



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

DESARROLLO DE UN MICRODISPOSITIVO ANALÍTICO BASADO EN
MICROFLUÍDICA DE PAPEL PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DEL
CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
EN MUESTRAS DE VINO

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.C.B. JARED MAURICIO LÓPEZ TÉLLEZ

DRA. C. MARÍA DEL PILAR CAÑIZARES MACÍAS
FACULTAD DE QUÍMICA

Ciudad de México, Marzo 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

DESARROLLO DE UN MICRODISPOSITIVO ANALÍTICO BASADO EN
MICROFLUÍDICA DE PAPEL PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DEL
CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
EN MUESTRAS DE VINO

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.C.B. JARED MAURICIO LÓPEZ TÉLLEZ

DRA. C. MARÍA DEL PILAR CAÑIZARES MACÍAS
FACULTAD DE QUÍMICA



Ciudad de México, Marzo 2021

Jurado Asignado

Presidente

Dr. José Luz González Chávez

Vocal

Dra. María Gabriela Vargas Martínez

Vocal

Dra. Graciela Granados Guzmán

Secretario

Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez

Lugar donde se desarrolló el proyecto de investigación:

Laboratorio 228 “Métodos de Flujo Continuo” del edificio F perteneciente a la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Tutora del proyecto de investigación:



Dra. María del Pilar Cañizares Macías

Agradecimientos

Al **CONACYT** por la beca de manutención otorgada al No. CVU 957048 para la realización de los estudios de maestría.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México – UNAM** por abrirme sus puertas a través de su programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, y su Facultad de Química, que me permitieron continuar con mi desarrollo profesional y personal.

A la **Dra. María del Pilar Cañizares Macías** por confiar en mí sin conocerme, por todo el apoyo y consejos otorgados durante el desarrollo del proyecto, pero sobre todo por su invaluable tiempo dedicado a mi persona.

A la **Facultad de Química** presupuesto 5000-9029 y, la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico** (DGAPA) PAPIIT No. 200718 y IN211521 por el financiamiento del proyecto.

A **mi jurado asignado**, Dr. José Luz González, Dra. Alma Revilla, Dra. Gabriela Vargas y Dra. Graciela Granados, por los atinados comentarios y observaciones realizados a este informe.

A **mis compañeros del Laboratorio 228** por hacer más ameno este trayecto y las contribuciones hechas a este trabajo. Quiero antes que todo agradecer a Kenia Chávez y Willmann Jiménez por brindarme su amistad y soportarme.

Quiero agradecer muy especialmente a la **M.C. Lucía Hernández** y la **Q. Georgina Duarte** por el apoyo incondicional durante mi estancia en el Subprograma, por la confianza y las enseñanzas brindadas.

A **mis amigos de Monterrey**, Mariza Gutiérrez, Humberto Loa, Óscar Hidalgo y Gabriela Marín, que desde tan lejos me alentaron y apoyaron para cumplir este sueño, por creer en mí y motivarme a más.

A **mis amigos de la CDMX** porque me han mostrado otra visión del mundo, otra forma de vivir y con quienes lo he disfrutado. Especialmente a mi amigo Alberto García y mi roomie Leonardo Ronson.

Finalmente, agradezco a la **vida** el permite aprender, disfrutar y cumplir una meta más.

Dedicatoria

A *mi familia*, por el apoyo y la confianza puesta en mí.

Especialmente a mis hermanos, *Kevin*, *Belén* y *Alexa*, por todas las risas que me brindan.

INDICE

RESUMEN	i
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
3. HIPÓTESIS	4
4. OBJETIVOS	4
4.1. Objetivo general	4
4.2. Objetivos específicos.....	4
5. MATERIALES Y MÉTODOS	4
5.1. Reactivos y equipos.	4
5.2. Fabricación y caracterización de los μ PADs.....	5
5.2.1. Corte.	5
5.2.2. Grabado con cera.	5
5.2.3. Grabado con corrector de tinta.	6
5.3. Estudios preliminares.	6
5.3.1. Adquisición y análisis de las imágenes.....	6
5.3.2. Evaluación del tipo de sustrato.	6
5.3.3. Estudio de las cinéticas de reacción.....	7
5.3.4. Influencia de las concentraciones de los reactivos.	7
5.3.5. Evaluación de los sistemas de detección.	7
5.4. Acoplamiento de una zona de pretratamiento con reactivo de Carrez al μ PAD.	7
5.5. Establecimiento de las condiciones de reacción de los métodos colorimétricos.	8
5.6. Evaluación del desempeño analítico de los métodos colorimétricos.....	8
5.6.1. Intervalo lineal.....	9
5.6.2. Límites de detección y cuantificación.	9
5.6.3. Precisión.	9
5.6.4. Veracidad.....	9
5.7. Análisis de muestras reales.....	9

5.7.1. Muestras reales.	9
5.7.2. Análisis en el μ PAD.	10
5.7.3. Análisis por métodos en lote.....	10
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
6.1. Fabricación y caracterización de los μ PADs.....	10
6.2. Estudios preliminares.	13
6.2.1. Evaluación y selección del tipo de sustrato.	13
6.2.2. Cinéticas de reacción.	14
6.2.3. Influencia de las concentraciones de los reactivos.	15
6.2.4. Selección del sistema de detección colorimétrico.	16
6.3. Acoplamiento de una zona de pretratamiento con el reactivo de Carrez.....	16
6.4. Establecimiento de las condiciones de reacción de los métodos colorimétricos.	17
6.5. Evaluación del desempeño de los métodos colorimétricos.	18
7. CONCLUSIONES	21
8. PERSPECTIVAS	22
9. BIBLIOGRAFÍA	23

RESUMEN

En el presente trabajo se fabricó un microdispositivo analítico basado en microfluídica de papel para la determinación simultánea del contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante en muestras de vino mediante sensores colorimétricos basados en los métodos Folin-Ciocalteu (FC) y ABTS, respectivamente. La detección colorimétrica se llevó a cabo empleando un escáner y el software *ImageJ*, utilizando la escala azul del sistema RGB. Una zona de pretratamiento con reactivos de Carrez fue acoplada y, permitió la clarificación de las muestras y su análisis con una simple dilución 2:1 con agua destilada. Los diseños de experimentos factoriales completos a dos niveles determinaron los factores con mayor influencia en cada método, resultando en la concentración del reactivo FC para el método FC, y la concentración del reactivo ABTS y el modo de incubación para el método ABTS; las condiciones de reacción empleadas en los métodos fueron seleccionadas mediante estudios de un factor a la vez. Con las condiciones seleccionadas, 4 muestras de vino de diferentes variedades de uva, fueron analizadas. El tiempo de análisis fue de 5 min por muestras para ambos métodos, reduciendo a 5 min previos para la formación del radical catiónico en el método ABTS. La curva de calibración y las características de los métodos fueron determinadas empleando ácido gálico (ÁG) como estándar. El intervalo lineal del método FC fue de 149.71 a 1 998.91 mg EÁG L⁻¹ (0.88 a 11.75 mmol L⁻¹) y de 98.66 a 998.60 mg EÁG L⁻¹ (0.58 a 5.87 mmol L⁻¹) para el método ABTS, presentando $R^2 > 0.99$. Los LD fueron de 32.47 y 17.31 mg EÁG L⁻¹ para el método FC y ABTS, respectivamente. Para ambos métodos, los %DER para la evaluación de la repetibilidad y precisión intermedia resultaron inferiores al 14 % y los %Recuperación entre el 82 y 115 % para la evaluación de la veracidad. La determinación simultánea del contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante fue posible en el μ PAD y no presentaron diferencias significativas con los métodos en lote, siendo una alternativa de más bajo costo, sencilla y rápida. El proceso de fabricación del μ PAD por la técnica de corte resultó ser sencillo, simple, barato, preciso y eficiente para su uso en manufactura en gran escala. El costo del μ PAD fue estimado en \$1.65 pesos (MXN).

1. INTRODUCCIÓN

Los polifenoles son un grupo de compuestos exógenos que poseen varias funciones fenol, nombre popular del hidroxibenceno, unidos a estructuras alifáticas o aromáticas con familias como ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, lignanos y flavonoides, entre otros [1], [2]. Los polifenoles poseen una amplia variedad de propiedades biológicas, entre las que destaca la capacidad antioxidante, definida como la capacidad de un compuesto de suprimir, retrasar o prevenir significativamente el daño causado con el proceso oxidativo, provocado principalmente por radicales [3] que desencadenan daño celular y el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas y cáncer. Una fuente invaluable de polifenoles son los vinos, un producto obtenido a partir del procesamiento de la uva, ampliamente distribuido a nivel mundial debido a su exquisito sabor y reportados beneficios a la salud humana. La actividad biológica de los vinos es muy variada, desde actividad antiinflamatoria, antiplaquetaria, antimicrobiana y, sobre todo, antioxidante, gracias a la presencia de los polifenoles [4] y otros compuestos. Por tal motivo, es importante determinar el contenido de polifenoles presentes en los vinos, así como la capacidad antioxidante de ellos. Los métodos para determinar tanto el contenido de polifenoles totales como la capacidad antioxidante son muy variados, pero destacan el método de Folin-Ciocalteu y el método del radical catiónico del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS). El método de Folin-Ciocalteu (FC) es el más empleado para la determinación del contenido total de compuestos fenólicos en matrices alimentarias, y consiste en el uso de un reactivo, del mismo nombre, de coloración amarilla con presencia de sales de tungstato y molibdato en medio ácido [5], [6]. El mecanismo de reacción del método FC aún no se ha elucidado por completo, pero se cree que se componen de complejos de las sales de tungstato y molibdato, donde ambos poseen un número de oxidación de 6+, siendo incoloro y amarillo, respectivamente. La adición de los compuestos fenólicos a pH básico (>10) proporciona la presencia de iones fenolato, que inician la transferencia de electrones, reduciendo el reactivo FC y produciendo un cambio de coloración a azul (**Figura 1**). La intensidad del complejo color azul es medido espectrofotométricamente y es directamente proporcional a la concentración del antioxidante, y los resultados se expresan en términos de equivalentes de un estándar.

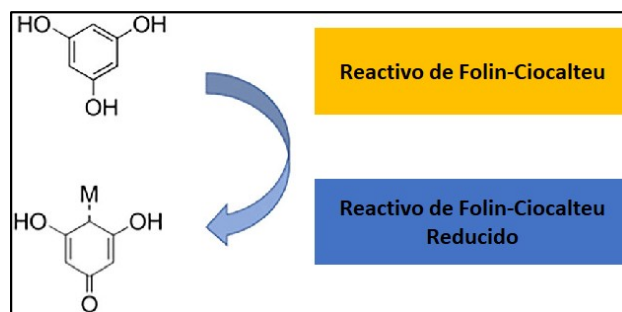


Figura 1. Mecanismo de reacción del método FC [6].

Por su parte, el método de ABTS tiene una fuerte ventaja sobre otros métodos para determinar la capacidad antioxidante, ya que permite el análisis de muestras de naturaleza tanto hidrofílica como lipofílica, gracias a las propiedades y estabilidad del radical en ambos tipos de disolventes, así como su amplio intervalo de pH de trabajo que

va de 4.5 a 7 [7], [8]. El método del ABTS fue desarrollado por Re y cols. [9] a finales de la década de los 90s y consiste en la neutralización del radical catiónico ABTS^{•+} por la transferencia de electrones por parte de una molécula (antioxidante) donadora de electrones (**Figura 2**). El radical es color verde-azulado y la intensidad del color disminuye conforme la concentración del antioxidante incrementa durante la medición espectrofotométrica.

