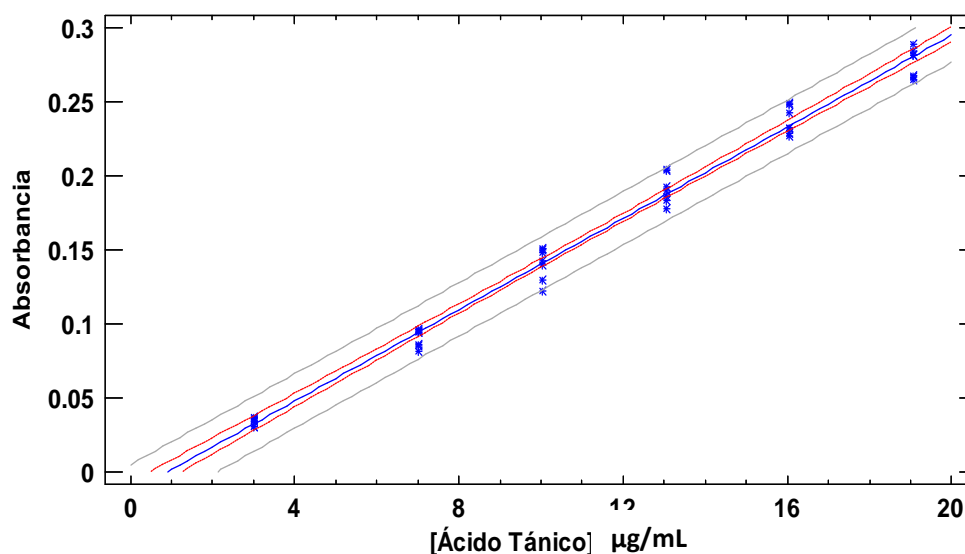
Con el programa *STATGRAPHICS Centurion XVI.1* y empleando los datos de las siete curvas de calibración, se construyó una sola curva (**Gráfica 20**), la cual se utilizó en la cuantificación de polifenoles totales de las diferentes muestras de aceite de oliva virgen extra. El análisis de varianza (ANOVA) de los datos de las siete curvas de calibración, presentado en la **Tabla 17**, demostró una relación directamente proporcional entre la respuesta (absorbancia) y la concentración de ácido tánico con un nivel de significancia de 95 %, ya que el valor-P obtenido es menor a 0.05. En la **Tabla 18** se localizan los coeficientes de la ecuación de la curva de calibración de ácido tánico con su respectivo intervalo de confianza al 95 %, cuyo cálculo se pueden encontrar en el **Anexo 2**.

**Tabla 17.** Análisis de varianza de los datos obtenidos en la construcción de una sola curva de calibración.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.292311	1	0.292311	3771.21	0.0000
Residual	0.00310045	40	0.000077511		
Total	0.295411	41			

**Tabla 18.** Coeficientes de la recta de regresión con su intervalo de confianza al 95 % para la cuantificación de compuestos fenólicos totales en aceite de oliva.

Parámetro	Valor estimado	Error estándar	Intervalo de confianza (95%)	
			Límite bajo	Límite alto
Ordenada al origen	-0.0142	0.0032	-0.01522	-0.01324
Pendiente (mL/μg)	0.0155	0.0003	0.0150	0.0160
R <sup>2</sup>	0.9986	-	-	-



**Gráfica 20.** Curva de calibración de ácido tánico de 1.77 a 11.20 μmol/L (3.01 a 19.06 μg/mL) con su intervalo de confianza al 95 % para la cuantificación de polifenoles totales en aceite de oliva virgen extra.

#### 5.6.4. Precisión: repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio.

La precisión es una medida de la semejanza entre los resultados obtenidos de la repetida aplicación del método analítico bajo las mismas condiciones; está relacionada con el error aleatorio y no con la proximidad de los resultados al “valor verdadero”. La precisión puede ser medida de diferentes maneras, como se aprecia en la **Figura 46**. En este caso se decidió evaluar la repetibilidad, es decir, la variación dentro de días de la concentración de polifenoles totales de la muestra de aceite de oliva obtenida por el mismo analista, instrumento y día, así como la variación de las concentración obtenida entre diferentes días, conocida como reproducibilidad intralaboratorio (precisión intermedia).

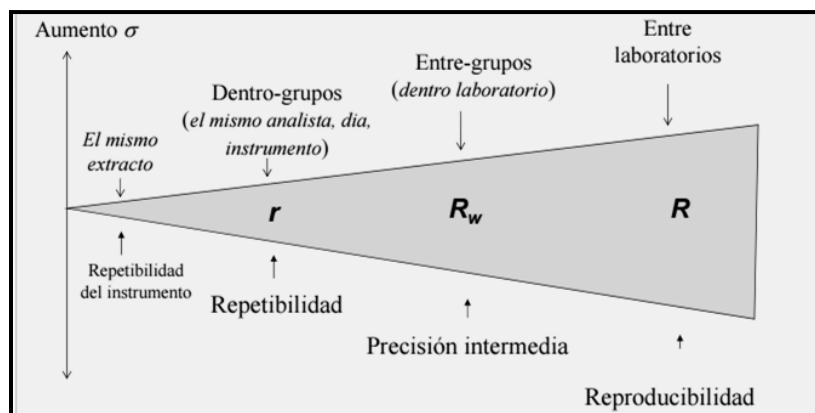


Figura 46. Ejemplificación de las diversas maneras de medir la precisión de un método analítico [114].

Los resultados de la cuantificación por duplicado del contenido de polifenoles totales en la muestra de aceite de oliva virgen extra Sierra de Gata se localizan en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Resultados para la medición de la precisión de la cuantificación de polifenoles totales en una muestra de aceite de oliva virgen extra.

	[Polifenoles Totales] <sub>aceite</sub> (mgÉAT/kg)		
Día	Réplica 1	Réplica 2	Promedio
1	293.50	303.29	298.39
2	307.54	301.81	304.67
3	311.28	320.37	315.83
4	317.94	312.02	314.98
5	292.31	294.56	293.43
6	311.16	310.82	310.99
7	306.64	311.53	309.09
		<b>Promedio Total</b>	<b>306.77</b>

Con ayuda de un análisis de varianza (ANOVA) se obtuvieron la suma de cuadrados (SC), los grados de libertad (GL) y el cuadrado medio (CM) de la variación de las concentraciones entre días y dentro de días, véase **Tabla 20**, que serán de utilidad para el cálculo de la precisión.

Tabla 20. Análisis de varianza para la determinación de la precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio.

Origen de las variaciones	SC	GL	CM
Entre días	849.833	6	141.639
Dentro de días	137.721	7	19.6744
Total	987.554	13	

La repetibilidad ( $S_R^2$ ), nos ayuda a medir la variación de la concentración de la muestra obtenida en un mismo día (dentro de días) y se calculó considerando que [109]:

$$S_R = \sqrt{CM_{dentro\ de\ días}} \quad (4)$$

Por lo que:

$$S_R^2 = 19.6744$$

La reproducibilidad intralaboratorio o precisión intermedia ( $S_{WR}^2$ ), se determinó haciendo uso de las siguientes expresiones, en donde  $n_j$  corresponde al número de réplicas realizadas por día:

$$S^2 = \frac{CM_{entre\ días} - CM_{dentro\ de\ días}}{n_j} \quad (5)$$

$$S_{WR}^2 = S_R^2 + S^2 \quad (6)$$

De esta manera:

$$S^2 = \frac{141.639 - 19.6744}{2} = 60.9823$$

$$S_{WR}^2 = 19.6744 + 60.9823 = 80.6567$$

Por último, se expresó la repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio en términos de porcentaje, haciendo uso de las siguientes expresiones matemáticas:

$$Repetibilidad = \left( \frac{S_R}{Promedio\ total} \right) \times 100 = \left( \frac{\sqrt{CM_{dentro\ de\ días}}}{Promedio\ total} \right) \times 100 \quad (7)$$

$$Reproducibilidad = \left( \frac{S_{WR}}{Promedio\ total} \right) \times 100 = \left( \frac{\sqrt{S_{WR}^2}}{Promedio\ total} \right) \times 100 \quad (8)$$

Sustituyendo en las ecuaciones (7) y (8) se obtiene:

$$\text{Repetibilidad} = \left( \frac{\sqrt{19.6744}}{306.77} \right) \times 100 = 1.45 \%$$

$$\text{Reproducibilidad} = \left( \frac{\sqrt{80.6567}}{306.77} \right) \times 100 = 2.93 \%$$

Los porcentajes obtenidos en ambos casos son menores al 3.0 %. Con base en la referencia consultada [115], el criterio de aceptación de la repetibilidad y precisión intermedia se modifica en función de la concentración de la muestra que se analiza, es decir, si es una muestra pura o se han realizado diluciones, como se aprecia en la **Tabla 21**. En este caso se trabajó a un 4.0 % de concentración por lo que la reproducibilidad intralaboratorio y repetibilidad obtenidas para la metodología son excelentes, teniendo muy poca variación y alta precisión.

**Tabla 21.** Criterios de aceptación para la repetibilidad y precisión intermedia.

Concentración la muestra	Precisión
100 %	≤ 2.0 %
10 %	≤ 3.0 %
1 %	≤ 4.0 %
0.1 %	≤ 6.0 %
0.01 %	≤ 8.0 %

Por último, en la siguiente tabla se resumen los parámetros obtenidos para la validación de la metodología de cuantificación de polifenoles totales en el aceite de oliva.

**Tabla 22.** Resumen de los parámetros para la validación de la metodología de cuantificación de polifenoles totales en aceite de oliva.

Parámetro	Valor obtenido
Ecuación de la curva de calibración de ácido tánico, concentración expresada en µg/mL (Intervalo de confianza 95 %)	A= 0.0155 (±4x10 <sup>-4</sup> ) [ÁT]- 0.0142 (±1x10 <sup>-3</sup> ) R <sup>2</sup> =0.9986
Intervalo lineal	1.18 – 11.79 µmol/L (2.00 - 20.06 µg/mL)
Intervalo de trabajo	1.77 - 11.20 µmol/L (3.01 - 19.06 µg/mL)
LOD	0.51 µmol/L (0.873 µg/mL)
LOQ	1.18 µmol/L (2.00 µg/mL)
Repetibilidad	1.45 %
Reproducibilidad intralaboratorio	2.93 %