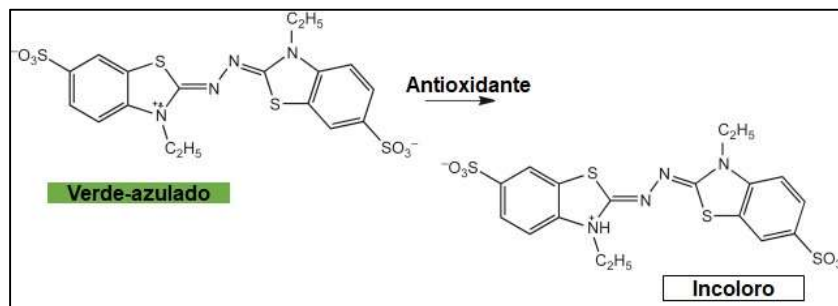


Figura 2. Mecanismo de reacción del método ABTS [10].

Aunque dichos métodos han sido desarrollados a microescala [11], el volumen de residuos generados y el consumo de los reactivos son elevados, y la implementación de estos métodos en campo o zonas de difícil acceso y poca infraestructura es limitado. En la actualidad, los investigadores en Química Analítica buscan desarrollar plataformas de análisis directos, automáticos, miniaturizados, con mínimo consumo de reactivos y muestras, y con la posibilidad de ser implementados *in situ*, sin comprometer la calidad de los resultados [12]. Por ello, la búsqueda de plataformas que permitan cumplir con los objetivos de la Química Analítica Verde y su aplicación en ensayos de actividad biológica es una necesidad. Los investigadores han encontrado en los principios de la Microfluídica una atractiva alternativa, puesto que permite procesar y manipular fluidos en cantidades muy pequeñas, utilizando microdispositivos con dimensiones de un par de centenas o miles de micrómetros [13]. Los sistemas de análisis basados en microfluídica cuentan con una amplia variedad de sustratos para que puedan ser empleados en su fabricación como vidrio, acrilato, polidimetilsiloxano (PDMS) e, incluso, papel. Este último generó la creación de nuevas plataformas conocidas como microdispositivos analíticos basados en microfluídica de papel (μ PADs, por sus siglas en inglés, Microfluidic Paper-based Analytical Devices), los cuales fueron desarrollados en el grupo de trabajo de Whitesides en 2007 en la Universidad de Harvard [14]. El papel como sustrato otorga grandes ventajas a dichas plataformas: (i) alta disponibilidad y bajo costo, (ii) el flujo capilar evita equipos extras, (iii) ha sido implementado previamente en aplicaciones analíticas cualitativas o semicuantitativas, (iv) fácil manipulación, almacenamiento y transporte, (v) biodegradable y (vi) fácil de someter a procesos de modificación de superficie. La fabricación de los μ PADs se puede llevar a cabo por procesos químicos, empleando reactivos para la formación de barreras hidrofóbicas que delimiten las zonas de trabajo y canales, o físicos, para delimitar las zonas de trabajo mediante corte o fuerzas físicas [15], [16]. La detección del analito de interés en la muestra es un paso fundamental para cualquier plataforma analítica y un reto especial cuando hablamos de μ PADs. La colorimetría es el método de detección más ampliamente utilizado gracias a que el papel ofrece grandes propiedades de brillo y contraste para percibir cambios de tonalidades e intensidades de color. Dichos cambios se pueden detectar empleando una simple cámara digital, teléfono celular o escáner, y utilizando un sistema de detección, como la escala

RGB, para realizar una correlación con la concentración de un analito, mediante el uso de software especializados [17]. Por tal motivo, el uso de μ PADs puede ser una alternativa sencilla y económica para desarrollar métodos de análisis de la actividad biológica.

2. ANTECEDENTES

Los reportes sobre la implementación de métodos para la determinación de la actividad biológica en muestras alimenticias en μ PADs son limitados y no reportan parámetros que respalden la confiabilidad de los resultados. Sirivibulkovit y cols. [18] presentaron el desarrollo de un μ PAD fabricado por laminación para la determinación de la actividad antioxidante en muestras de té por el método del radical DPPH con detección colorimétrica, utilizando una cámara digital y la escala de grises. El método empleó el reactivo DPPH 2 mmol L^{-1} ($1 \mu\text{L}$) y un tiempo de reacción de 30 min. El desempeño analítico de los μ PADs fue evaluado en términos de intervalo lineal, límite de detección (LD) y repetibilidad para 6 estándares (ácido gálico, trolox, ácido ascórbico, ácido cafeico, ácido vanílico y quercetina). Los LD calculados se obtuvieron en el orden de 37.9 a $10\,000 \mu\text{mol L}^{-1}$; sin embargo, es importante recalcar que los intervalos de trabajo se realizaron en concentraciones inferiores al LD, y los coeficientes de determinación (R^2) fueron menores a 0.99 para el ácido ascórbico y vanílico; además, para la comprobación del intervalo lineal no se empleó algún otro resultado que indique que no existen tendencias en el modelo. La repetibilidad no fue buena, ya que los valores de los porcentajes de desviación estándar relativa (%DER) obtenidos superaron el 15% , establecido por las guías [19]. La comparación con el método espectrofotométrico durante el análisis de muestras de té no presentó diferencias significativas. Por su parte, Sateanchok y cols. [20] desarrollaron un μ PAD compuesto por una zona de detección con tiras de papel y tiras de algodón para la determinación del contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante mediante los métodos FC y DPPH, respectivamente. El algodón demostró ser una alternativa útil para la fabricación de los μ PADs por el alto grado de flujo de las disoluciones. La detección se realizó con un teléfono celular con la intensidad de la escala R del sistema RGB. Las concentraciones de los reactivos FC 0.2 mol L^{-1} y DPPH fueron de 0.06 mmol L^{-1} . Los tiempos de análisis fueron de 15 y 60 min para los métodos FC y DPPH, respectivamente. En este caso, no fue evaluado ningún parámetro estadístico que pueda ser atribuible al desempeño analítico del método desarrollado. Finalmente, Puangbanlang y cols. [21] desarrollaron un μ PAD para determinar la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles empleando los métodos FC, ABTS y CUPRAC, el cual es el antecedente directo de nuestro trabajo. En este trabajo fue posible realizar el análisis en muestras reales y correlacionarlo con el método en lote. Sin embargo, el uso de condiciones de temperaturas controladas para la formación de las barreras incrementó el tiempo de fabricación de los μ PADs. Además, la dilución de las muestras se realizó en dos partes: primero, fue llevada a cabo como parte del proceso de pretratamiento de muestras, fuera del μ PAD, y, segundo, cuando se inyectaron $10 \mu\text{L}$ de muestra en el μ PAD, se adicionaron $20 \mu\text{L}$ de agua destilada para llevar la muestra a las zonas de detección. La clarificación de la muestra no se llevó a cabo, puesto que es atribuida a la capacidad del papel filtro de remover el color, sin mostrar información que pruebe dicha hipótesis. En cuanto al método ABTS, no se propicia la formación del radical catiónico previo al análisis de las muestras. Por último, el ajuste del modelo de la curva de calibración sólo fue evaluado con el valor de R^2 , pero no existe certeza de que el modelo no presente tendencias, y su construcción comprende el LD como nivel más bajo. Por su

parte, la repetibilidad fue evaluada mediante la medición de 10 réplicas de los estándares y los resultados obtenidos fueron adecuados (%DER < 9.4 %). Es evidente la necesidad de desarrollar μ PADs con un estudio más profundo de desempeño analítico que ayuden a asegurar la confiabilidad de los resultados. Además, en todos los casos, los procesos de pretratamiento de muestras, como diluciones y clarificaciones exhaustivas, incrementaron el tiempo de análisis.

3. HIPÓTESIS

Los microdispositivos analíticos basados en microfluídica de papel son una alternativa confiable a los métodos espectrofotométricos para la realización de ensayos colorimétricos en análisis de alimentos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Desarrollar un microdispositivo analítico basado en microfluídica de papel para la determinación simultánea del contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante, que permita un análisis en campo y de bajo costo de estos parámetros, en muestras de vino.

4.2. Objetivos específicos

- Seleccionar un proceso de fabricación de μ PADs, comparando las técnicas de corte y grabado.
- Caracterizar las dimensiones y capacidades volumétricas de los μ PADs fabricados.
- Evaluar y seleccionar el tipo de papel empleado como sustrato para la fabricación de los μ PADs.
- Acoplar una zona de pretratamiento de muestra con el reactivo de Carrez al μ PAD.
- Optimizar las condiciones de reacción de los métodos Folin-Ciocalteu y ABTS en el μ PAD.
- Evaluar el desempeño analítico de los métodos Folin-Ciocalteu y ABTS en el μ PAD.
- Determinar el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de muestras reales de vino en el μ PAD.
- Comparar los resultados obtenidos en el análisis de muestras entre el μ PAD y los métodos en lote.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos y equipos.

El papel cromatográfico 1 CHR y el papel de filtración Grado 1 fueron adquiridos en Whatman (EUA). Los reactivos 3-aminopropiltrióxosilano (APTES), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox), ácido gálico, fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4), hexacianoferrato de potasio II ($\text{C}_6\text{FeK}_4\text{N}_6$), poli(etilenglicol) (PEG, 2 050) y vainillina fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (EUA). Los reactivos acetato de zinc dihidratado ($\text{ZnC}_4\text{H}_6\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), carbonato de sodio (Na_2CO_3) y persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) fueron adquiridos en J.T. Baker (EUA). El reactivo hidróxido de sodio (NaOH) fue adquirido en Fermont. El ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) y el reactivo de Folin-Ciocalteu (FC) fueron adquiridos en Merck (EUA).

El reactivo tartrato de sodio fue adquirido en Analit (EUA). La fabricación de los μ PADs se realizó en el plotter CAMEO 3 de Silhouette America Inc. (E.U.A.). La caracterización de los μ PADs se realizó empleando un microscopio portátil digital 1.3M de Mighty-Scope (EUA). La adquisición de las imágenes se realizó en un escáner EPSON (EUA). Los métodos en lote se realizaron en un espectrofotómetro UV-Visible Modelo Cary (EUA).

5.2. Fabricación y caracterización de los μ PADs.

Las configuraciones propuestas (**Figura 3**) para el desarrollo experimental fueron nombradas con las iniciales JLT y números consecutivos del 01 al 03; el JLT01 fue empleado para la determinación de la velocidad del flujo y, JLT02 y JLT03 fueron utilizados en el desarrollo de los métodos colorimétricos. La fabricación de los μ PADs se realizó mediante 3 procesos empleando las técnicas de corte y grabado, con cera y corrector de tinta. La comparación de los procesos se llevó a cabo mediante el estudio de parámetros de producción y desempeño, empleando una configuración simple que consistió en un círculo con diámetro de 5 mm.

5.2.1. Corte.

La configuración fue realizada en el software STUDIO 4.3.431 y recortados utilizando un plotter sobre una plantilla. Después de eso, se recortó un pedazo de cartulina de 20 x 20 mm para ser utilizado como soporte de los μ PADs. Los μ PADs fueron retirados de la plantilla y colocados encima del soporte utilizando cinta adhesiva doble cara. Finalmente, los μ PADs fueron almacenados a temperatura ambiente y libre de humedad hasta su uso.

5.2.2. Grabado con cera.

La configuración fue generada en el software Microsoft PowerPoint, impresos y recortados manualmente. Las barreras hidrofóbicas fueron remarcadas durante aproximadamente 1 min empleando un lápiz de cera. Después de esto, los μ PADs fueron colocados sobre un portaobjetos y sometidos a calentamiento en horno por 5, 10 y 15 min a 120, 130, 140 y 150 °C para permitir la difusión de la cera en el papel. Finalmente, los μ PADs fueron retirados del horno y se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 5 min. Los μ PADs fueron almacenados en oscuridad a temperatura ambiente hasta su uso.

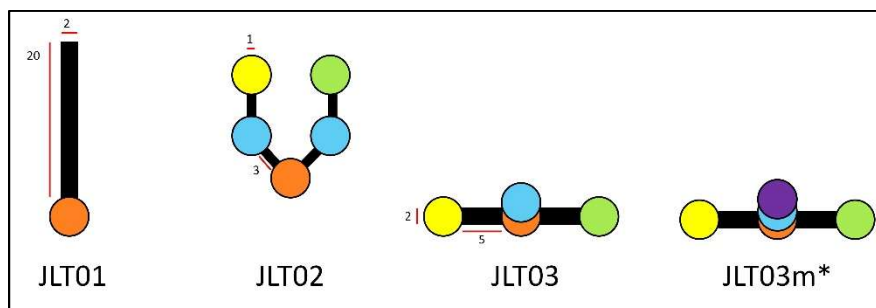


Figura 3. Configuraciones propuestas para la fabricación de los μ PADs. Las dimensiones se expresaron en milímetros (mm). Los diámetros de las zonas de trabajo fueron de 5 mm en todos los casos. Los círculos naranjas corresponden a las zonas de inyección, los amarillos y verdes a las zonas de detección de los métodos FC y ABTS, respectivamente, y los azules a las zonas de pretratamiento. *El diseño JLT03m es una configuración modificada del original, donde la zona de pretratamiento se separó colocando un círculo morado con el reactivo de Carrez I y un círculo azul con el reactivo de Carrez II.

5.2.3. Grabado con corrector de tinta.

La configuración se realizó en Microsoft PowerPoint, impresos y recortados manualmente. Las barreras fueron remarcadas utilizando un corrector de tinta durante aproximadamente 1 min. Después de esto, los μ PADs fueron colocados sobre un portaobjetos e introducidos en un congelador durante 10 min a 0 °C para permitir la difusión del corrector en el papel. Por último, los μ PADs fueron retirados del congelador y almacenados en oscuridad a temperatura ambiente hasta su uso.

La caracterización se realizó mediante la medición de las dimensiones de las zonas de trabajo y los canales, utilizando microscopía óptica digital y el software *ImageJ*. El valor medio y la desviación estándar de 20 repeticiones fueron reportados. La capacidad del volumen de las zonas de trabajo y de las configuraciones fue determinado empleando disoluciones acuosas de colorante vegetal.

5.3. Estudios preliminares.

5.3.1. Adquisición y análisis de las imágenes.

Los μ PADs fueron colocados en un escáner y las imágenes fueron adquiridas en formato *.jpg*. En seguida, se ajustó el brillo y contraste en -70 y 100 unidades, respectivamente, mediante el software *Adobe Photoshop*. La imagen ajustada se analizó mediante el software *ImageJ* aplicando zoom del 75 % y las zonas de detección fueron delimitadas en un círculo de 40 x 40 unidades (altura x anchura). Se eliminó la sección no delimitada y, posteriormente, se invirtió el color. Por último, se seleccionó la escala correspondiente para realizar la medición. La **Figura 4** muestra un diagrama para la adquisición y análisis de las imágenes.

5.3.2. Evaluación del tipo de sustrato.

Los tipos de sustratos evaluados fueron el papel ICHR y Grado 1 mediante el estudio de la intensidad y uniformidad del color desarrollado por una disolución de colorante vegetal. Además, se construyó la gráfica de distancia (mm) en función de la raíz cuadrada del tiempo (s) con el protocolo reportado en la literatura [22], empleando la configuración JLT001.

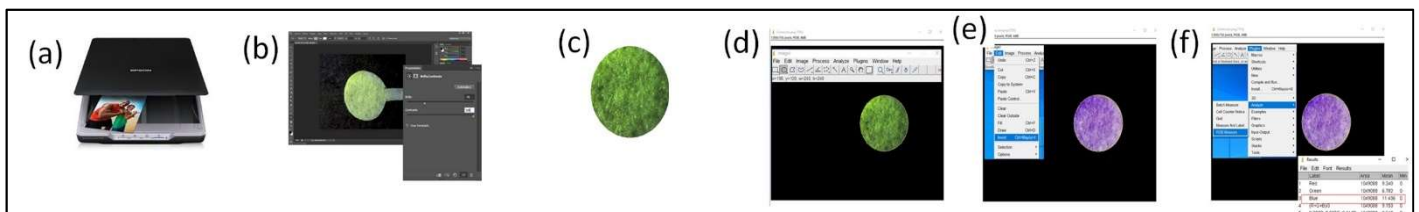


Figura 4. Adquisición y análisis de las imágenes. (a) La imagen fue tomada en el escáner. (b) Se ajusta la imagen en el software Photoshop. (c) Imagen ajustada en brillo y contraste. (d) Se delimita la zona de detección y se elimina el resto de la imagen. (e) La imagen es invertida. (f) Selección de la escala de análisis.

5.3.3. Estudio de las cinéticas de reacción.

Las cinéticas para las reacciones involucradas en los métodos colorimétricos se llevaron a cabo mediante la medición de la intensidad del color, en la escala azul, durante 60 min cada 5 min por triplicado. Las condiciones de reacción empleadas para el método ABTS fueron: ABTS 70 mmol L⁻¹ y K₂S₂O₈ 40 mmol L⁻¹, mientras que para el método FC se emplearon el reactivo FC 2 mol L⁻¹ y Na₂CO₃ 20 % (m/v); además, se evaluaron los estándares trolox, ácido gálico y vainillina para seleccionar el antioxidante a emplear durante el desarrollo experimental.

5.3.4. Influencia de las concentraciones de los reactivos.

La concentración del reactivo ABTS fue evaluada en un intervalo de concentraciones de 7 a 120 mmol L⁻¹ y la concentración del reactivo K₂S₂O₈ fue evaluada en un intervalo de concentraciones de 10 a 40 mmol L⁻¹ mediante el desarrollo de la reacción de formación del radical ABTS^{•+}, se realizaron mediciones de la intensidad del color de todas las combinaciones posibles, por triplicado, empleando la escala azul. La concentración del reactivo FC fue evaluada en un intervalo de concentraciones de 0.5 a 2 mol L⁻¹ mediante el desarrollo de la reacción con el estándar, se realizaron mediciones de la intensidad del color en todo el intervalo, por triplicado.

5.3.5. Evaluación de los sistemas de detección.

La escala de grises, el sistema RGB y cada componente, y el sistema CIE L*a*b* fueron evaluados mediante un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados de la intensidad del color desarrollado en función de la concentración de ácido gálico en un intervalo de 1 a 5 mmol L⁻¹. La pendiente (m), el coeficiente de determinación (R²) y el porcentaje de desviación estándar relativa (%DER) de cada nivel de concentración fueron calculados y utilizados para la selección del sistema.

5.4. Acoplamiento de una zona de pretratamiento con reactivo de Carrez al μ PAD.

Las configuraciones JLT02 y JLT03 (**Figura 3**) fueron evaluadas para el acoplamiento de la zona de detección con el reactivo de Carrez. El reactivo de Carrez fue utilizado para el pretratamiento de las muestras en el μ PAD, preparado bajo las condiciones antes empleadas en el grupo de trabajo [23]. Brevemente, se preparó el reactivo de Carrez I pesando 24 g de ZnC₄H₆O₄·2H₂O, agregando 3 mL de ácido acético y aforando a 50 mL con agua destilada; después de eso, se preparó el reactivo de Carrez II pesando C₆FeK₄N₆ y aforando a 100 mL con agua destilada. En la configuración JLT02, la zona de pretratamiento (círculos azules) se diseñó en línea dentro del μ PAD, posterior a la zona de inyección, y sólo se añadió el reactivo de Carrez I (1 μ L) y el reactivo de Carrez II (1 μ L), dejando secar entre cada adición. En la configuración JLT03, la zona de pretratamiento fue construida, aparte del μ PAD, con un círculo recortado de 5 mm de diámetro, el cual fue impregnado con el reactivo de Carrez I (1 μ L) y reactivo de Carrez II (1 μ L), dejando secar entre cada adición; en seguida, se fijó al μ PAD utilizando cinta adhesiva (círculo azul en la figura 3). Las muestras de vinos fueron colocadas en las zonas de inyección para reaccionar en las zonas de detección.

5.5. Establecimiento de las condiciones de reacción de los métodos colorimétricos.

Los diseños de experimentos y el tratamiento de los datos se realizaron con el software Statgraphics Centurion XVI.I (Statpoint Inc.). La selección de los factores con mayor influencia en el método FC se realizó con un diseño factorial completo 2^2 , sin bloques, aleatorizado y con una réplica. La selección de los factores con mayor influencia en el método ABTS se realizó con un diseño factorial completo 2^4 , sin bloques, aleatorizado y con una réplica. Ocho experimentos fueron conducidos para el método FC y 32 para el método ABTS. La variable de respuesta para ambos métodos fue diferencia de intensidad (Δi) calculada a partir de la Fórmula 1:

$$\Delta i = i_B - i_A \quad (1)$$

Donde A representa la intensidad en la escala azul (B) del sistema RGB, obtenida por el blanco y B representa la intensidad en escala azul obtenida en presencia del antioxidante (estándar o muestra). Los factores involucrados en la optimización de los métodos colorimétricos son resumidos en la **Tabla 1**. Las concentraciones de los reactivos evaluadas se eligieron a partir de los ensayos previos basados en experimentos de una variable a la vez; por su parte, los valores de pH se seleccionaron realizando una revisión bibliográfica. El pH en el método FC fue evaluado empleando una disolución amortiguadora de carbonatos (0.75 mol L^{-1} , pH 10.6) y una disolución de NaOH (0.5 mol L^{-1} , pH 13.6); mientras que para el método ABTS se utilizaron una disolución amortiguadora de acetatos (0.1 mol L^{-1} , pH 4.5) y una disolución amortiguadora de fosfatos (0.05 mol L^{-1} , pH 7). Todos los experimentos se realizaron empleando una disolución estándar de ácido gálico 2.93 mmol/L y la configuración JLT03. El análisis de residuales permitió conocer la validez de los modelos, mientras que los diagramas de Pareto y superficie de respuesta estimada fueron utilizados para simplificar el análisis del efecto causado por cada factor sobre la respuesta del sistema analítico.