## 5.7. Análisis de muestras de aceite de oliva virgen extra.

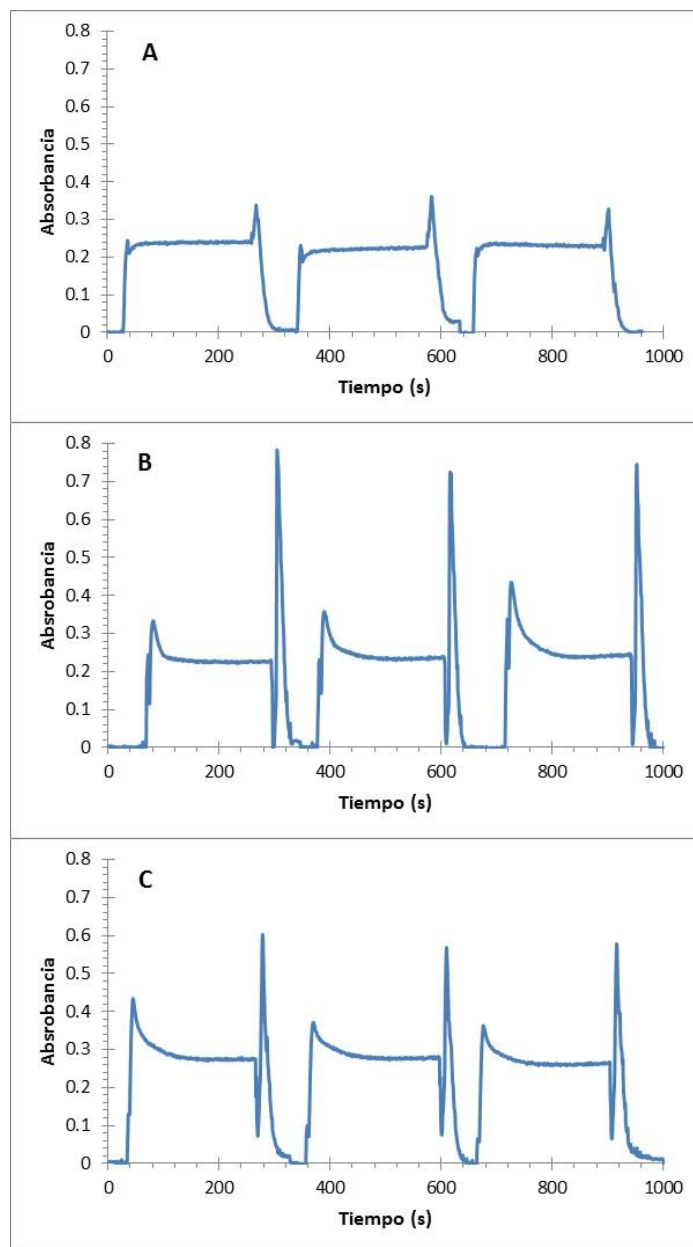
La extracción de la fracción fenólica del aceite de oliva se realizó en el microdispositivo (diseño 4) y con dos metodologías de extracción líquido-líquido en lote, con la finalidad de comparar qué tan eficiente es la extracción en el microdispositivo, así como conocer sus ventajas y desventajas frente a metodologías convencionales. La cuantificación del contenido de polifenoles totales en las seis muestras de aceite de oliva virgen extra analizadas (sección 4.9.) se hizo a través del método de Folin-Ciocalteu, reportándose en miligramos equivalente de ácido tánico por kilogramo de aceite (mgEÁT/kg de aceite)  $\pm$  la desviación estándar (S). Dado que el método de cuantificación es el mismo, los resultados obtenidos ayudaron a realizar la evaluación del método de extracción.

### 5.7.1. Comparación de las señales en medio acuoso y metanol/agua.

Debido a que ambas extracciones en lote involucran la adición de cierto porcentaje de metanol en el extractante, fue indispensable realizar la comparación de la señal analítica de un estándar de ácido tánico en medio acuoso, metanol/agua 60:40 y 80:20 v/v; con la finalidad de conocer si la curva de calibración de ácido tánico construida era de utilidad para cuantificar los extractos obtenidos de acuerdo a la metodología de Bonoli et al. y el COI. Las señales registradas se muestran en la **Gráfica 21**, mientras que en la **Tabla 23** se localizan los valores de absorbancia registrados para cada estándar de ácido tánico en función del medio empleado, con su respectiva media ( $A_{\text{promprom}}$ ), desviación estándar (**S**) y varianza ( $S^2$ ). A simple vista se aprecia que las señales correspondientes al estándar de ácido tánico en metanol/agua 80:20 v/v son mayores en comparación con las registradas en medio acuoso. Para conocer si había diferencias estadísticamente significativas al contrastar la señal analítica utilizando medio metanólico y acuoso, se llevaron a cabo dos pruebas de hipótesis de comparación de dos medias muestrales [109]; una comparando la media de las señales en metanol/agua 60:40 v/v y agua destilada, y otra más entre metanol/agua 80:20 v/v y medio acuoso.

Como primer paso, a través de la prueba  $F$ , se corroboró si las medias de las absorbancias por contrastar poseen desviaciones estándar que no son significativamente diferentes, planteando como hipótesis nula ( $H_0$ ) que la varianza para las absorbancias son iguales, y como hipótesis alterna ( $H_1$ ) que las varianzas son diferentes. Para el cálculo del estadístico  $F$ , se consideró la razón entre las dos varianzas muestrales a comparar, **Ecuación 9**, donde  $a$  y  $b$  se disponen de modo que  $F$  siempre sea  $\geq 1$ , es decir la varianza más pequeña se coloca como denominador en la expresión, mientras que la más grande en el numerador.

$$F = \frac{S_a^2}{S_b^2} \quad (9)$$



**Gráfica 21.** Comparación de las señales de estándar de ácido tánico  $9.43 \mu\text{mol/L}$  ( $16.05 \mu\text{g/mL}$ ).

A) Medio acuoso; B) Metanol/Agua 60:40 v/v y C) Metanol/Agua 80:20 v/v.

El valor  $F$  calculado es comparado con un valor de  $F$  crítico ( $F_c$ ), el cual es consultado en una tabla de contraste de dos colas, considerando el nivel de significancia ( $\alpha=5\%$ ) y los grados de libertad para las varianzas del numerador y denominador ( $n_a-1$  y  $n_b-1$ ), donde  $n$  es el número de mediciones realizadas, en este caso se trabajó con 2 grados de libertad para ambas varianzas, obteniendo  $F_{c_{2,2}} = 39.0$ . Si se cumple que  $F > F_c$  se rechaza la hipótesis nula y se deduce que las varianzas son diferentes, por el contrario si  $F < F_c$ , nos encontramos en la zona de aceptación de la hipótesis nula y por lo tanto las varianzas son iguales (**Figura 47**).

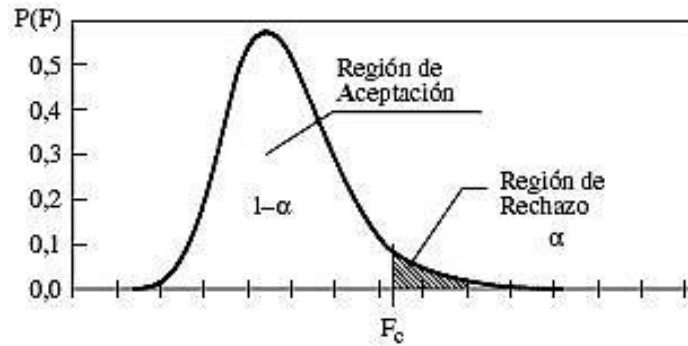


Figura 47. Ejemplo del criterio de aceptación o rechazo de la hipótesis nula ( $H_0$ ) para la comparación de desviación estándar empleando un contraste  $F$ .

Tabla 23. Valores de absorbancia para el estándar de ácido tánico 16.05  $\mu\text{g/mL}$  en medio acuoso y metanólico para el contraste de medias (prueba  $t$ ) y desviación estándar (contraste  $F$ ).

	Mediciones Medio acuoso			Mediciones Metanol/Agua 60:40 v/v			Mediciones Metanol/Agua 80:20 v/v		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	0.241	0.227	0.225	0.228	0.237	0.24	0.274	0.28	0.262
	0.24	0.225	0.228	0.227	0.236	0.241	0.276	0.281	0.262
	0.238	0.224	0.228	0.228	0.235	0.242	0.273	0.278	0.265
	0.239	0.223	0.229	0.227	0.236	0.243	0.273	0.278	0.262
	0.240	0.224	0.229	0.225	0.236	0.244	0.271	0.278	0.262
	0.239	0.227	0.232	0.225	0.236	0.241	0.273	0.276	0.265
	0.243	0.224	0.228	0.225	0.237	0.243	0.275	0.275	0.263
	0.239	0.228	0.229	0.227	0.235	0.244	0.274	0.282	0.264
	0.240	0.226	0.231	0.227	0.236	0.243	0.275	0.28	0.262
	0.238	0.225	0.229	0.226	0.237	0.244	0.272	0.276	0.266
	0.240	0.227	0.230	0.226	0.234	0.243	0.274	0.279	0.263
	0.241	0.226	0.230	0.224	0.235	0.243	0.277	0.276	0.262
	0.241	0.225	0.230	0.225	0.237	0.244	0.274	0.276	0.264
	0.243	0.225	0.229	0.227	0.236	0.247	0.275	0.279	0.263
	0.238	0.227	0.228	0.226	0.24	0.243	0.276	0.28	0.264
	0.239	0.225	0.232	0.226	0.238	0.241	0.276	0.277	0.263
	0.238	0.227	0.230	0.225	0.235	0.243	0.274	0.279	0.263
	0.240	0.225	0.230	0.227	0.235	0.246	0.272	0.282	0.263
	0.240	0.228	0.229	0.23	0.239	0.233	0.275	0.279	0.267
	0.237	0.228	0.227	0.228	0.228	0.24	0.275	0.279	0.263
$A_{\text{prom}}$	<b>0.240</b>	<b>0.226</b>	<b>0.229</b>	<b>0.226</b>	<b>0.236</b>	<b>0.242</b>	<b>0.274</b>	<b>0.279</b>	<b>0.263</b>
$A_{\text{promprom}}$	<b>0.232</b>			<b>0.235</b>			<b>0.272</b>		
$S$	<b>0.007</b>			<b>0.008</b>			<b>0.008</b>		
$S^2$	<b><math>5.262 \times 10^{-5}</math></b>			<b><math>6.433 \times 10^{-5}</math></b>			<b><math>6.052 \times 10^{-5}</math></b>		

A continuación se muestran los cálculos para la comparación de las desviaciones estándar en medio metanol/agua y acuoso:

$$H_0: \frac{S_{acuoso}^2}{S_{MeOH/agua\ 60:40\ v/v}^2} = 1$$

$$H_0: \frac{S_{acuoso}^2}{S_{MeOH/agua\ 80:20\ v/v}^2} = 1$$

$$H_1: \frac{S_{acuoso}^2}{S_{MeOH/agua\ 60:40\ v/v}^2} \neq 1$$

$$H_1: \frac{S_{acuoso}^2}{S_{MeOH/agua\ 80:20\ v/v}^2} \neq 1$$

$$F_{MeOH/agua\ 60:40\ v/v} = \frac{6.433 \times 10^{-5}}{5.262 \times 10^{-5}} = \mathbf{1.22}$$

$$F_{MeOH/agua\ 80:20\ v/v} = \frac{6.052 \times 10^{-5}}{5.262 \times 10^{-5}} = \mathbf{1.15}$$

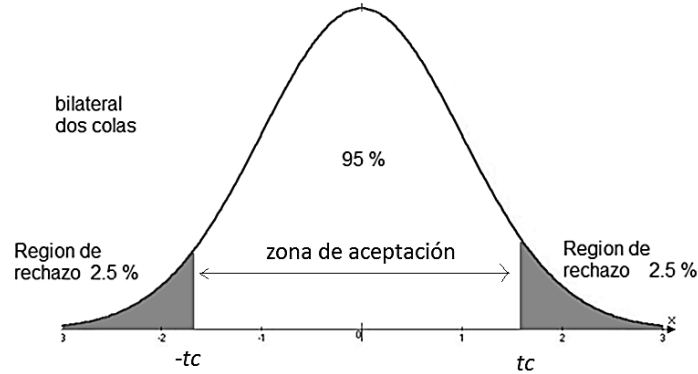
En ambos casos se cumple que  $F < F_c$  ( $1.22 < 39$  y  $1.15 < 39$ ), por lo que las varianzas y por ende las desviaciones estándar son iguales a un nivel de 95 %. Para realizar la prueba  $t$  de comparación de medias se determinó una varianza conjunta ( $S_{con}^2$ ) a partir de las varianzas individuales ( $S_a^2$  y  $S_b^2$ ), de acuerdo a la **Ecuación 10**.

$$S_{con}^2 = \frac{(n_a - 1)S_a^2 + (n_b - 1)S_b^2}{(n_a + n_b - 2)} \quad (10)$$

La hipótesis nula ( $H_0$ ) adoptaba es que las medias de las absorbancias dadas en medio metanólico y acuoso son las mismas; para aceptar o rechazar la hipótesis se calculó el estadístico  $|t|$  empleando la varianza conjunta, véase **Ecuación 11**, cuyo resultado será comparado con el valor  $t$  crítico  $|t_c|$  consultado directamente de tablas para una prueba bilateral o de dos colas con  $\alpha=0.05$  y considerando los grados de libertad como  $n_a+n_b-2$ , en este caso 4 grados de libertad. Bajo estas condiciones  $|t_c| = \mathbf{2.78}$ .

$$|t| = \frac{A_{promprom}^a - A_{promprom}^b}{\sqrt{S_{con}^2 \left( \frac{1}{n_a} + \frac{1}{n_b} \right)}} \quad (11)$$

Con base en la **Figura 48**, se aceptará la hipótesis nula cuando  $|t| < |t_c|$  lo que implica que las medias son iguales, mientras que si se cumple lo contrario, las medias serán diferentes y la señal analítica se verá afectada de manera significativa por el medio en que se encuentre el estándar de ácido tánico.