Tabla 1. Valores empleados en los diseños de experimentos para el establecimiento de las condiciones de reacción de los métodos colorimétricos.

MÉTODO FOLIN-CIOCALTEU			MÉTODO ABTS		
	Nivel			Nivel	
Factor	-	+	Factor	-	+
Reactivo FC (mol/L)	1.25	2	Reactivo ABTS (mmol/L)	70	90
pH	10.6	13.6	Reactivo $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (mmol/L)	36	40
			pH	4.5	7.0
			Incubación	Oscuridad	Luz

5.6. Evaluación del desempeño analítico de los métodos colorimétricos.

Los parámetros evaluados fueron el intervalo lineal, límites de detección (LD) y cuantificación (LC), precisión (repetibilidad y precisión intermedia) y veracidad (recuperación), bajo las recomendaciones de la Guía para la Adecuación de Métodos Analíticos de la EURACHEM [24] y Guía para la Validación Interna de Métodos Fisicoquímicos de COFEPRIS [25]. Para la evaluación se preparó una disolución madre de ácido gálico $9\ 999.65 \text{ mg L}^{-1}$ ($58.78 \text{ mmol L}^{-1}$) en una mezcla agua-metanol (20:80 v/v); a partir de ella, se prepararon las disoluciones de trabajo en

un intervalo de 98.66 a 1 998.91 mg L⁻¹ (0.58 a 11.75 mmol L⁻¹) en agua destilada y analizadas bajo el método establecido. El software Statgraphics Centurion XVI.I y Microsoft Excel 2016 fueron utilizados para el tratamiento de los datos.

5.6.1. Intervalo lineal.

Las curvas de calibración por estándar externo fueron construidas en un intervalo de 149.71 a 1 998.91 mg L⁻¹ (0.88 a 11.75 mmol L⁻¹) para el método FC y 98.66 a 998.60 mg L⁻¹ (0.58 a 5.87 mmol L⁻¹) para el método ABTS, por triplicado, durante 5 días mediante un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados. Se realizó la inspección visual de la curva de calibración, así como la estimación de la ecuación de la recta, el R² y el análisis de residuales del modelo.

5.6.2. Límites de detección y cuantificación.

El LD se determinó mediante 3 veces la desviación estándar estimada (S'_0) y el LC mediante 10 veces la S'_0 , obtenidas de la medición de 10 blancos, para lo cual se utilizó la **Fórmula 2**:

$$S'_0 = \frac{S_0}{\sqrt{n}} \quad (2)$$

Donde S_0 es la desviación estándar de las repeticiones y n es el número de repeticiones de los blancos.

5.6.3. Precisión.

La precisión de los métodos se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia, para lo cual se prepararon disoluciones de muestras de vino (4 % v/v) adicionadas con estándar de ácido gálico 149.71, 998.60 y 1 998.91 mg L⁻¹ para el método FC, y 98.66, 248.37 y 998.60 mg L⁻¹ para el método ABTS, por triplicado, durante 5 días. A partir de una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de un factor, se determinaron los %DER de la repetibilidad y precisión intermedia.

5.6.4. Veracidad.

La veracidad de los métodos se evaluó calculando los porcentajes de recuperación de disoluciones de muestras de vino (4 % v/v) adicionadas con estándar de ácido gálico 149.71, 998.60 y 1 998.91 mg L⁻¹ para el método FC, y 98.66, 248.37 y 998.60 mg L⁻¹ para el método ABTS, por triplicado, durante 5 días, aplicando la **Fórmula 3**:

$$\%Recuperación = \frac{C_f}{C_a} \times 100 \quad (3)$$

Donde C_f es la concentración recuperada y C_a es la concentración adicionada. La C_f fue calculada a partir de la ecuación de regresión de la curva de calibración.

5.7. Análisis de muestras reales.

5.7.1. Muestras reales.

Cuatro muestras de vino tinto, producidas por diferentes variedades de uva, fueron adquiridas en centros comerciales de la Ciudad de México, con un grado de alcohol entre 13 y 15 %, y contenidas en botellas de vidrio opacas con una capacidad entre 250 y 1000 mL. Las muestras fueron almacenadas en refrigeración (4 °C) hasta su análisis. Una vez atemperadas, todas las muestras fueron diluidas adecuadamente en agua destilada.

5.7.2. Análisis en el μ PAD.

El análisis de las muestras de vino se realizó empleando la configuración JLT03m, con el acoplamiento de una zona de pretratamiento con reactivo de Carrez, previa a las zonas de detección para los métodos FC y ABTS. Primeramente, las zonas de detección fueron impregnadas con agente silanizante (1 μ L, 5 % v/v), permitiendo secar completamente, antes de la adición de los reactivos de los métodos colorimétricos. En seguida, en la zona amarilla, se agregaron el reactivo FC (1 μ L, 2 mol L⁻¹) y la disolución amortiguadora de carbonatos (1 μ L, 0.1 mol L⁻¹ pH 6), permitiendo secar completamente entre cada adición. Por su parte, en la zona verde, se agregaron el reactivo ABTS (1 μ L, 90 mmol L⁻¹) y reactivo K₂S₂O₈ (1 μ L, 36 mmol L⁻¹), permitiendo secar completamente entre cada adición. Los reactivos del método ABTS se dejaron reaccionar durante 5 min para maximizar la formación del radical catiónico. Una vez formado el radical y acoplada la zona de pretratamiento (círculos en azul y morado en la **Figura 3**), el μ PAD estaba listo para usarse. Diez microlitros de muestra fueron añadidos en la zona de pretratamiento y se permitieron fluir hasta las zonas de detección, donde las zonas fueron impregnadas completamente con las muestras; se dejaron transcurrir 5 min para realizar la medición de la formación del color azul en el método FC, y la decoloración del verde-azulado en el método ABTS. El agua destilada fue empleada como blanco. Los resultados fueron expresados en mg Equivalentes de Ácido Gálico por litro de muestra (mgEAG L⁻¹). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

5.7.3. Análisis por métodos en lote.

Los métodos en lote empleados fueron los reportados por Paixao y cols. [26]. Brevemente, para el método FC 1 mL de muestra o estándar de ácido gálico fueron mezclados con 0.025 mL de reactivo FC (2 mol L⁻¹) y 0.25 mL de una disolución de carbonatos-tartratos; se dejaron reposar por 30 min y las mediciones se hicieron a 700 nm. Para el método ABTS se formó el radical mezclando el reactivo ABTS (2 mmol L⁻¹) y K₂S₂O₈ (70 mmol L⁻¹) en disolución amortiguadora de fosfatos (0.05 mol L⁻¹ pH 7) y se dejó reposar la reacción entre 12-16 h a temperatura ambiente en oscuridad; después, se ajustó la absorbancia de la disolución a 0.800 a 734 nm, y se mezclaron 12 μ L de muestras o estándares con 3 mL de radical catiónico, dejando reposar por 20 min y las mediciones se realizaron a 734 nm. Tanto el contenido de polifenoles totales como la capacidad antioxidante fueron expresados como mg EAG L⁻¹.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Fabricación y caracterización de los μ PADs.

Tres procesos basados en técnicas de corte y grabado fueron evaluados para establecer el procedimiento de fabricación de los μ PADs (**Tabla 2**). La comparación de los procesos de fabricación se realizó mediante la evaluación de parámetros de producción (simplicidad, tiempo, eficiencia, costo y equipamiento) y de desempeño (precisión y compatibilidad química).

Tabla 2. Comparación de los parámetros de producción y desempeño de las técnicas de fabricación de μ PADs.

Parámetro	Corte	Grabado con cera	Grabado con corrector
Simplicidad	++++	+	+++
Tiempo	++	+++++	++++
Eficiencia	45 μ PAD/h	10 μ PAD/h	18 μ PAD/h
Costo*	\$1.65	\$1.50	\$1.45
Equipamiento	++++	++	++
Precisión	+++++	++	++
Compatibilidad química	+++++	+	+++

+: Muy bajo, ++: Bajo; +++: Medio; ++++: Alto; +++++: Muy alto. *Costo en pesos mexicanos.

El proceso de corte involucró solamente tres pasos (diseño de la configuración, corte del μ PAD y soporte del mismo); en cambio los procesos de grabado requirieron el diseño de la configuración, corte del μ PAD, delimitación de las barreras, formación de las barreras a condiciones de temperatura controlada y soporte. Claramente, los procesos de grabado estuvieron compuestos de una mayor cantidad de pasos donde el analista intervino activamente y el tiempo de fabricación fue mayor, así como una disminución en la eficiencia terminal debido a la fabricación de un menor número de μ PADs por h. La intervención activa del analista, sobre todo en la delimitación de las barreras, provocó que las zonas de trabajo en el proceso de corte (**Figura 5a**) fueran más precisas que en los procesos de grabado con cera (**Figura 5b**) y corrector (**Figura 5c**). Los %DER fueron calculados durante la medición del diámetro de las zonas de trabajo, obteniéndose 3.4, 8.0 y 12.6 % para los procesos de corte, grabado con cera y grabado con corrector, respectivamente. El costo final de los μ PADs por las técnicas fue similar; sin embargo, la inversión inicial para el proceso de corte fue alta por la adquisición del plotter.

La compatibilidad química de los μ PADs fue evaluada, en primer lugar, con disoluciones acuosas de colorante. Los μ PADs fabricados con el proceso de corte lograron retener la disolución (**Figura 5d**), los fabricados por el proceso de grabado con cera no retuvieron las disoluciones (**Figura 5e**) y los fabricados por el proceso de grabado con corrector retuvieron exitosamente las disoluciones (**Figura 5f**). En seguida, se descartó el proceso de grabado con cera y los μ PADs de proceso de corte (**Figura 5g**) y grabado con corrector (**Figura 5h**) fueron sometidos a mezclas de agua-etanol en diferentes proporciones. Los μ PADs fabricados por el proceso de grabado con corrector no retuvieron mezclas con etanol iguales o superiores al 50 % (v/v), tal como lo reporta Mani y cols [27]. Finalmente, se seleccionó el procedimiento de corte un equipo plotter con navaja por resultar un proceso de manufactura a gran escala, sencillo, rápido, automático, preciso, altamente eficiente y de bajo costo, tal como es indicado en reportes anteriores [28], [29]. La **Figura 5i** muestra un μ PAD fabricado por el proceso de corte montado en el soporte.

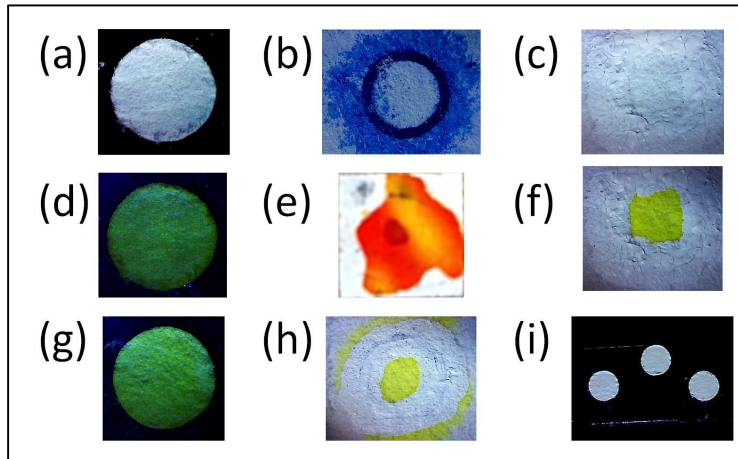


Figura 5. Comparación de las técnicas de corte y grabado para la fabricación de los μ PADs. (a) Técnica de corte. (b) Técnica de grabado con cera. (c) Técnica de grabado con corrector. (d) Disolución acuosa de colorante en la técnica de corte. (e) Disolución acuosa de colorante en la técnica de grabado con cera (vista inferior). (f) Disolución acuosa de colorante en la técnica de grabado con corrector. (g) Mezcla con etanol (50 % v/v) en técnica de corte. (h) Mezcla con etanol (50 % v/v) en técnica de grabado con corrector. (i) μ PADs fabricados con la técnica de corte montados en soporte.

Las configuraciones fueron diseñadas contemplando la necesidad de una zona de inyección de muestras y estándares (círculos naranjas), una zona para la detección del método FC (círculos amarillos), una zona para la detección del método ABTS (círculos verdes) y una zona de pretratamiento (círculos azules), tal como se observa en la **Figura 3**. El menor volumen que pudo ser inyectado con pipeta volumétrica del laboratorio con el que contamos fue de 1 μ L; los diámetros iguales o menores a 4 mm difundieron las disoluciones más allá de la zona de trabajo llegando hasta los canales, por lo que fue seleccionado un diámetro de 5 mm como medida estándar de las zonas de trabajo. La anchura de los canales fue determinada utilizando 1 y 2 mm como medida; con ambas medidas fue posible construir eficientemente los μ PADs. La longitud fue determinada utilizando de 2 a 7 mm como medidas. Con el equipo utilizado no fue posible cortar canales de 2 mm de largo, y canales superiores a 5 mm de longitud requerían volúmenes que superaban los 10 μ L, por lo que con la finalidad de utilizar la menor cantidad de volumen se decidió emplear longitudes entre 3 y 5 mm. Después, las dimensiones de las zonas de trabajo y canales en las configuraciones fueron determinadas (**Tabla 3**) por microscopía óptica digital. Como puede apreciarse, la variación en las dimensiones tanto de las zonas de trabajo como de los canales de cada configuración fue baja; la **Figura 6** muestra un acercamiento a un μ PAD y es visible la precisión del corte. Finalmente, la capacidad total de volumen por cada configuración fue determinada mediante el método descrito por Dungchai y cols [30], donde diferentes volúmenes de disoluciones de colorante fueron inyectados; el volumen seleccionado fue aquel donde el μ PAD fuera totalmente coloreado.

Tabla 3. Caracterización de las configuraciones propuestas para la fabricación de los μ PADs durante el desarrollo experimental. (n = 20)

Configuración	Zona de trabajo (mm)	Anchura (mm)	Longitud (mm)	Capacidad total (μ L)
JLT01	5.00 \pm 0.02	2.03 \pm 0.05	20.06 \pm 0.04	20
JLT02	5.02 \pm 0.05	1.03 \pm 0.04	3.05 \pm 0.02	20
JLT03	5.03 \pm 0.05	2.04 \pm 0.03	5.01 \pm 0.05	15

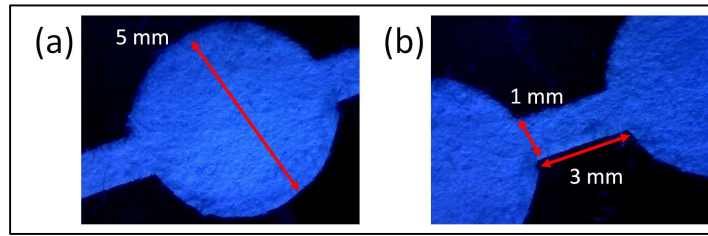


Figura 6. Microscopía óptica digital de las zonas de trabajo y canales de un μ PAD. (a) Acercamiento para la medición del diámetro de la zona de trabajo. (b) Acercamiento para la medición de la anchura y longitud de los canales.

6.2. Estudios preliminares.

6.2.1. Evaluación y selección del tipo de sustrato.

La intensidad y uniformidad del color influye en la sensibilidad analítica del método, por lo que es necesario la selección de un sustrato que propicie un adecuado desarrollo del color. El papel 1 CHR y Grado 1 fueron evaluados para seleccionar el sustrato utilizado en la fabricación del μ PAD. El papel 1 CHR presentó intensidades de color superiores al papel Grado 1 cuando se analizaron diferentes diluciones de un colorante vegetal (**Figura 7a**), así como la uniformidad del color. La menor resistencia al flujo y la elevada velocidad de flujo para la transferencia de las disoluciones por parte del papel 1 CHR tienen una mejor calidad en el desarrollo del color para su aplicación en los métodos colorimétricos [31].

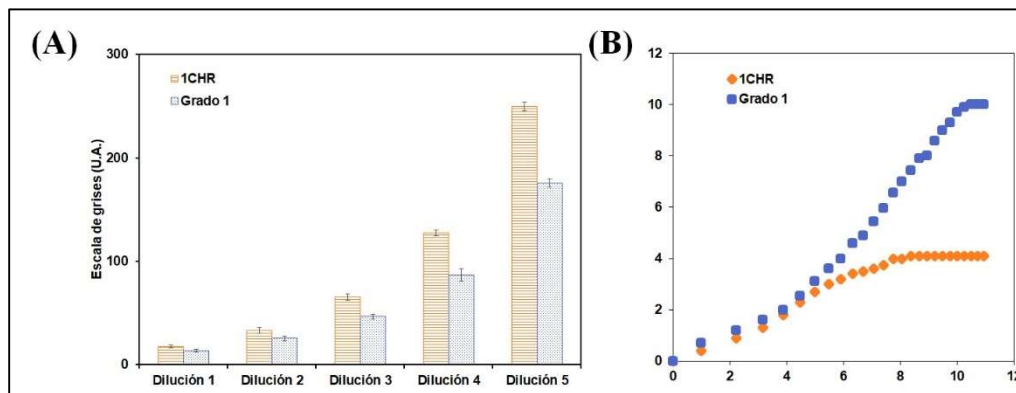


Figura 7. Comparación de los papeles 1 CHR y Grado 1. (a) Intensidades de color en los papeles ($n = 3$). (b) Gráfico para evaluar el comportamiento de las disoluciones en los diferentes tipos de papel de acuerdo con la ecuación de Washburn (Fórmula 10). ($n = 3$).

La información anterior se corroboró construyendo una gráfica de distancia (mm) en función de la raíz cuadrada del tiempo (\sqrt{t}) (**Figura 7b**), donde también se realizó el análisis para saber si modela con la ecuación de Washburn (**Fórmula 4** [32]) para superficies secas:

$$L^2 = \frac{\gamma D t}{4\mu} \quad (4)$$

Donde L (m) es la distancia recorrida por una disolución, γ (N / m) es la tensión superficial activa, t (s) es el tiempo, D (m) es la porosidad media y μ (Pa s) es la viscosidad. La ecuación de Washburn indica que la distancia recorrida por

la disolución es directamente proporcional a la raíz cuadrada del tiempo, por lo que la distancia disminuye en función del tiempo hasta formar una sigmoide cuando la disolución ya no presenta avance. Como se puede apreciar, la cantidad de disolución total agregada al sistema fluyó más rápido, debido a que en un menor tiempo se alcanzó la sigmoide de la gráfica.

6.2.2. Cinéticas de reacción.

El método FC contempla la reacción entre el reactivo FC y el antioxidante en medio básico, cambiando de color amarillo a azul, y el método ABTS comprende la formación del radical catiónico ABTS^{•+} de color verde azulado, y la reacción entre el radical catiónico y el antioxidante, disminuyendo la intensidad del color. Para el método ABTS, la intensidad del color desarrollado por el radical catiónico alcanzó su máxima intensidad a los 60 min en el papel 1 CHR. El tiempo de formación del radical catiónico fue inferior en el μ PAD que en los métodos en lote, donde la formación del radical dura hasta 16 h [9], [33], [34], debido a la inmovilización de los reactivos en el papel (**Figura 8**, rombos azules). APTES y PEG fueron utilizados para disminuir aún más el tiempo de reacción e incrementar la intensidad del color por sus reportes anteriores[21]. La intensidad máxima se alcanzó a los 5 min con ambos modificadores; sin embargo, la intensidad del color con el APTES (**Figura 8**, cuadrados naranjas) fue superior a la obtenida con PEG (**Figura 8**, triángulos verdes). El agente silanizante APTES disminuye el tiempo de reacción para la formación del radical e incrementa la intensidad y uniformidad del color debido a que los grupos sulfonatos del radical interaccionan fuertemente con los grupos amino cargados positivamente del agente silanizante a $\text{pH} < 7$, evitando de esta manera la alta movilidad del radical en el papel por la baja adsorción generada por fuerzas de repulsión electrostáticas [35]. Aunque el PEG tiene un mecanismo similar para la inmovilización de las moléculas, su elevada masa molecular, viscosidad y rigidez disminuyen la movilidad de las moléculas en comparación con APTES, lo que propició que el desarrollo del color sea menor. Por lo anterior, se seleccionó al agente silanizante APTES como modificador de sustrato para la fabricación de los μ PADs. La intensidad relativa máxima en los métodos ABTS (**Figura 9**) y FC (**Figura 9b**) en presencia de antioxidantes fue alcanzada a los 5 min y se mantuvo por 60 min ($p > 0.05$). En este caso, también se acortó el tiempo de reacción de 30 a 5 min en comparación con los métodos en lote [5], [26]. En ambos métodos, el ácido gálico y el trolox obtuvieron mayor intensidad en comparación con la vainillina, pero se seleccionó el ácido gálico como estándar debido a que presentó intensidades elevadas, pero con costo más bajo que el trolox.