**Figura 48.** Ejemplificación del criterio de aceptación o rechazo de la hipótesis nula ( $H_0$ ) para la comparación de dos medias muestrales en una prueba  $t$ .

A continuación se presentan los cálculos para la comparación de las medias de absorbancia en medio **metanol/agua 60:40 v/v** y acuoso:

$$H_0: A_{promprom}^{MeOH/agua} = A_{promprom}^{acuoso}$$

$$H_1: A_{promprom}^{MeOH/agua} \neq A_{promprom}^{acuoso}$$

$$S_{con}^2 = \frac{(n_{MeOH/agua} - 1)S_{MeOH/agua}^2 + (n_{acuoso} - 1)S_{acuoso}^2}{(n_{MeOH/agua} + n_{acuoso} - 2)}$$

$$S_{con}^2 = \frac{2(6.433 \times 10^{-5}) + 2(5.262 \times 10^{-5})}{3 + 3 - 2} = 5.847 \times 10^{-5}$$

$$|t| = \frac{A_{promprom}^{MeOH/agua} - A_{promprom}^{acuoso}}{\sqrt{S_{con}^2 \left( \frac{1}{n_{MeOH/agua}} + \frac{1}{n_{acuoso}} \right)}}$$

$$|t| = \frac{0.235 - 0.232}{\sqrt{5.847 \times 10^{-5} \left( \frac{1}{3} + \frac{1}{3} \right)}} = \mathbf{0.54}$$

Se cumple que  $|t| < |t_c|$  ( $0.54 < 2.78$ ), aceptándose la hipótesis nula, lo que indica que no hay diferencia estadísticamente significativa ( $\alpha=5\%$ ) entre las señales de un estándar de ácido tánico preparado en agua destilada y uno en metanol/agua 60:40 v/v, esto implica que los

extractos de la fracción fenólica del aceite de oliva obtenidos de acuerdo a Bonoli et al. pueden ser cuantificados con la curva de calibración preparada en medio acuoso (sección 5.6.3.).

Para el caso de la comparación de las medias de absorbancia en **metanol/agua 80:20 v/v** y acuoso se obtuvo:

$$H_0: A_{promprom}^{MeOH/agua} = A_{promprom}^{acuoso}$$

$$H_1: A_{promprom}^{MeOH/agua} \neq A_{promprom}^{acuoso}$$

$$S_{con}^2 = \frac{(n_{MeOH/agua} - 1)S_{MeOH/agua}^2 + (n_{acuoso} - 1)S_{acuoso}^2}{(n_{MeOH/agua} + n_{acuoso} - 2)}$$

$$S_{con}^2 = \frac{2(6.052 \times 10^{-5}) + 2(5.262 \times 10^{-5})}{3 + 3 - 2} = 5.657 \times 10^{-5}$$

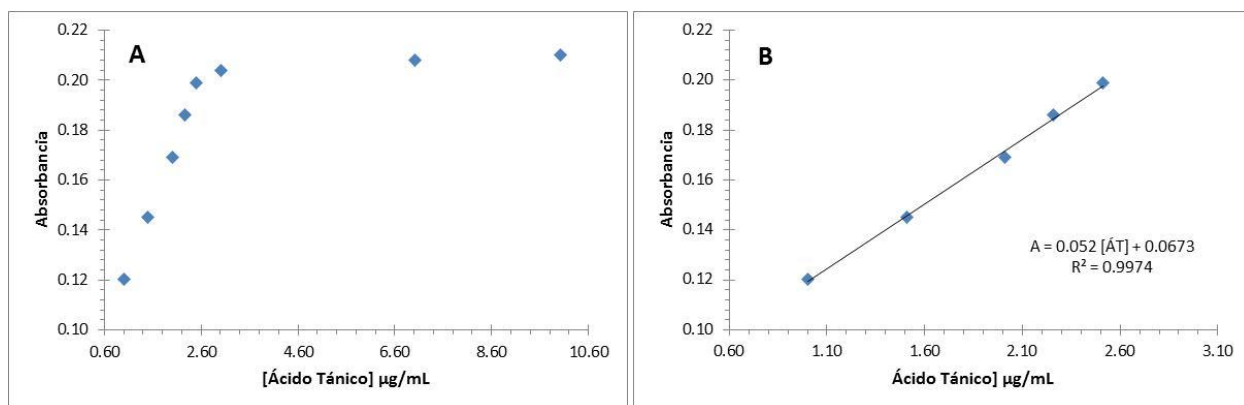
$$|t| = \frac{A_{promprom}^{MeOH/agua} - A_{promprom}^{acuoso}}{\sqrt{S_{con}^2 \left( \frac{1}{n_{MeOH/agua}} + \frac{1}{n_{acuoso}} \right)}}$$

$$|t| = \frac{0.272 - 0.232}{\sqrt{5.657 \times 10^{-5} \left( \frac{1}{3} + \frac{1}{3} \right)}} = 6.59$$

Como se observa,  $|t| > |t_c|$  ( $6.59 > 2.78$ ), rechazándose la hipótesis nula, comprobándose que hay diferencia estadísticamente significativa ( $\alpha=5\%$ ) entre las señales de un estándar de ácido tánico preparado en agua destilada y uno en metanol/agua 80:20 v/v, por lo que los extractos de la fracción fenólica del aceite de oliva obtenidos de acuerdo al Consejo Oleícola Internacional no pueden ser cuantificados con la curva de calibración preparada en medio acuoso (sección 5.6.3.), teniendo que prepararse una nueva curva de calibración de ácido tánico que involucre el medio metanólico.

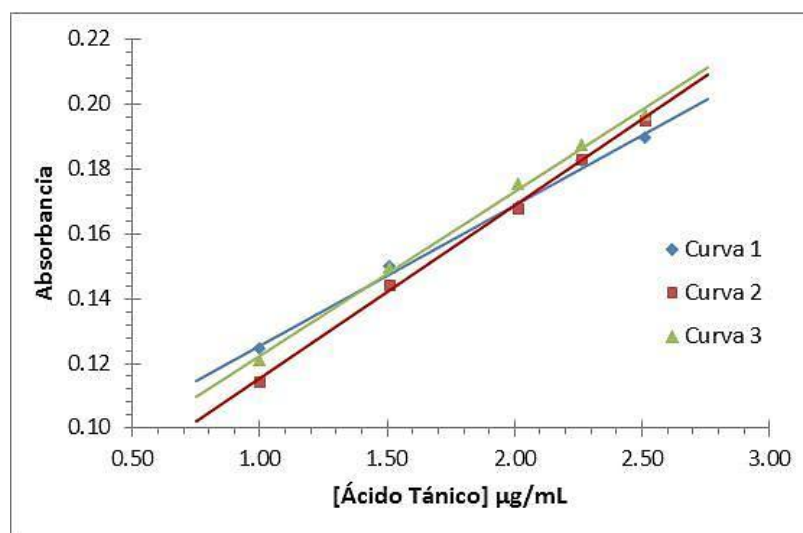
5.7.1.1. Construcción de la curva de calibración en metanol/agua (80:20 v/v) en lote.

En el **Gráfico 22** se presentan los resultados obtenidos para la determinación del intervalo lineal de la curva de calibración. Se determinó el intervalo lineal de 0.59 a 1.48  $\mu\text{mol/L}$  (1.00 a 2.51  $\mu\text{g/mL}$ ), ya que después de esta concentración la absorbancia es prácticamente constante y ya no presenta relación proporcional con el aumento de la concentración.



**Gráfica 22.** Comparación de la curva de calibración de ácido tánico en metanol/agua 80:20 v/v en lote. A) Sin considerar el intervalo lineal; B) Considerando el intervalo lineal determinado de 0.59 a 1.48  $\mu\text{mol/L}$  (1.00 a 2.51  $\mu\text{g/mL}$ ).

Una vez determinado el intervalo lineal se preparó una curva de calibración diariamente durante un periodo de tres días. Enseguida se presentan los valores de ordenada al origen y pendiente obtenidos para las rectas de las tres curvas de calibración, junto con su respectivo gráfico.



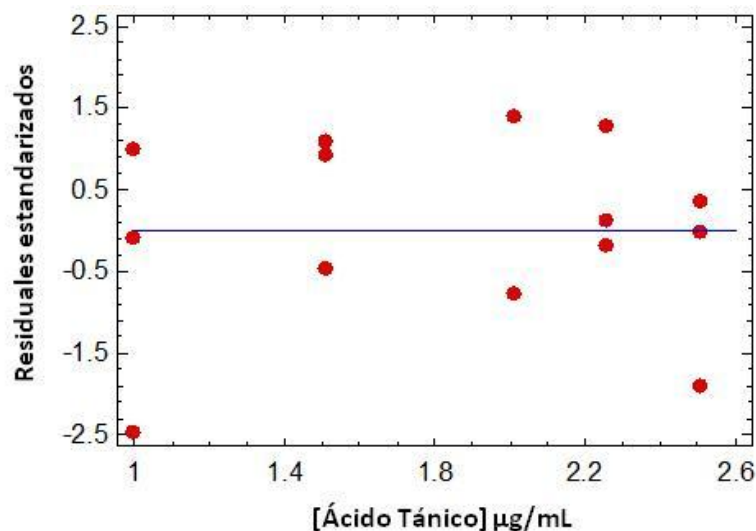
**Gráfica 23.** Comparación de las curvas de calibración de ácido tánico en metanol/agua 80:20 v/v preparadas diariamente durante un periodo de tres días de 0.59 a 1.48  $\mu\text{mol/L}$  (1.00 a 2.51  $\mu\text{g/mL}$ ).

**Tabla 24.** Parámetros estadísticos para cada una de las curvas de calibración de ácido tánico en metanol/agua 80:20 v/v preparadas durante un periodo de tres días.

No. Curva	Ordenada al origen	Error	Pendiente (mL/μg)	Error (mL/μg)	R <sup>2</sup>
1	0.0821	0.0036	0.0433	1.856x10 <sup>-3</sup>	0.9946
2	0.0621	0.0025	0.0532	1.27510 <sup>-3</sup>	0.9982
3	0.0715	0.0034	0.0507	1.77410 <sup>-3</sup>	0.9963

El ajuste de los datos se hizo considerando una regresión lineal tipo 1, dando por hecho que la única fuente de error aleatorio proviene del registro de la señal analítica (variable dependiente) y no de la concentración del estándar (variable independiente). A través del análisis de la gráfica de residuales, véase **Gráfica 24**, se determinó si los datos se ajustan al modelo seleccionado, en este caso el ajuste es adecuado, ya que los residuos se encuentran aleatoriamente distribuidos sin seguir ningún patrón; comportamiento típico de datos homocedásticos.

Una vez corroborando la conducta de los residuales y considerando los valores de absorbancia para las tres curvas de calibración, se construyó una sola curva de calibración empleando el *software STATGRAPHICS Centurion XVI.1*, la cual se muestra en la **Gráfica 25**, siendo de utilidad para la cuantificación de polifenoles totales de las muestras de aceite de oliva virgen extra al realizar las extracciones de la fracción fenólica de acuerdo con lo recomendado por el Consejo Oleícola Internacional.



**Gráfica 24.** Análisis de los residuos en función de la concentración de ácido tánico en medio metanólico para la regresión lineal de las curvas de calibración de 0.59 a 1.48 μmol/L (1.00 a 2.51 μg/mL).



Por otra parte debido a que el valor-P obtenido en el análisis de varianza (ANOVA) de los datos de las curvas de calibración es menor a 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre la respuesta analítica y la concentración de ácido tánico con un nivel de significancia de 95 %, como se observa en la **Tabla 25**.

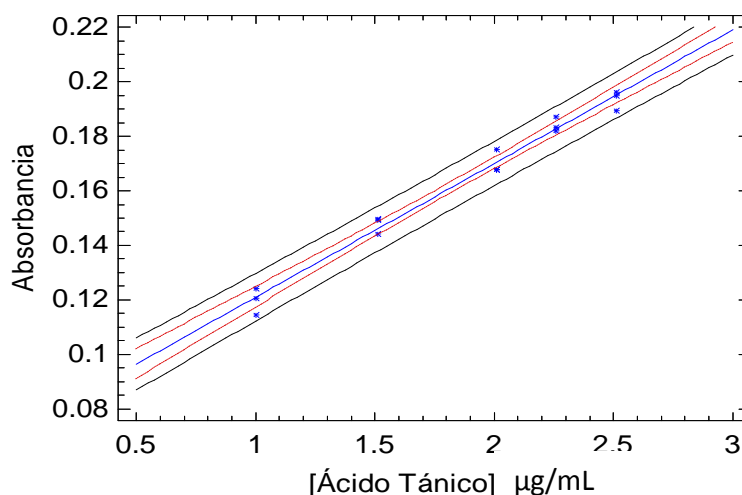
Por último, se realizó el cálculo de los coeficientes de regresión de la curva de calibración ajustada al modelo seleccionado (**Anexo 3**), con el intervalo de confianza al 95 %, cuyos resultados se localizan en la **Tabla 26**.

**Tabla 25.** Análisis de varianza de los datos obtenidos en la construcción de una sola curva de calibración de ácido tánico de 0.59 a 1.48  $\mu\text{mol/L}$  (1.00 a 2.51  $\mu\text{g/mL}$ ) metanol/agua 80:20 v/v.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.0105924	1	0.0105924	801.22	0.0000
Residual	0.000171864	13	$1.32203 \times 10^{-5}$		
Total	0.0107643	14			

**Tabla 26.** Coeficientes de la recta de regresión de la curva de calibración de ácido tánico en metanol/agua 80:20 v/v de 0.59 a 1.48  $\mu\text{mol/L}$  (1.00 a 2.51  $\mu\text{g/mL}$ ) con su intervalo de confianza al 95 %.

Parámetro	Valor estimado	Error estándar	Intervalo de confianza (95%)	
			Límite bajo	Límite alto
Ordenada al origen	0.0719	0.0034	0.07005	0.07379
Pendiente (mL/ $\mu\text{g}$ )	0.0491	0.0017	0.04531	0.05280
$R^2$	0.9975	-	-	-

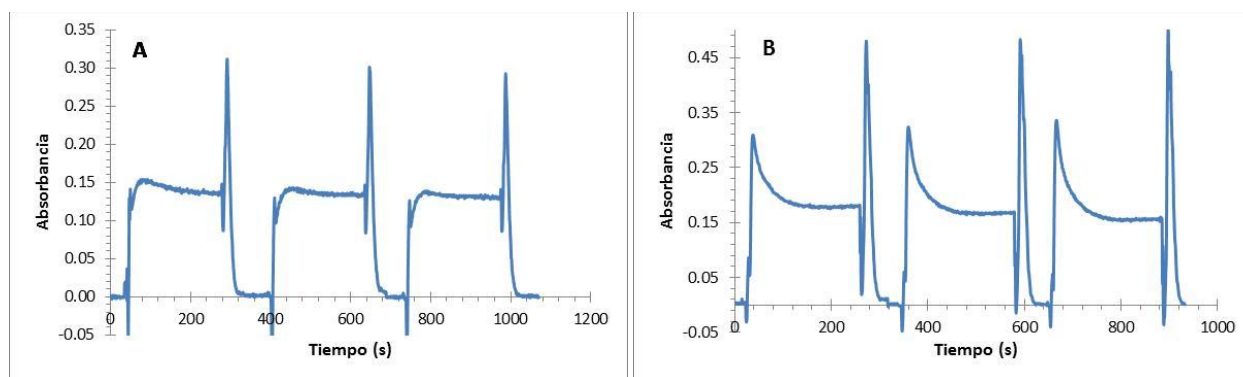


**Gráfica 24.** Curva de calibración de ácido tánico de 0.59 a 1.48  $\mu\text{mol/L}$  (1.00 a 2.51  $\mu\text{g/mL}$ ) en metanol/agua 80:20 v/v con su intervalo de confianza al 95 %, para la cuantificación de polifenoles totales en aceite de oliva virgen extra al realizar la extracción de la fracción fenólica de acuerdo con lo reportado por el COI.

El LOD y LOQ se determinaron considerando que, para una concentración menor a 0.59  $\mu\text{mol/L}$  (1.00  $\mu\text{g/mL}$ ) de ácido tánico, es decir de 0.15 a 0.44  $\mu\text{mol/L}$  (0.25 a 0.75  $\mu\text{g/mL}$ ), el producto de reacción en medio metanol/agua 80:20 v/v presenta desarrollo de color azul pero presencia de turbidez lo que hace imposible su medición espectrofotométrica, por lo que se decidió seleccionar como LOQ la concentración de 0.59  $\mu\text{mol/L}$  (1.00  $\mu\text{g/mL}$ ) y LOD 0.15  $\mu\text{mol/L}$  (0.25  $\mu\text{g/mL}$ ).

### 5.7.2. Comparativo de la cuantificación con base en la metodología de extracción.

Tanto el producto de reacción del extracto obtenido a través del microdispositivo como el producto de reacción del extracto de la metodología Bonoli et al., se cuantificaron empleando la curva de calibración de ácido tánico en medio acuoso, cuya construcción se encuentra en la sección 5.6.3. Debido a las diferencias estadísticamente significativas entre las señales analíticas de un estándar de ácido tánico preparado en medio acuoso y en metanol/agua 80:20 v/v, la fracción fenólica extraída siguiendo el método descrito por el COI, se cuantificó con la curva de calibración de ácido tánico en medio metanólico, véase sección 5.7.1. En la **Figura 48** se ejemplifican la forma de las señales analíticas registradas al cuantificar la muestra de aceite de oliva virgen extra *Las Doscientas Blend*.



**Figura 48.** Ejemplo de las señales analíticas obtenidas para la cuantificación de polifenoles totales del aceite de oliva virgen extra *Las Doscientas Blend*. **A)** Extracción en microdispositivo (medio acuoso) y **B)** Extracción Bonoli et al. (metanol/agua 60:40 v/v).

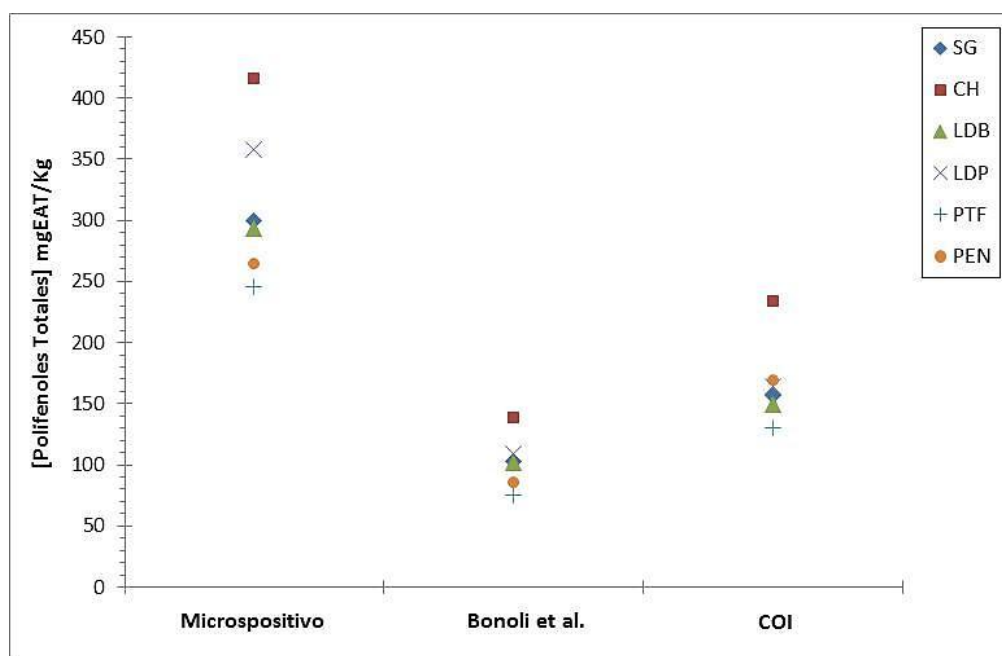
Los resultados de la cuantificación de polifenoles totales de las seis muestras de aceite de oliva virgen extra por el método de Folin-Ciocalteu se comparan en la **Tabla 27**. Como se aprecia la concentración de compuestos fenólicos varía en función del método de extracción empleado, registrándose la mayor concentración cuando se usa el microdispositivo para la separación de la fracción fenólica, seguido por la extracción sugerida por el COI y por último la recomendada por Bonoli et al. La tendencia en el comportamiento de extracción es visualmente más notoria si se analiza la **Gráfica 49**, en donde se presenta el promedio de las concentraciones de compuestos

fenólicos totales referida a la extracción realizada, para cada una de las seis muestras de aceite de oliva virgen extra.

**Tabla 27.** Concentración de polifenoles totales expresada como miligramos equivalentes de ácido tánico (mgEÁT) por kilogramo de aceite de oliva en función de la metodología de extracción.

[Polifenoles Totales] mgEÁT/kg ± S (n=3)			
Muestra de aceite de oliva virgen extra	Extracción microdispositivo	Extracción Bonoli et al.	Extracción Consejo Oleícola Internacional
Sierra de Gata, Cáceres (España)	299.50 ± 3.05	102.65 ± 5.23	156.75 ± 5.98
Casas Hualdo, Cornicabra (España)	415.74 ± 6.39	138.19 ± 11.26	233.65 ± 7.97
Las doscientas Blend, Arbequina/Picual (Chile)	293.15 ± 7.35	101.69 ± 5.36	148.86 ± 8.11
Las doscientas, Picual (Chile)	357.67 ± 10.04	108.84 ± 3.72	163.91 ± 10.78
Pons Tradicional, Frutado (España)	245.69 ± 10.23	75.53 ± 3.12	130.27 ± 2.47
Pons Ecológico, Natural (España)	264.19 ± 11.49	85.91 ± 3.85	168.87 ± 15.63

*S: desviación estándar*



**Gráfica 49.** Comparación del promedio del contenido de polifenoles totales, dependiendo la metodología de extracción, para las seis muestras de aceite de oliva virgen extra: Sierra de Gata (SG), Casas Hualdo (CH), Las Doscientas Blend (LDB), Las Doscientas Picual (LDP), Pons Tradicional Frutado (PTF), Pons Ecológico Natural (PEN).