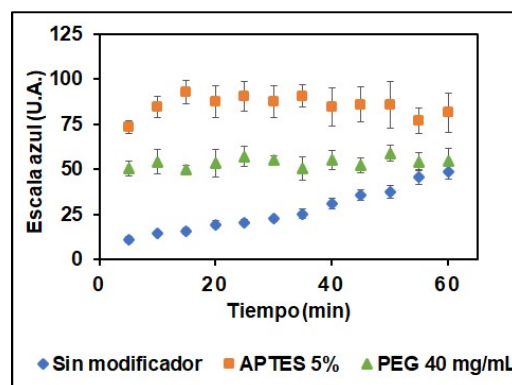


Figura 8. Cinéticas de reacción de la formación del radical catiónico ABTS en presencia y ausencia de modificadores de sustrato. (n = 3)

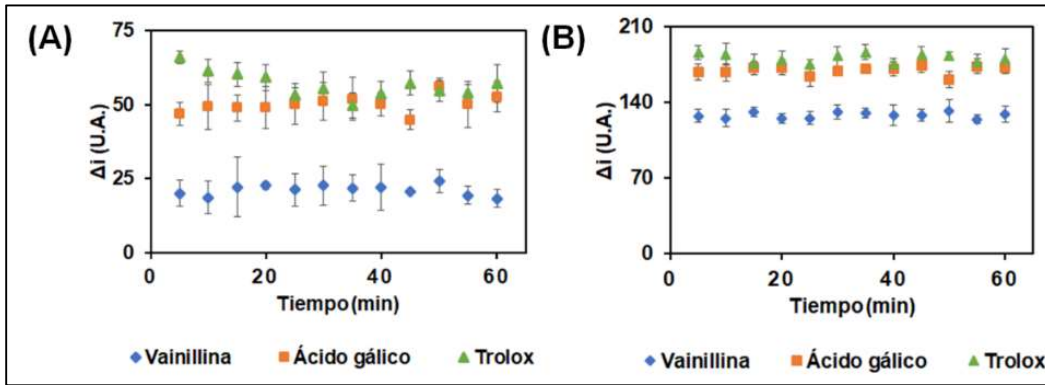


Figura 9. Cinéticas de reacción de los métodos colorimétricos. (a) Reacción del método ABTS. (b) Reacción del método FC. (n = 3)

6.2.3. Influencia de las concentraciones de los reactivos.

En el método ABTS (**Figura 10**), se observó una tendencia de aumento de la intensidad del color en función del incremento de la concentración del reactivo $K_2S_2O_8$ en concentraciones de ABTS superiores a 50 $mmol L^{-1}$. En concentraciones de ABTS inferiores a 50 $mmol L^{-1}$ se presentó la formación de un color amarillo atribuido a la oxidación del papel, que presentó interferencia generando intensidades de color superiores. Esto debido al uso del $K_2S_2O_8$ como reactivo en exceso, estequiometría ABTS-Oxidante 1:0.5 [9], el cual es un oxidante fuerte y reacciona con la celulosa del papel. Por lo anterior, se decidió emplear las combinaciones donde el reactivo ABTS fuera el reactivo en exceso. Por su parte, concentraciones de ABTS superiores a 90 $mmol L^{-1}$ desarrollan un color poco uniforme, lo que provocó una disminución en la intensidad del color.

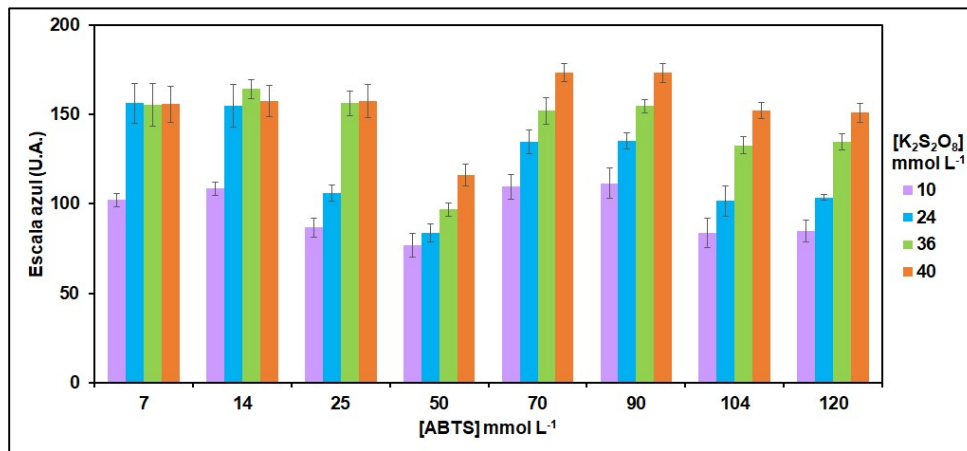


Figura 10. Influencia de las concentraciones de los reactivos en la formación del radical catiónico $ABTS^{+}$. (n = 3)

En el método FC (**Figura 11**), la concentración del reactivo FC más alta que puede ser utilizada fue 2 $mol L^{-1}$, debido a que es la forma en que es vendida, y se analizaron diluciones de ella. El uso de concentraciones inferiores a 1.25 $mol L^{-1}$ no presentó diferencia con el blanco, por lo que fueron descartadas. Las concentraciones de los reactivos ABTS 70 y 90 $mmol L^{-1}$, $K_2S_2O_8$ 36 y 40 $mmol L^{-1}$, y reactivo FC 1.25 y 2 $mol L^{-1}$ fueron seleccionadas para ser sometidas al diseño de experimentos y evaluar su interacción con otras condiciones de reacción.

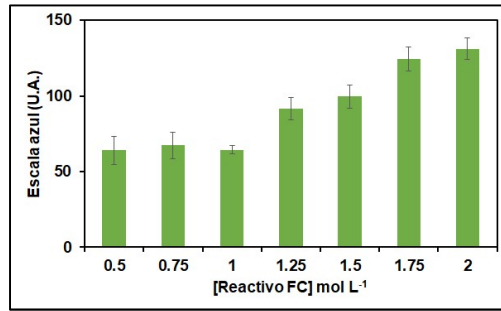


Figura 11. Influencia de la concentración del reactivo FC en el método FC. (n = 3)

6.2.4. Selección del sistema de detección colorimétrico.

El análisis de regresión lineal (**Tabla 4**) de las intensidades relativas de cada escala evaluada en función de la concentración de ácido gálico determinó que la mayor sensibilidad, dada por el valor de la pendiente, con mayor coeficiente de determinación y precisión del sistema, bajos %DER, fue la escala azul.

Tabla 4. Evaluación de los sistemas de detección colorimétricos. (n = 3)

Parámetro	Escala de grises	RGB	R	G	B	CIE $L^*a^*b^*$
m	10.326	17.143	10.244	9.9176	16.581	8.7039
R ²	0.9878	0.978	0.9724	0.9866	0.9936	0.9462
%DER	19.60	15.40	36.02	19.75	9.16	12.73

6.3. Acoplamiento de una zona de pretratamiento con el reactivo de Carrez.

El análisis de vinos requiere la clarificación de las muestras para evitar la interferencia de compuestos coloridos en la detección colorimétrica. El reactivo de Carrez sirve para precipitar proteínas, eliminar turbidez, destruir emulsiones y clarificar muestras, mediante la formación de precipitados poco solubles de $Zn_2[Fe(CN)_6]$, con los cuales las sustancias de alta masa molar se adsorben [36]. Los reactivos Carrez I y II fueron añadidos en la zona de pretratamiento de la configuración JLT02 (**Figura 3**, azul), dejando secar entre cada adición; por otra parte, un círculo de 5 mm de diámetro fue impregnado con ambos reactivos, dejado secar, y fijado en la zona de inyección de la configuración JLT03. En ambas configuraciones se observó la presencia de un color negro intenso en la zona de detección del método FC (**Figura 12a**). Además, el tiempo que tardó la muestra para llegar a las zonas de detección en la configuración JLT03 incrementó por la resistencia al flujo que oponen los precipitados. Después de eso, se planteó la posibilidad de acoplar dos zonas de pretratamiento a la zona de inyección del μ PAD de configuración JLT03m (**Figura 3**), donde el círculo más externo estaba impregnado con el reactivo de Carrez I y el círculo interno (azul) con el reactivo de Carrez II. En dicha estrategia, las muestras lograron ser clarificadas y no se presentaron interferencias (**Figura 12c**), y el tiempo en que las muestras llegaron a las zonas de detección fue de aproximadamente 60 s, por lo que se seleccionó para el desarrollo del μ PAD. Una dilución 2:1 agua destilada-muestra logró ser clarificada por la zona de pretratamiento acoplada en comparación con la muestra sin diluir (**Figura 12d**). Finalmente, se realizó la comparación de la intensidad de la señal del blanco en la configuración sin la zona de pretratamiento y con la zona de pretratamiento acoplada, y los resultados no presentaron

diferencias significativas; por lo anterior, los reactivos de Carrez no interfirieron con el desarrollo del color en las zonas de detección.



Figura 12. Acoplamiento de la zona de pretratamiento al μ PAD. (a) Interferencia en la zona de detección del método FC en la configuración JLT03. (b) Muestra diluida 2:1. (c) Muestra no diluida.

6.4. Establecimiento de las condiciones de reacción de los métodos colorimétricos.

Los diseños factoriales realizados ayudaron a establecer las condiciones de reacción de cada método colorimétrico. Los modelos obtenidos para los métodos FC (**Ecuación 5**) y ABTS (**Ecuación 6**) fueron validados mediante el análisis de residuales en función del número de ejecución, sin encontrarse tendencias en la distribución de los datos que sean atribuibles a errores sistemáticos.

$$Y = 169.281 + 13.9104 * A \quad (5)$$

Donde A es la concentración del reactivo FC.

$$Y = 7.07 + 7.32 * A - 3.61 * B - 5.31 * C - 7.88 * D - 3.31 * AB - 6.36 * AC + 8.26 * BD + 4.99 * ABC + 5.55 * ACD - 4.72 * ABCD \quad (6)$$

Donde A es la concentración del reactivo ABTS, B es la concentración del reactivo $K_2S_2O_8$, C es el valor del pH y D es el modo de incubación, y las interacciones secundarias y terciarias se representan con la combinación de las letras.

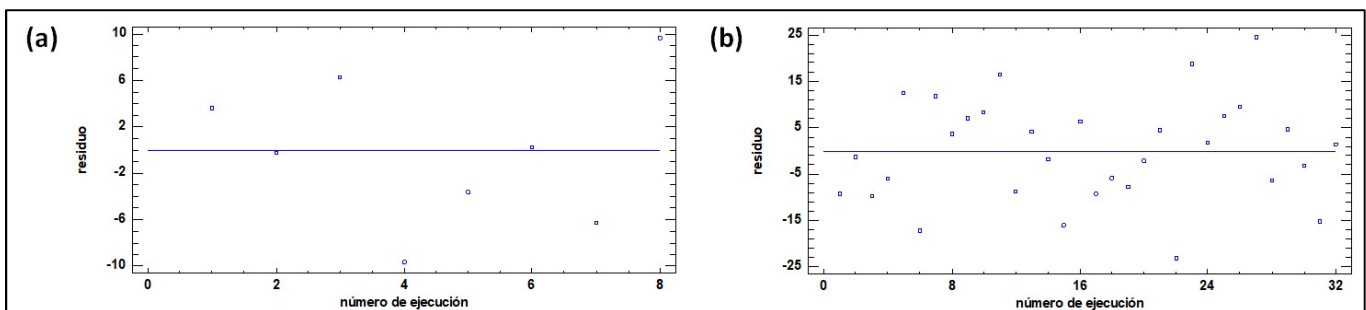


Figura 13. Análisis de residuales de los diseños factoriales. (a) Método FC. (b) Método ABTS.