La cantidad de polifenoles totales extraídos usando el microdispositivo fue mayor en un promedio de 67 % y 46 % en comparación con Bonoli et al. y el COI, respectivamente. Esta gran diferencia en la extracción puede atribuirse a diversos factores: primero hay que considerar la diversidad de compuestos constituyentes de la fracción fenólica en el aceite de oliva, es decir, ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, flavonoides, lignanos y secoiridoides (estos dos últimos siendo los compuestos más abundantes en él) [116], debido a su estructura química e independientemente de la metodología de extracción, ésta siempre será incompleta, quedando cierta cantidad de compuestos fenólicos retenidos en la fase orgánica, de esta manera los polifenoles pueden subdividirse en extraíbles y no extraíbles, entre los no extraíbles pueden encontrarse derivados de ácido benzoico y ácido cinámico que se unen a estructuras más complejas mediante enlaces glicosídicos (polifenoles hidrolizables), los cuales al ser retenidos en el residuo de la extracción, no son cuantificados produciendo una subestimación del contenido total de polifenoles. Con base en estudios previos de recuperación de polifenoles no extraíbles en matrices alimenticias [117,118], la manera más común de extraerlos es a través del uso de reacciones de hidrólisis, ya sea ácidas o básicas, para liberar la mayor cantidad de los compuestos que se encuentran asociados a polisacáridos o unidos entre sí formando complejos de alto peso molecular. Lo anterior demuestra la importancia de la naturaleza del extractante (proporción metanol/agua y pH).

Para los métodos de extracción convencionales el extractante consiste en una mezcla metanol/agua, a la cual se le midió el pH, obteniendo un valor promedio de 5.85 y 5.98 para las proporciones 60:40 y 80:20 v/v, respectivamente; el pH para ambas soluciones extractantes es prácticamente el mismo, por lo que las diferencias en la cuantificación pueden ser atribuidas a la cantidad de metanol, favoreciéndose la extracción cuando ésta es mayor. En el caso del método de extracción en el microdispositivo, el extractante empleado fue una solución amortiguadora de carbonato 0.75 mol/L pH 10.6, el cual efectúa la extracción principalmente debido al pH impuesto (sección 5.3.1.); este criterio es sumamente importante, ya que cuando se trabaja con una mezcla de disolventes como metanol/agua, el pH de extracción mantiene a los polifenoles en su forma molecular, mientras que cuando el pH es básico, la forma iónica de los compuestos fenólicos aporta una mayor afinidad hacia la fase acuosa, favoreciendo su extracción.

Por otro lado, estudios han demostrado que al realizar la extracción únicamente con una mezcla de metanol/agua sólo son recuperados entre 8 y 9 % de polifenoles extraíbles (preferentemente ácidos fenólicos libres) [118], lo que implica que poco más del 90 % de polifenoles hidrolizables como secoiridoides o ácidos fenólicos ligados a glucosa son retenidos en el aceite. Como ya se mencionó anteriormente, una forma de recuperarlos del residuo de la extracción es por medio de una hidrólisis ácida o básica, en este sentido la metodología propuesta sugiere que el uso de una solución extractante a pH básico puede provocar la hidrólisis de algunos compuestos presentes en el aceite, liberando la aglicona de oleuropeína o

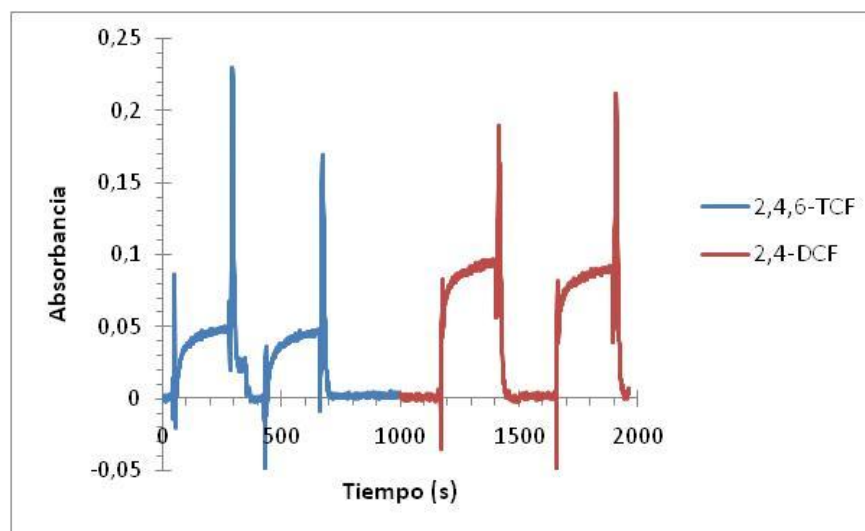
ligustrósido, aumentando en gran medida la cuantificación final de polifenoles totales. Asimismo, la extracción pudo haberse favorecido aún más si se hubiera considerado durante la experimentación el factor temperatura, ya que cuando ésta se realiza en condiciones de reflujo, entre 80 y 90 °C, el porcentaje de extracción se ve beneficiado [119].

Otro aspecto a considerar es la secuencia y número de pasos al realizar la extracción: para Bonoli et al. se repitió por triplicado la agitación en el vórtex y la separación de fases, lo que pudo provocar pérdidas inminentes cada vez que se aisló el extracto. En la metodología del COI únicamente se lleva a cabo una vez la separación de la fase acuosa, por lo que la pérdida de compuestos fenólicos en este sentido es menor, sin embargo, hay que tener presente que fue necesario filtrar los extractos antes de ser cuantificados, éste paso extra pudo disminuir directamente la cantidad de polifenoles totales. El microdispositivo presenta la ventaja de no ser un método de extracción multipasos, lo que implica la disminución de la pérdida de analito, además, al trabajar en un dispositivo con diámetro de canales en el orden de micras para realizar la extracción se tiene la ventaja del aumento en la relación superficie/volumen, es decir, el área de contacto entre la muestra de aceite de oliva en n-hexano y la solución amortiguadora de carbonatos es amplificada al tener la formación de muchas microgotas dentro de los canales, aumentando así la transferencia de masa, véase sección 5.5.

Los puntos anteriormente mencionados pueden explicar hasta cierto punto las drásticas diferencias en la cuantificación, sin embargo, también hay que considerar las propiedades redox frente al reactivo de Folin-Ciocalteu de los polifenoles extraídos, ya que éstos se extraerán en diferente proporción con base en el extracto. No obstante, no puede descartarse la idea de que las condiciones de extracción en el microchip involucren la presencia de alguna otra especie de naturaleza no fenólica que reaccione con el reactivo de Folin al no ser una reacción específica.

### 5.8. Eficiencia de extracción.

El estándar de ácido tánico, con el que se construyó la curva de calibración, no mostró solubilidad en n-hexano ni aceite, por lo que no era adecuado para la estimación de los porcentajes de recuperación de las metodologías de extracción. En este caso, se decidió emplear un estándar de naturaleza fenólica que presentara solubilidad en n-hexano; se probaron dos estándares: 2,4,6-Triclorofenol (2,4,6-TCF) y 2,4-Diclorofenol (2,4-DCF) a una misma concentración y se seleccionó aquel con el que se obtuviera una señal más alta después de realizar la extracción bajo las condiciones óptimas en el microchip. Como se observa en la **Gráfica 50**, el cloro extra en la estructura del 2,4,6-TCF le da una mayor afinidad hacia la fase orgánica, por lo que se extrae menos cantidad de este compuesto en comparación con el 2,4-DCF, seleccionando este último para realizar el estudio de recuperación por poseer una mayor sensibilidad.



**Gráfica 50.** Señales analíticas para los estándares de 2,4,6-TCF y 2,4-DCF en n-hexano extraídos empleando el microdispositivo diseño 4 a las condiciones óptimas.

### 5.8.1. Extracción con el estándar 2,4-Diclorofenol.

Este estudio se realizó con dos propósitos: (1) Fines comparativos entre las metodologías de extracción y (2) Obtener valores numéricos empleando un estándar que respalde los resultados de cuantificación de polifenoles totales de las muestras de aceite de oliva.

Los resultados de los porcentajes de extracción obtenidos por los tres métodos se presentan en la **Tabla 28**, como se observa las extracciones con el estándar 2,4-DCF evidencian el mismo comportamiento que las muestras de aceite de oliva virgen extra, es decir, la mayor extracción se logró con el uso del microdispositivo, seguido por la extracción propuesta por el COI y por último Bonoli et al. Sin embargo, esto no implica que con el microdispositivo únicamente se extraiga alrededor del 40 % de compuestos fenólicos, ya que los porcentajes calculados no pueden ser directamente relacionados con la extracción de la fracción fenólica, debido a que el estándar 2,4-DCF presenta una mayor solubilidad y por ende afinidad hacia la fase orgánica (n-hexano), lo que implica que su porcentaje de extracción será mucho menor que el que presentan los polifenoles.

Asimismo, es importante considerar la elevada solubilidad que presenta el estándar en metanol, 1 g/10 mL [120], en comparación con su solubilidad en agua, 0.05 g/10 mL [121]. Analizando estos datos se esperaría extraer más cantidad de éste empleando como extractante metanol/agua 8:20 (COI), sin embargo, no ocurrió así, demostrándose la eficacia del uso del microdispositivo y la solución amortiguadora de carbonato 0.75 mol/L pH 10.6 para realizar la extracción de compuestos de naturaleza fenólica.

Tabla 28. Eficiencia de extracción de las tres metodologías de extracción del estándar 2,4-DCF.

Método de extracción	No. Extracción	[2,4-Diclorofenol] mgEÁT/L		% Extracción	% Extracción <sub>prom</sub> ± S (n=3)
		Real	Encontrada		
Microdispositivo	1	20.01	8.06	40.27	39.90 ± 0.68
	2		7.83	39.11	
	3		8.07	40.31	
Bonoli et al.	1	58.16	4.59	7.89	8.28 ± 0.46
	2		4.75	8.17	
	3		5.11	8.79	
COI	1	13.96	2.35	16.83	15.40 ± 1.50
	2		1.93	13.83	
	3		2.15	15.40	

*S: desviación estándar*

## 6. Conclusiones

Pese a la incompatibilidad entre el PDMS y el disolvente n-hexano/aceite de oliva, las técnicas de fotolitografía y litografía suave demostraron ser de utilidad para la construcción rápida y en masa de microdispositivos con una duración de por lo menos 8 h durante un día de uso, lo que implica la realización de alrededor de 80 extracciones, obteniendo señales analíticas repetibles y reproducibles. Cada microchip tiene un costo de fabricación aproximado de \$0.37 USD una vez que se ha construido el molde.

Se logró desarrollar y optimizar la extracción líquido-líquido de los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva virgen extra, encontrando que los factores estadísticamente significativos en la extracción son el pH, las concentraciones de la solución amortiguadora y reactivo de Folin-Ciocalteu, además el aumento en la longitud del serpentín de extracción influye positivamente en la misma. El producto de reacción de la fracción fenólica extraída empleando el método de Folin-Ciocalteu se detectó espectrofotométricamente con fibras ópticas fuera del microdispositivo a través del uso de una celda de flujo.

Se analizaron seis muestras de aceite de oliva virgen extra extrayendo la fracción fenólica por tres metodologías diferentes. La cuantificación como contenido de polifenoles totales expresada en mgEÁT/kg demostró que el uso del microdispositivo es más eficiente, logrando extraer desde 46 % hasta 67 % más cantidad de polifenoles; tendencia que se corroboró con los porcentajes de recuperación del estándar 2,4-Diclorofenol en n-hexano, los cuales, aunque no pueden ser directamente relacionados con la extracción de polifenoles de la muestra de aceite de oliva, debido a su naturaleza y menor solubilidad en medio acuoso, sirven para obtener un valor numérico que respalde los resultados observados.

La metodología propuesta con el uso del microdispositivo presenta las ventajas de requerir menor cantidad de muestra y reactivos, lo que se traduce en menos generación de residuos. Asimismo, hay una manipulación mínima por parte del usuario y corto tiempo de análisis, pudiendo realizar hasta 10 extracciones con cuantificación por hora (aproximadamente tres muestras diferentes de aceite de oliva por triplicado en una hora).



## 7. Perspectivas

Con el diseño de los microcanales, la configuración propuesta y las condiciones óptimas encontradas para la extracción líquido-líquido de los compuestos fenólicos en aceite de oliva se obtuvieron buenos resultados en la cuantificación de polifenoles totales, sin embargo, la duración del microdispositivo es corta, considerándose únicamente como un prototipo, por lo que se espera seguir trabajando en la búsqueda de un material diferente al PDMS que no tenga incompatibilidad con la fase orgánica (aceite de oliva y n-hexano) para que de esta manera tenga un mayor tiempo de vida y no sea considerado “desechable”. Este cambio de material podría realizarse por medio de la construcción de un microchip completamente de vidrio o bien empleando la impresión 3D y variando la resina impresora.

Asimismo, después del cambio de material se espera poder proponer un nuevo diseño que permita realizar la separación de fases y detección espectrofotométrica en el mismo microdispositivo, ahorrando de esta manera un mayor tiempo de análisis por muestra.

## 8. Anexos

**Anexo 1.** Determinación de la ecuación de regresión para la optimización de la extracción de polifenoles en aceite de oliva a través del diseño de experimentos factorial completo  $2^4$ .

Coeficiente	Valor estimado
Constante	0.757125
A:[NaOH]	0.235875
B:[Reactivo F-C]	-0.188
C:Caudal	0.088
D:Microchip	-0.047375
AB	0.08025
AC	0.0815
AD	-0.012125
BC	-0.129875
BD	0.02875
CD	0.014

La ecuación del modelo codificado es:

$$\text{Absorbancia} = 0.757125 + 0.235875*A - 0.188*B + 0.088*C - 0.047375*D + 0.08025*AB + 0.0815*AC - 0.012125*AD - 0.129875*BC + 0.02875*BD + 0.014*C$$

**Anexo 2.** Cálculo de los coeficientes de regresión lineal con su intervalo de confianza al 95 % para la curva de calibración de ácido tánico de 3.01 a 19.06 µg/mL en medio acuoso.

$x$	$y$	$(x-x_{prom})$	$(x-x_{prom})^2$	$(y-y_{prom})$	$(x-x_{prom})(y-y_{prom})$	$x^2$	$y_{predicha}$	$(y-y_{predicha})$	$(y-y_{predicha})^2$
3.01	0.037	-8.358	69.862	-0.125	1.042	9.060	0.032	0.005	0.000022
7.02	0.081	-4.348	18.908	-0.081	0.351	49.280	0.094	-0.013	0.000179
10.03	0.143	-1.338	1.791	-0.019	0.025	100.601	0.141	0.002	0.000004
13.04	0.190	1.672	2.794	0.028	0.047	170.042	0.188	0.002	0.000006
16.05	0.243	4.682	21.918	0.081	0.381	257.603	0.234	0.009	0.000079
19.06	0.282	7.692	59.162	0.120	0.926	363.284	0.281	0.001	0.000002
3.01	0.030	-8.358	69.862	-0.132	1.101	9.060	0.032	-0.002	0.000005
7.02	0.094	-4.348	18.908	-0.068	0.294	49.280	0.094	0.000	0.000000
10.03	0.130	-1.338	1.791	-0.032	0.042	100.601	0.141	-0.011	0.000120
13.04	0.178	1.672	2.794	0.016	0.027	170.042	0.188	-0.010	0.000091
16.05	0.229	4.682	21.918	0.067	0.315	257.603	0.234	-0.005	0.000026
19.06	0.267	7.692	59.162	0.105	0.810	363.284	0.281	-0.014	0.000187
3.01	0.034	-8.358	69.862	-0.128	1.067	9.060	0.032	0.002	0.000003
7.02	0.085	-4.348	18.908	-0.077	0.333	49.280	0.094	-0.009	0.000088
10.03	0.122	-1.338	1.791	-0.040	0.053	100.601	0.141	-0.019	0.000359
13.04	0.183	1.672	2.794	0.021	0.036	170.042	0.188	-0.005	0.000021
16.05	0.233	4.682	21.918	0.071	0.334	257.603	0.234	-0.001	0.000001
19.06	0.268	7.692	59.162	0.106	0.818	363.284	0.281	-0.013	0.000161
3.01	0.030	-8.358	69.862	-0.132	1.101	9.060	0.032	-0.002	0.000005
7.02	0.095	-4.348	18.908	-0.067	0.290	49.280	0.094	0.001	0.000000
10.03	0.151	-1.338	1.791	-0.011	0.014	100.601	0.141	0.010	0.000101
13.04	0.205	1.672	2.794	0.043	0.072	170.042	0.188	0.017	0.000305
16.05	0.233	4.682	21.918	0.071	0.334	257.603	0.234	-0.001	0.000001
19.06	0.285	7.692	59.162	0.123	0.949	363.284	0.281	0.004	0.000019
3.01	0.034	-8.358	69.862	-0.128	1.067	9.060	0.032	0.002	0.000003
7.02	0.086	-4.348	18.908	-0.076	0.329	49.280	0.094	-0.008	0.000070
10.03	0.14	-1.338	1.791	-0.022	0.029	100.601	0.141	-0.001	0.000001
13.04	0.193	1.672	2.794	0.031	0.052	170.042	0.188	0.005	0.000030
16.05	0.227	4.682	21.918	0.065	0.306	257.603	0.234	-0.007	0.000050
19.06	0.265	7.692	59.162	0.103	0.795	363.284	0.281	-0.016	0.000246
3.01	0.035	-8.358	69.862	-0.127	1.059	9.060	0.032	0.003	0.000007
7.02	0.094	-4.348	18.908	-0.068	0.294	49.280	0.094	0.000	0.000000
10.03	0.15	-1.338	1.791	-0.012	0.016	100.601	0.141	0.009	0.000082
13.04	0.204	1.672	2.794	0.042	0.071	170.042	0.188	0.016	0.000271
16.05	0.249	4.682	21.918	0.087	0.409	257.603	0.234	0.015	0.000222
19.06	0.282	7.692	59.162	0.120	0.926	363.284	0.281	0.001	0.000002
3.01	0.036	-8.358	69.862	-0.126	1.050	9.060	0.032	0.004	0.000013
7.02	0.096	-4.348	18.908	-0.066	0.286	49.280	0.094	0.002	0.000003

10.03	0.148	-1.338	1.791	-0.014	0.018	100.601	0.141	0.007	0.000050
13.04	0.186	1.672	2.794	0.024	0.041	170.042	0.188	-0.002	0.000002
16.05	0.248	4.682	21.918	0.086	0.404	257.603	0.234	0.014	0.000193
19.06	0.289	7.692	59.162	0.127	0.979	363.284	0.281	0.008	0.000069
$x_{prom}$	$y_{prom}$		$\Sigma(x-x_{prom})^2$		$\Sigma(x-x_{prom})(y-y_{prom})$	$\Sigma x^2$			$\Sigma(y-y_{predicha})^2$
<b>11.37</b>	<b>0.162</b>		<b>29.073</b>		<b>0.450</b>	<b>158.312</b>			<b>0.000074</b>

Donde:

$x$  = [Ácido Tánico] µg/mL

$y$  = absorbancia

El cálculo de la pendiente ( $b_1$ ) y la ordenada al origen ( $b_0$ ) de la recta de regresión se hizo a través de las siguientes ecuaciones:

$$b_1 = \frac{\Sigma(x - x_{prom})(y - y_{prom})}{\Sigma(x - x_{prom})^2} \quad (12)$$

$$b_0 = y_{prom} - b_1 x_{prom} \quad (13)$$

La desviación estándar de regresión ( $S_{y/x}$ ), de la pendiente ( $S_1$ ) y la ordenada al origen ( $S_0$ ) se calcularon con las siguientes ecuaciones, donde  $n$  es el número de mediciones para la construcción de la curva de calibración, en este caso  $n=42$ :

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\Sigma(y - y_{predicha})^2}{n - 2}} \quad (14)$$

$$S_1 = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\Sigma(x - x_{prom})^2}} \quad (15)$$

$$S_0 = S_{y/x} \sqrt{\frac{\Sigma x^2}{n \Sigma(x - x_{prom})^2}} \quad (16)$$

Los límites de confianza de la pendiente y la ordenada al origen están dados por las siguientes expresiones, en donde el valor  $t$  ( $t = 2.16$ ) se obtuvo para una prueba de dos colas con un nivel de significancia de 95 % con 13 grados de libertad:

$$b_0 \pm t_{(n-2)}S_0 \quad (17)$$

$$b_1 \pm t_{(n-2)}S_1 \quad (18)$$

Por lo tanto para la curva de calibración de ácido tánico en medio acuoso:

$$b_1 = 0.0155$$

$$b_0 = -0.0142$$

$$S_{y/x} = 1.3585 \times 10^{-3}$$

$$S_1 = 2.2195 \times 10^{-4}$$

$$S_0 = 4.8916 \times 10^{-4}$$

$$\text{Intervalo de confianza de la pendiente: } 0.0155 \pm 5.09 \times 10^{-4}$$

$$\text{Intervalo de confianza de la ordenada al origen: } -0.0142 \pm 9.86 \times 10^{-4}$$

**Anexo 3.** Cálculo de los coeficientes de regresión lineal con su intervalo de confianza al 95 % para la curva de calibración de ácido tánico de 1.00 a 2.51  $\mu\text{g/mL}$  en metanol/agua 80:20 v/v.

$x$	$y$	$(x-x_{prom})$	$(x-x_{prom})^2$	$(y-y_{prom})$	$(x-x_{prom})(y-y_{prom})$	$x^2$	$y_{predicha}$	$(y-y_{predicha})$	$(y-y_{predicha})^2$
1.00	0.124	-0.858	0.736	-0.039	0.033	1.000	0.121	0.003	0.000010
1.00	0.114	-0.858	0.736	-0.049	0.042	1.000	0.121	-0.007	0.000045
1.00	0.121	-0.858	0.736	-0.042	0.036	1.000	0.121	0.000	0.000000
1.51	0.150	-0.348	0.121	-0.013	0.005	2.280	0.146	0.004	0.000014
1.51	0.144	-0.348	0.121	-0.019	0.007	2.280	0.146	-0.002	0.000003
1.51	0.149	-0.348	0.121	-0.014	0.005	2.280	0.146	0.003	0.000010
2.01	0.168	0.152	0.023	0.005	0.001	4.040	0.171	-0.003	0.000007
2.01	0.168	0.152	0.023	0.005	0.001	4.040	0.171	-0.003	0.000007
2.01	0.175	0.152	0.023	0.012	0.002	4.040	0.171	0.005	0.000022
2.26	0.182	0.402	0.162	0.019	0.008	5.108	0.183	-0.001	0.000000
2.26	0.183	0.402	0.162	0.020	0.008	5.108	0.183	0.000	0.000000
2.26	0.187	0.402	0.162	0.024	0.010	5.108	0.183	0.004	0.000019
2.51	0.189	0.652	0.425	0.026	0.017	6.300	0.195	-0.006	0.000033
2.51	0.195	0.652	0.425	0.032	0.021	6.300	0.195	0.000	0.000000
2.51	0.196	0.652	0.425	0.033	0.022	6.300	0.195	0.001	0.000002
$x_{prom}$	$y_{prom}$		$\Sigma(x-x_{prom})^2$		$\Sigma(x-x_{prom})(y-y_{prom})$	$\Sigma x^2$			$\Sigma(y-y_{predicha})^2$
1.858	0.163		0.293		0.014	3.746			0.000011