Para el método FC, la concentración del reactivo FC fue el único factor que mostró influencia significativa en la prueba de ANOVA, lo cual se representa en el diagrama de Pareto estandarizado (**Figura 14a**) como la barra que sobrepasa la línea vertical al efecto, con un intervalo de confianza del 95 %. En dicho método, el pH no mostró diferencia

significativa. Por su parte, en el diagrama de Pareto estandarizado para el método ABTS (**Figura 14 b**) se observó que todos los factores presentaron influencia significativa como efectos principales en un intervalo de confianza del 95 %, así como las interacciones secundarias y terciarias . En seguida, se obtuvieron los diagramas de superficie de respuesta estimada (**Figura 15**) para determinar los valores predichos en los cuales se obtendrían las intensidades más elevadas en cada método. En el método FC, la intensidad más elevada se predijó con el nivel alto de la concentración de FC y el nivel bajo del pH, por lo que las condiciones de reacción seleccionadas fueron 2 mol L⁻¹ del reactivo FC y una disolución amortiguadora de carbonatos (0.75 mol L⁻¹, pH 10.6), éste ultimo establecido de forma arbitraria. Lo anterior se atribuye a que es necesario un medio de reacción con pH superior a 10 para propiciar la formación de los iones fenolato [37] y la reacción con las sales del reactivo FC, y la preparación de disoluciones con valores de pH superiores a 13 son difíciles de preparar, por lo que la disolución amortiguadora de carbonatos (-) fue la opción ideal. En el caso del método ABTS, todos los factores mostraron influencia significativa en el método, esto es, entre mayor fue la concentración del reactivo ABTS, menor la concentración del oxidante y el valor del pH, con incubación en oscuridad, la respuesta incrementó; sin embargo, como muestran los estudios preliminares de un factor a la vez, cuando la concentración de ABTS superó 90 mmol L⁻¹, la uniformidad e intensidad del color desarrollado disminuyó. Por tal motivo, se empleó 90 mmol L⁻¹ como concentración del reactivo ABTS. Para este trabajo, la concentración del oxidante y el valor del pH fueron establecidos en 36 mmol L⁻¹ y 4.5; el uso de condiciones de pH 4.5 en el método ABTS cuando se empleó ácido gálico como estándar ha reportado la mejora de la respuesta analítica debido a las interacciones con el resto de las variables [7].

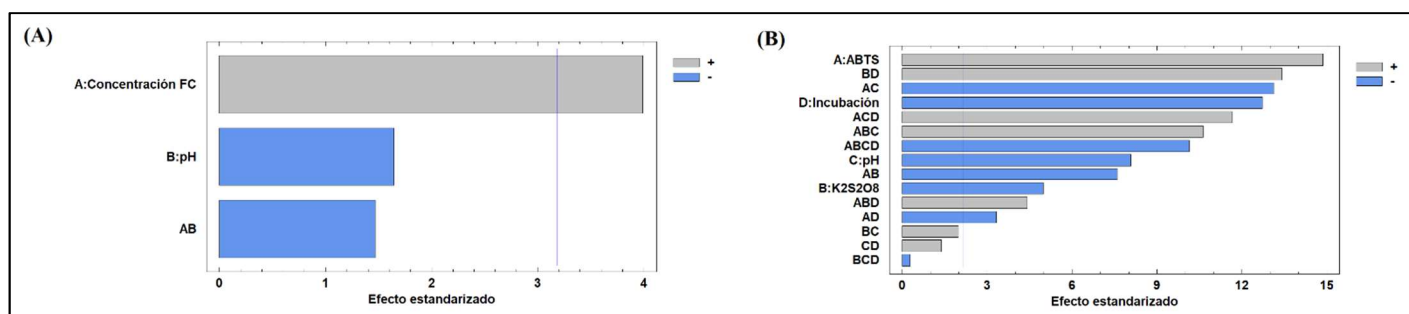


Figura 14. Diagramas de Pareto estandarizados. (a) Método FC. (b) Método ABTS.

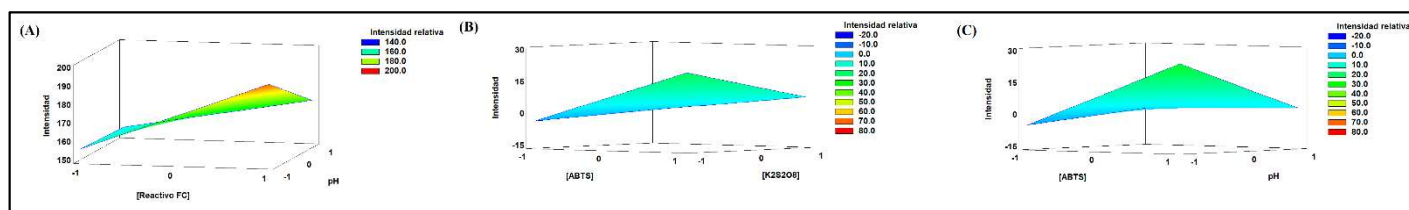


Figura 15. Superficies de respuesta estimadas. (a) Método FC. (b) Método ABTS: Influencia de la interacción ABTS-K₂S₂O₈. (c) Método ABTS: Influencia de la interacción ABTS-pH.

6.5. Evaluación del desempeño de los métodos colorimétricos.

El intervalo lineal, los LD y LC, la precisión y la veracidad del método fueron evaluados para determinar el desempeño analítico de los métodos. Los intervalos lineales de los métodos fueron utilizados para la construcción de las curvas de

calibración (**Figura 16**), por triplicado, durante 5 días, y el análisis de residuales en función de la concentración de ácido gálico (**Figura 17**) no mostraron tendencias atribuibles a errores sistemáticos. Los intervalos lineales empleados tanto en el método FC ($0.5\text{-}6\text{ mmol L}^{-1}$) como en el método ABTS ($3\text{-}13\text{ mmol L}^{-1}$) fueron cercanos a lo reportado en la literatura [21]. Los coeficientes de las rectas de regresión (**Tabla 7**) corroboran la linealidad de los datos con R^2 superiores a 0.99, y errores bajos de las ordenadas e interceptos.

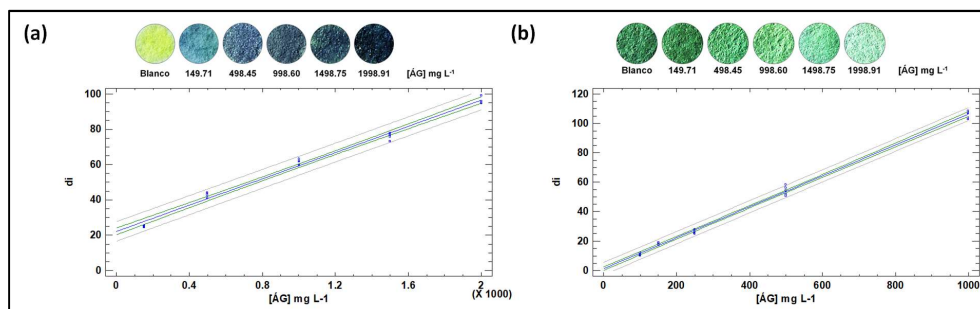


Figura 16. Curvas de calibración para los métodos colorimétricos. (a) Método ABTS. (b) Método FC.

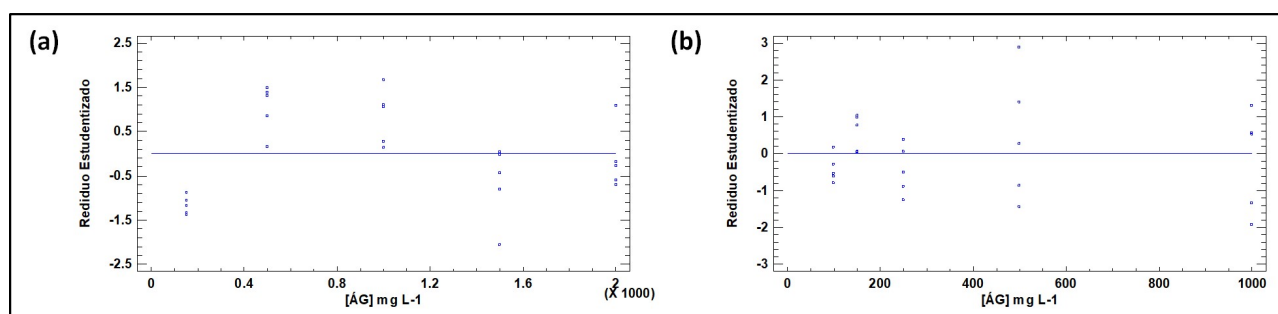


Figura 17. Análisis de residuales de las curvas de calibración. (a) Método FC. (b) Método ABTS.

Tabla 5. Coeficientes de las rectas de regresión de los métodos FC y ABTS en el μ PAD. ($n = 5$)

Método	m	Error de m	b	Error de b	R^2
FC	0.0371	0.0016	22.3783	2.0648	0.990
ABTS	0.1048	0.0026	1.4481	1.3326	0.997

Los LD resultaron inferiores a los presentados en la literatura[21] y los LC (no reportados en la literatura) resultaron cercanos al nivel bajo de la curva de calibración (**Tabla 8**). La precisión fue evaluada en términos de repetibilidad y precisión intermedia calculando los %DER a 3 niveles de concentración, por triplicado, durante 5 días (**Tabla 9**); para el método FC, los %DER 0.81-12.44 % para la repetibilidad fueron similares a los reportados en la literatura (2.3-8.6 % [21]), mientras que para la precisión intermedia resultaron entre 0.91-13.37 %. En el método ABTS, los %DER de la repetibilidad fueron cercanos a los calculados en estudios previos (1.4-4.9 % [21]), y los de la precisión intermedia fueron obtenidos entre 2.83 y 8.67 %. Las guías oficiales mexicanas indican los %DER para métodos fisicoquímicos deben ser menores al 15% [25], por lo que presenta buena repetibilidad y precisión intermedia. La veracidad fue evaluada mediante el porcentaje de recuperación a 3 niveles de concentración, por triplicado, durante 5 días (**Tabla 10**), donde la variación

encontrada más grande fue en el nivel bajo (82.27 a 114.60 %) para ambos métodos, superando el 15% indicado por las guías oficiales mexicanas, en el caso del método FC. En nuestro conocimiento, no existen reportes donde se determine la precisión intermedia y la recuperación del método FC en μ PADs. El μ PAD resultó lineal, preciso y veraz para realizar la determinación del contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante en muestras de vino.

Tabla 6. Límites de detección y cuantificación calculados para los métodos FC y ABTS en el μ PAD. (n = 10)

Método FC		Método ABTS	
LD (mg L ⁻¹)	LC (mg L ⁻¹)	LD (mg L ⁻¹)	LC (mg L ⁻¹)
32.47	135.93	17.31	81.15

Tabla 7. Porcentajes de desviación estándar relativa calculados para los métodos FC y ABTS en el μ PAD. (n = 5)

Método	Repetibilidad (%)			Precisión intermedia (%)		
	Bajo	Medio	Alto	Bajo	Medio	Alto
FC	12.44	2.54	0.81	13.47	2.65	0.91
ABTS	6.83	7.31	2.46	8.67	8.14	2.83

Tabla 8. Porcentajes de recuperación calculados para los métodos FC y ABTS en el μ PAD. (n = 5)

Método FC			Método ABTS		
Bajo	Medio	Alto	Bajo	Medio	Alto
82.27 – 114.60	99.09 – 111.10	90.3 – 98.23	82.72 - 110.47	90.47 - 107.66	94.57 - 105.05

6.6. Aplicación del μ PAD al análisis de muestras reales.

Un total de 4 muestras de vino pertenecientes a diferentes familias de uva (Syrah, Merlot y Cabernet, variedades Sauvignon y Carmenere) fueron analizadas tanto el μ PAD propuesto como por el método en lote (**Figura 18**). La preparación de las muestras para el análisis en μ PAD consistió en la dilución 2:1 agua destilada-muestra; por su parte, para el método en lote, la preparación de muestra requirió la desgasificación de la muestra mediante ultrasonidos y dilución 1000:1 agua destilada-muestra. Tanto el contenido de polifenoles totales como la capacidad antioxidante, expresados en mg EÁG L⁻¹, obtenidos en el μ PAD presentaron una variación aceptable, aunque resultó superior a los métodos en lote, por lo que las pruebas de *F-Fisher* y *t-student* fueron realizadas con los datos de la **Tabla 11**. La prueba F-Fisher mostró que no existen diferencias significativas entre las varianzas para ninguna de muestras; por lo tanto, la prueba t-student fue calculada tomando en cuenta varianzas homocedásticas. Los resultados indicaron que no existe diferencia significativa entre las medias de los métodos durante el análisis de todas las muestras. Para una mejor visualización de lo anterior, se presentan los diagramas de medias de las muestras analizadas en la **Figura 19**. La muestra de vino Cabernet Carmenere presentó el mayor contenido de polifenoles totales, y la muestra de vino Merlot presentó la mayor capacidad antioxidante en cada método. Por lo que el uso del μ PAD resultó ser una alternativa para la determinación del contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante más barata y sencilla.