Aplicando las Ecuaciones 12 a 28, para la curva de calibración de ácido tánico en medio metanólico se tiene:

$$b_1 = 0.0491$$

$$b_0 = 0.0719$$

$$S_{y/x} = 9.3880 \times 10^{-4}$$

$$S_1 = 1.7331 \times 10^{-3}$$

$$S_0 = 8.6606 \times 10^{-4}$$

$$\text{Intervalo de confianza de la pendiente: } 0.0491 \pm 1.8707 \times 10^{-3}$$

$$\text{Intervalo de confianza de la ordenada al origen: } 0.0719 \pm 3.7436 \times 10^{-3}$$

## 9. Referencias

- [1] Calderón, J.C. (2012). *Diseño, construcción y funcionamiento de microchips, aplicados a microfluidos a través de dos métodos de microfabricación*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- [2] Lozano, J., Segura, A. y Fernández, A. (2009). Cap. 7 Composición del aceite de oliva. En *El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía* (pp. 193-220). Granada, España: Unicaja Editorial.
- [3] Garcia, P., Morales, A., Segura, A. y Fernández A. (2010). Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, *15*, 8813-8826.
- [4] Hibara, A., Tokeshi, M., Uchiyama, K., Hisamoto, H. y Kitamori, T. (2001). Integrated multilayer flow system on a microchip. *Anal. Sci.*, *17*, 89-93.
- [5] Kralj, J., Sahoo, H. y Jensen, K. (2007). Integrated continuous microfluidic liquid-liquid extraction. *Lab. Chip*, *7*, 256-263.
- [6] Sato, K., Tokeshi, M., Sawada, T. y Kitamori, T. (2000). Molecular transport between two phases in a microchannel. *Anal. Sci.*, *16*, 455-456.
- [7] Singleton, V. L., Orthofer, R. y Lamuela, R. M. (1974). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Am. J. Enol. Vitic.*, *25* (119), 152-178.
- [8] Barranco, D., Fernández, R. y Rallo, L. (2008). *El cultivo del olivo*. (6ª ed.) Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa.
- [9] n/a. (s.f.) *Tema 1.- Conceptos básicos* [archivo PDF]. (pp. 1-20). Recuperado de <https://www.uclm.es/profesorado/porrasysoriano/tfcaps1/pdf/TEMA1.pdf> (último acceso 18 de octubre de 2016).
- [10] Escobar, P. A. (2010). *Validación y desarrollo de una metodología analítica para la determinación de polifenoles totales en aceites de oliva mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Chile.
- [11] Casanovas, M. (2012). *Metabolismo de compuestos fenólicos en olivas y estudio de aceites de oliva singulares de la provincia Lleida*. Tesis doctoral. Universitat de Lleida.
- [12] Chávez, M. M. (2009). *Estudio de la composición de ácidos grasos insaturados (oleico, linoleico y linolénico) en aceites de oliva virgen extra de venta en el mercado mexicano, por cromatografía de gases*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- [13] Norma Mexicana NMX-F-109-SCFI-2014. Alimentos-Aceite de Oliva-Especificaciones. Diario Oficial de la Federación, 11 de agosto de 2014.
- [14] Consejo Oleícola Internaciona COI/T.15/NC n°3/Rev. 7. Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva. Mayo de 2013.
- [15] Yufra, V. M. (2013). *Evaluación del tratamiento con radiación UV para la eliminación de residuos de plaguicidas en aceite de oliva virgen*. Tesis doctoral. Universidad de Jaén.

- [16] International Olive Council [en línea]. Recuperado de <http://www.internationaloliveoil.org/> (último acceso 18 de octubre de 2016).
- [17] Inma Agribusiness Program (2011). *Olives Production Manual*. Washington, DC: U.S. Agency for International Development.
- [18] Porras, A., Marcilla, I., González, J.A., Redondo, A. y Porras, A. (s.f.). *Recolección mecanizada de aceituna*. Universidad de Castilla-La Mancha.
- [19] Gimeno, E. (2004). Compuestos fenólicos: Un análisis de sus beneficios para la salud. *OFFARM*, 23 (6), 80-84.
- [20] Artajo, L.S., Romero, M.P., Morelló, J.R. y Motilva, M.J. (2006). Enrichment of refined olive oil with phenolic compounds: evaluation of their antioxidant activity and their effect on the bitter. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (16), 6079-6088.
- [21] Mateos, R., Cert, A., Pérez-Camino, M. C. y García, J. M. (2004). Evaluation of virgin olive oil bitterness by quantification of secoiridoid derivatives. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 81, 71-75.
- [22] Owen, R. W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B. y Bartsch, H. (2000) Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. *Clinical Chem.*, 46, 976-988.
- [23] Brenes, M., Hidalgo, F. J., García, A., Ríos, J.J., Zamora, R. (2000). Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, 715-720.
- [24] Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M. y Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.*, 7 (6), 271-278.
- [25] Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., et al. (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, 18, 98-112.
- [26] Visioli, F. y Galli, C. (1998a). Olive oil phenols and their potential effects on human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4292-4296.
- [27] Visioli, F. y Galli, C. (1998b). The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutrition Reviews*, 56, 142-147.
- [28] Elejalde Guerra J. (2001). Oxidative stress, diseases and antioxidant treatment. *An Med Interna*, 18 (6), 326-335.
- [29] Lee, J., Koo, N., y Min, D. B. (2004). Reactive oxygen species, aging and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safe*, 3 (1), 21-33.
- [30] Aeschbach, R., Loliger, J., Scott, B. C., Murcia, A., et al. (1994). Antioxidant actions of tymol, carvacrol, 6-gingerol, xingerone and hidroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*, 32, 31-36.
- [31] Visoli, F., Bellomo, G., Montedoro, G. F. y Galli, C. (1995). Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis*, 117, 25-32.



- [32] Auroma, O. I., Deiana, M., Jenner, A., et al. (1998). Effect of hidroxytyrosol found in virgen extra olive oil on DNA damage and on low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 5181-5197.
- [33] Papadopoulos, G. y Boskou, D. (1991). Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68, 669-671.
- [34] Bendini, A., Bonoli, M., Cerretani, L., et al. (2003). Liquid-liquid and solid-phase extractions of phenols from virgin oli and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. *Journal of Chromatography A*, 985, 425-433.
- [35] Escarpa, A. y González, M. C. (2001). An Overview of Analytical Chemistry of Phenolic Compounds in Foods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 31 (2), 57-139.
- [36] Bendini A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., et al. (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules*, 12 (8), 1679-1719.
- [37] Ouni, Y., Taamalli, A., Gómez-Caravaca A. M., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., et al. (2011). Characterisation and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils according to their geographical origin by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. *Food Chemistry* 127, 1263-1267.
- [38] Mertz, C., Gancel, A. L., Punata, Z., Alter, P., Dhuique-Mayer, C. et al. (2009). Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity of three tropical fruits. *J. Food. Compos. Anal.*, 22, 381-387.
- [39] Luthria, D. L. (2008). Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. *Food Chemistry*, 107, 745-752.
- [40] Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A. y Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, 15, 8813-8826.
- [41] Pirisi, F. M., Cabras, P., Falqui Cao, C., Migliorini, M. y Muggelli, M. (2000). Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 2. Reappraisal of the Extraction, HPLC Separation, and Quantification Procedures. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1191-1196.
- [42] Bonoli, M., Montanucci, M., Gallina Toschi, T. y Lercker, G. (2003). Fast separation and determination of tyrosol, hidroxytyrosol and other phenolic compounds in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis with ultraviolet-diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 1011, 163-172.
- [43] Izquierdo, R. y del Cacho, C. (2011). *Determinación de compuestos orgánicos*. Madrid, España: Editorial Reverté.
- [44] Martín-Esteban, A. y Fernández-Hernando, P. (2004). Preparación de la muestra para la determinación de analitos orgánicos. En C. Cámara (Ed), *Toma y Tratamiento de muestras* (pp. 291-303). Madrid, España: Editorial Síntesis.

- [45] Palma, M., Piñeiro, Z. y Barroso, C. F. (2002). In-line pressurized-fluid extraction-solid-phase extraction for determining phenolic compounds in grapes. *Journal of Chromatography A*, 968, 1-6.
- [46] Gómez, A. M., Carrasco, A., Cañabate, B., Segura, A. y Fernández, A. (2005). Electrophoretic identification and quantitation of compounds in the polyphenolic fraction of extra-virgin olive oil. *Electrophoresis*, 26, 3538-3551.
- [47] Kokosa, J. M. (2013). Advances in solvent-microextraction techniques. *Trends in Analytical Chemistry*, 43, 2-13.
- [48] Spietelun, A., Marcinkowski, L., De la Guardia, M. y Namiesnik, J. (2014). Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques. *Talanta*, 119, 34-45.
- [49] Montes Goyanes, R. M. (2009). Avances en técnicas de microextracción para la determinación de compuestos traza en muestras medioambientales y alimentarias. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- [50] Hong, C., Qun, F., Xue-Feng, Y. y Zhao-Lun, F. (2005). Microfluidic chip-based liquid-liquid extraction and preconcentration using a subnanoliter-droplet trapping technique. *Lab Chip*, 5, 719-725.
- [51] Rezaee, M., Assadi, Y., Milani Hosseini, M. R., Aghaee, E., Ahmadi, F. y Berijani, S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1116, 1-9.
- [52] Herrera-Herrera, A. V., Asensio-Ramos, M., Hernández-Borges, J. y Rodríguez-Delgado, M.T. (2010). Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. *Trends Anal. Chem.*, 29, 728-751.
- [53] Kohler, I., Schappler, J., Sierro, T. y Rudaz, S. (2013). Dispersive liquid-liquid microextraction combined with capillary electrophoresis and time-of-flight mass spectrometry for urine analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 73, 82-89.
- [54] Salic, A., Tusek, A., Fabek, D., Rukavina, I. y Zelic, B. (2011). Aqueous Two-Phase Extraction of Polyphenols Using a Microchannel System – Process Optimization and Intensification. *Food Technol. Biotechnol.*, 49 (4) 495-501.
- [55] Kralj, J. G., Sahoo, H. R. y Jensen, K. F. (2006). Integrated continuous microfluidic liquid-liquid extraction. *Lab Chip*, 7, 256-263.
- [56] Mary, P., Studer, V. y Tabelling, P. (2008). Microfluidic Droplet-Based Liquid-Liquid Extraction. *Anal. Chem.*, 80, 2680-2687.
- [57] Tatsuo, M., Hironari, M., Jun-ichi, U., Fukiko, K., Noriho, K. y Masahiro G. (2004). Liquid Membrane Operations in a Microfluidic Device for Selective Separation of Metal Ions. *Anal. Chem.*, 76, 4495-4500.
- [58] Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Dendini, A., Segura-Carretero, A., Gallina-Toschi, T. y Fernández-Gutiérrez, A. (2005). Analytical determination of polyphenols in olive oils. *J. Sep. Sci.*, 28, 837-858.
- [59] Bayram, B., Ozcelik, B., Schulthesis, G., Frank, J., y Rimbach, G. (2013). A validated method for the determination of selected phenolics in olive oil using high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection and a fused-core column. *Food Chemistry*, 138, 1663-1669.

- [60] Bayram, B., Esatbeyoglu, T., Schulze, N., Ozcelik, B., Frank, J., y Rimbach, G. (2012). Comprehensive Analysis of Polyphenols in 55 Extra Virgin Olive Oils by HPLC-ECD and Their Correlation with Antioxidant Activities. *Plant. Foods Hum. Nutr.*, *67*, 326-336.
- [61] Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A.M., Segura-Carretero, A., Cerretani, L., Bendini, A., y Fernández-Gutiérrez, A. (2009). Use of capillary electrophoresis with UV detection to compare the phenolic profiles of extra-virgin olive oils belonging to Spanish and Italian PDOs and their relation to sensorial properties. *J. Sci. Food Agric.*, *89*, 2144-2155.
- [62] Augusto-Ballus, C., Dillenburg-Meinhardt, A., Edward-Bruns, R. y Teixeira-Godoy, H. (2011). Use of multivariate statistical techniques to optimize the simultaneous separation of 13 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary electrophoresis. *Talanta*, *83*, 1181-1187.
- [63] Chengjun, W. y Yuegang, Z. (2011). Ultrasound-assisted hydrolysis and gas chromatography-mass spectrometric determination of phenolic compounds in cranberry products. *Food Chemistry*, *128*, 562-568.
- [64] Folin, O. y Ciocalteu, V. (1927). On Tyrosine and Tryptophane Determinations in Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, *68* (2), 627-650.
- [65] Domínguez I Pedrós, A. (2010-11). *Estudio de la capacidad antioxidante de hojas de Ginkgo biloba*. Tesis de Licenciatura. Universitat Politècnica de Catalunya.
- [66] Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Basilio Heredia, J., Cisneros-Zevallos, L. y Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin-Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal. Methods*, *5*, 5990-5999.
- [67] 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.
- [68] Abril Díaz, N., Bárcena Ruiz, J. A., Fernández Reyes, E., Galván Cejudo, A., Jorrín Novo, J., et al. (s.f.). 8. *Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas* [archivo PDF]. (pp. 1-8). Recuperado de [http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08\\_ESPECTROFOTOMETR%C3%8DA.pdf](http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETR%C3%8DA.pdf) (último acceso 20 de octubre de 2016).
- [69] FiaLab (s.f.). *The SMA Z-Flow Cell Series* [en línea]. Recuperado de <http://www.flowinjection.com/products/flow-cells?sid=61:flow-cells> (último acceso 20 de octubre de 2016).
- [70] Hernández Maya, F. M. (2016). *Evaluación de la enzima  $\beta$ -Glucosidasa utilizando dispositivos Lab-on-chip*. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- [71] Whitesides, G. M. (2006). The origin and the future of microfluidics. *Nature*, *442* (7101), 368-373.
- [72] Shames, I. H. (1995). *Mecánica de Fluidos*. (3ª ed.). Bogotá, Colombia: McGraw-Hill.
- [73] Chakraborty, S. (2010). *Microfluidics and Microfabrication*. Nueva York, E.U.A.: Springer Science+Business Media.
- [74] Mott, R. L. (2006). *Mecánica de fluidos*. (6ª ed.). México: Pearson Educación.

- [75] Kopp, M. U., Crabtree, H. J. y Manz, A. (1997). Developments in technology and applications of microsystems. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1, 410-419.
- [76] Schult, K., Katerkamp, A., Trau, D., Grawe, F., Cammann, K. y Meusel, M. (1999). Disposable Optical Sensor Chip for Medical Diagnostics: New Ways in Bioanalysis. *Anal. Chem.*, 71, 5430-5435.
- [77] Terry, S. C. (1975). A Gas Chromatography System Fabricated on a Silicon Wafer Using Integrated Circuit Technology. *Stanford Elec. Lab. Technical Report*, 4603 (1), 41.
- [78] Terry, S. C., Jerman, J. H. y Angell, J. B. (1979). A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. *IEEE Trans Electron. Dev.*, 26 (12), 1880-1886.
- [79] Rios, A., Escarpa, A. y Simonet, B. (2009). *Miniaturization of Analytical Systems: Principles, Designs and Applications*. Chichester: John Wiley & Sons.
- [80] Manz, A., Graber, N. y Widmer, H. M. (2001). Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1, 244-248.
- [81] Obubuafo, A., Balamurugan S., Shadpour, H., Spivak, D, McCarley, R. L. y Soper, S. A. (2008). Poly(methyl methacrylate) microchip affinity capillary gel electrophoresis of aptamer-protein complexes for the analysis of thrombin in plasma. *Electrophoresis*, 29 (16), 3436-3445.
- [82] Qin, L, Vermesh, O., Shi, Q. y Heath, J. R. (2009). Self-powered microfluidic chips for multiplexed protein assays from whole blood. *Lab Chip*, 9 (14), 2016-2020.
- [83] Neuzil, P., Pipper, J. y Hsieh, T. M. (2006). Disposable real-time microPCR device: lab-on-a-chip at a low cost. *Mol Biosyst.*, 2 (6-7), 292-298.
- [84] Marcus, J. S., Anderson, W. F. y Quake, S. R. (2006). Parallel picoliter rt-PCR assays using microfluidics. *Anal Chem.*, 78 (3), 956-958.
- [85] Fan, H. Z., Chen, G. (2007). Fiber-packed channel bioreactor for microfluidic protein digestion. *Proteomics*, 7, 3445-3449.
- [86] Lönnberg, M. y Carlsson, J. (2006). Lab-on-a-chip technology for determination of protein isoform profiles. *Journal of Chromatography A*, 1127 (1-2), 175-182.
- [87] Lin, F. y Butcher, E. C. (2006). T cell chemotaxis in a simple microfluidic device. *Lab Chip*, 6, 1462-1469.
- [88] Frevent, C.W., Boggy, G., Keenan, T.M. y Folch, A. (2006). Measurement of cell migration in response to an evolving radial chemokine gradient triggered by a microvalve. *Lab Chip*, 6, 849-856.
- [89] Queval, A., Ghattamaneni, N.R., Perrault, C.M., Gill, R., Mirzaei, M., McKnney, R.A. y Juncker, D. (2010). Chamber and microfluidic probe for microperfusion of organotypic brain slices. *Lab Chip*, 10 (3), 326-334.
- [90] Tachikawa, K., Dittrich, P.S. y Manz, A. (2009). Microfluidic Imaging: A novel concept for pixilation of chemical and biological samples. *Sens. Act. B*, 137, 791-788.
- [91] Ríos, A., 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.

- [92] Lim, Y.C., Kouzani, A.Z. y Duan, W. (2010). Lab-on-a-chip: a component view. *Microsyst. Technol.*, 16, 1995-2015.
- [93] 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.
- [94] Verpoorte, E. y De Rooij, N.F. (2003). Microfluidics Meets MEMS. *Proceedings of the IEEE*, 91 (6), 930-953.
- [95] Shalhan, A.I., Smejkal, P., Corban, M., Guijt, R.M. y Breadmore, C. (2014). Cost-effective three-dimensional printing of visibly transparent microchips within minutes. *Anal. Chem.*, 86, 3124-3130.
- [96] Wendell, K., Tomazelli, C., Fracassi da Silva, J.A., Torres da Silva, H.D., Richter, E.M., et al. (2004). Electrophoresis microchip fabricated by a direct-printing process with end-channel amperometric detection. *Electrophoresis*, 25, 3832-3839.
- [97] Cooper McDonald, J., Chabinyk, M.L., Metallo, S.J., Anderson, J.R., Stroock, A.D. y Whitesides, G.M. (2002). Prototyping of Microfluidic Devices in Poly(dimethylsiloxane) Using Solid-Object Printing. *Anal. Chem.*, 74, 1537-1545.
- [98] Zaouk, R., Park, B.Y. y Madou, M.J. (2006). Cap. 2 Introduction to Microfabrication Techniques. En *Microfluidic Techniques : Reviews and Protocols* (pp. 5-15). Totowa, New Jersey: Human Press Inc.
- [99] Iannone E. (2015). *Labs on chip: principles, design and technology*. Roca Raton: CRC Press.
- [100] Becker, H., Locascio, L.E. (2002). Polymer microfluidic devices. *Talanta*, 56 (2), 267-287.
- [101] Xia, Y. y Whitesides, G.G. (1998). Soft Lithography. *Annu Rev. Mater. Sci*, 28, 153-184.
- [102] Bontoux, N., Dauphinot, L. y Potier, M.C. (2010). Cap. 11 Microfluidics: Basic Concepts and Microchip Fabrication. En *Unravelling Single Cell Genomics: Micro and Nanotools* (pp. 111-149). Cambridge: Royal Chemical Society.
- [103] Patrick T. (2005). *Introduction to microfluidics*. Oxford: Oxford University Press.
- [104] Ng Lee, J., Park, C. y Whitesides, G.M. (2003). Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices. *Anal. Chem.*, 75, 6544-6554.
- [105] Sandoval Ventura, O. (2015). *Evaluación de dispositivos de microfluídica para la determinación de polifenoles totales*. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- [106] MicroChem SU-8 3000 (s.f.) Recuperado de <http://www.microchem.com/pdf/SU-8%203000%20Data%20Sheet.pdf> (último acceso 20 de octubre de 2016).
- [107] Huber, L. (2010). *Validation of Analytical Methods*. Germany: Agilent Technologies.
- [108] García, Ma.A., Soberón, E., Cortés, M., Rodríguez, R., Herrera, J.L., et al. (2002). *Guía de Validación de Métodos Analíticos*. México: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.
- [109] Miller, J.N. y Miller, J.C. (2002). *Estadística y quimiometría para química analítica*. (4ª ed). Madrid: Pearson Educación.

- [110] Thorsen, T., Roberts, R. W., Arnold, F. H. y Quake, S. R. (2001). Dynamic Pattern Formation in a Vesicle-Generating Microfluidic Device. *The American Physical Society*, 18 (86), 4163-4166.
- [111] Squires, T. M. y Quake, S. R. (2005). Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Rev. Mod. Phys.*, 3 (77), 977-1026.
- [112] Woitalka, A., Kuhn, S. y Jensen, K. F. (2014). Scalability of mass transfer in liquid-liquid flow. *Chemical Engineering Science*, 116, 1-8.
- [113] Tsaoulidis, D. y Angeli, P. (2015). Effect of channel size on mass transfer during liquid-liquid plug flow in small scale extractors. *Chemical Engineering Science*, 262, 785-793.
- [114] Merino, L. (2012). *Validación III* [Archivo PDF]. Recuperado de [http://chem15.rilaa.net/docs/5\\_ValidacionIII.pdf](http://chem15.rilaa.net/docs/5_ValidacionIII.pdf) (último acceso 21 de octubre de 2016).
- [115] Cofepris CCAYAC-CR-03/0 (2014). *Criterios para la validación interna y confirmación de métodos fisicoquímicos*. México.
- [116] Godoy Caballero, Ma. Del P. (2013). *Nuevas propuestas de procedimientos analíticos sencillos para la cuantificación de compuestos fenólicos presentes en la fracción minoritaria del aceite de oliva*. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura.
- [117] Martínez Arranz, S. (2010). *Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: Metodología para su determinación e identificación*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- [118] Kyung-Hee, K., Rong, T., Raymond, Y. y Steve W. C. (2006). Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*, 95, 466-473.
- [119] Chethan, S. y Malleshi, N. G. (2007). Finger millet polyphenols: Optimization of extraction and the effect of pH on their stability. *Food Chemistry*, 105, 862-870.
- [120] Sigma-Aldrich. *2,4-Dichlorophenol* [en línea]. Recuperado de <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/105953?lang=es&region=MX> (último acceso 22 de octubre de 2016).
- [121] *Hazard assessment of 2,4-Dichlorophenol* [archivo pdf]. Recuperado de <http://www.meti.go.jp/english/report/downloadfiles/gED0307e.pdf> (último acceso 22 de octubre de 2016).