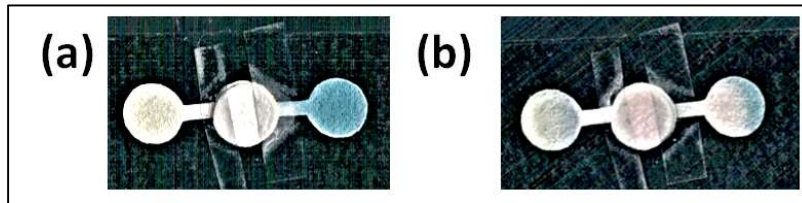


Figura 18. Análisis de muestras de vino en μ PAD. (a) Blanco. (b) Muestra.

Tabla 9. Contenido total de polifenoles y capacidad antioxidante obtenidos en las muestras de vino mediante el análisis por μ PAD y métodos en lote. (n = 3)

Muestra	Contenido de polifenoles totales (mgEÁG L ⁻¹)*		Capacidad antioxidante (mgEÁG L ⁻¹)	
	μ PAD	Lote	μ PAD	Lote
Syrah	1 582.24 \pm 171.37	1 565.56 \pm 136.33	1 420.59 \pm 12.87	1 700.31 \pm 3.66
Merlot	2 116.44 \pm 111.16	2 089.62 \pm 97.65	1 914.47 \pm 5.87	2 155.42 \pm 4.06
Cabernet Sauvignon	821.68 \pm 56.20	874.68 \pm 81.52	1 090.94 \pm 6.34	1 259.51 \pm 3.36
Cabernet Carmenera	3 002.35 \pm 129.73	2 877.98 \pm 61.86	1 697.65 \pm 13.46	1 781.62 \pm 4.67

*Miligramos Equivalentes de Ácido Gálico por litro de muestra.

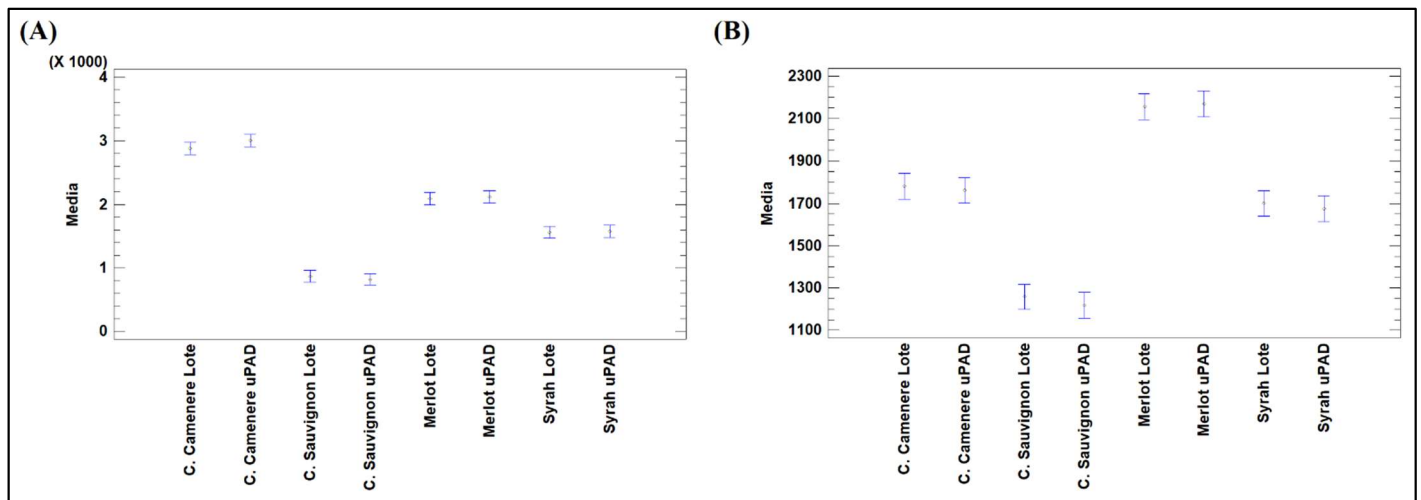


Figura 19. Diagrama de medias para la comparación de los métodos en lote y μ PAD. (n = 3)

7. CONCLUSIONES

Un μ PAD fue desarrollado para la determinación simultánea del contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante en muestras de 4 variedades de vino tinto. El proceso de fabricación implementado fue simple, sencillo, automático, de bajo costo y eficiente para manufactura a gran escala. El uso del papel 1 CHR maximiza la intensidad del color en un tiempo más corto que el papel Grado 1. El tiempo total del análisis por muestras fue de 10 min en el μ PAD, contemplando 5 min para la formación de radical catiónico y 5 min para la reacción entre los reactivos y los antioxidantes. La escala azul del sistema RGB propició una correlación directamente proporcional entre la intensidad del color y la concentración de ácido gálico. El acoplamiento de una zona de pretratamiento de muestras con el reactivo de Carrez fue

posible para la clarificación de las muestras diluidas 2:1 agua-muestra. Las condiciones de reacción fueron optimizadas y los métodos tuvieron un buen desempeño analítico para llevar a cabo las determinaciones, sin necesidad de un pretratamiento de muestra exhaustivo, un volumen elevado de muestra o equipamiento costoso.

8. PERSPECTIVAS

Para asegurar completamente la confiabilidad de los resultados experimentales, se propone continuar con una optimización y validación más exhaustiva de los métodos que, a su vez, permita disminuir los LD y LC, e incrementar la precisión y veracidad. El uso de modificadores de superficie, el control de los flujos y un estudio más profundo de los sistemas de detección puede permitir mejorar la señal analítica y contribuir al desarrollo de los métodos colorimétricos. Además, se pretende aplicar el μ PAD al análisis de otros tipos de muestras.

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] E. Gimeno-Creus, “Compuestos fenólicos: Un análisis de sus beneficios para la salud,” *OFFARM*, vol. 23, pp. 80–84, 2004.
- [2] R. Maestro-Durán and R. Borja-Padilla, “Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos,” *Grasas y Aceites*, vol. 44, pp. 101–106, 1993.
- [3] H. Sies, C. Berndt, and D. P. Jones, “Oxidative Stress,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 86, pp. 715–748, 2017.
- [4] E. Fragopoulou *et al.*, “Evaluation of anti-inflammatory, anti-platelet and antio-oxidant activity of wine extracts prepared from ten different grape varieties,” *Molecules*, vol. 25, no. 5054, pp. 1–16, 2020.
- [5] J. C. Sánchez-Rangel, J. Benavides, J. B. Heredia, L. Cisneros-Zevallos, and D. A. Jacobo-Velázquez, “The Folin-Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination,” *Anal. Methods*, vol. 5, pp. 5990–5999, 2013, doi: 10.1039/c3ay41125g.
- [6] L. Ford, K. Theodoridou, G. N. Sheldrake, and P. J. Walsh, “A critical review of analytical methods used for the chemical characterisation and quantification of phlorotannin compounds in brown seaweeds,” *Phytochem. Anal.*, vol. 30, no. 6, pp. 587–599, 2019, doi: 10.1002/pca.2851.
- [7] Y. Chan, N. Cheng, P. Nigam, and R. Owusu-Apenten, “Effect of pH on the Radical Quenching Capacity of Tea Infusions Using the ABTS Assay,” *J. Appl. Life Sci. Int.*, vol. 6, no. 2, pp. 1–8, 2016, doi: 10.9734/jalsi/2016/27235.
- [8] J. Sochor *et al.*, “Fully automated spectrometric protocols for determination of antioxidant activity: Advantages and disadvantages,” *Molecules*, vol. 15, no. 12, pp. 8618–8640, 2010, doi: 10.3390/molecules15128618.
- [9] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, “Antioxidant Activity Applying an improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 26, no. 98, pp. 1231–1237, 1999.
- [10] P. Hernández-Rodríguez, L. P. Baquero, and H. R. Larrota, *Flavonoids: Potential Therapeutic Agents by Their Antioxidant Capacity*. Elsevier Inc., 2018.
- [11] G. Granados-Guzmán, R. Salazar-Aranda, M. Garza-Tapia, R. Castro-Ríos, and N. Waksman de Torres, “Optimization and validation of two high-throughput methods indicating antiradical activity,” *Curr. Anal. Chem.*, vol. 13, pp. 499–507, 2017, doi: 10.2174/1573411013666170118111516.
- [12] A. Galuszka, Z. Migaszewski, and J. Namiesnik, “The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices,” *Trends Anal. Chem.*, vol. 50, pp. 78–84, 2013, doi: 10.1016/j.trac.2013.04.010.
- [13] G. M. Whitesides, “The origins and the future of microfluidics,” *Nature*, vol. 442, pp. 368–373, 2006, doi: 10.1038/nature05058.
- [14] A. W. Martinez, S. T. Phillips, G. M. Whitesides, and E. Carrilho, “Diagnostics for the developing world: Microfluidic paper-based analytical devices,” *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 1, pp. 3–10, 2010, doi: 10.1021/ac9013989.

- [15] H. Lim, A. T. Jafry, and J. Lee, "Fabrication, flow control and applications of microfluidic paper-based analytical devices," *Molecules*, vol. 24, pp. 1–32, 2019, doi: 10.3390/molecules24162869.
- [16] Y. Xia, J. Si, and Z. Li, "Fabrication techniques for microfluidic paper-based analytical devices and their applications for biological testing: A review," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 77, pp. 774–789, 2016, doi: 10.1016/j.bios.2015.10.032.
- [17] T. Akyazi, L. Basabe-Desmonts, and F. Benito-Lopez, "Review on microfluidic paper-based analytical devices towards commercialisation," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1001, pp. 1–17, 2018, doi: 10.1016/j.aca.2017.11.010.
- [18] K. Sirivibulkovit, S. Nouanthavong, and Y. Sameenoi, "Paper-based DPPH assay for antioxidant activity analysis," *Anal. Sciences*, vol. 34, no. July, pp. 795–800, 2018.
- [19] Vishalli, R. Kaur, K. K. Raina, and K. Dharamvir, *AOAC Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals*. 2002.
- [20] S. Sateanchok, S. Wangkarn, C. Saenjum, and K. Grudpan, "A cost-effective assay for antioxidant using simple cotton thread combining paper based device with mobile phone detection," *Talanta*, vol. 177, pp. 171–175, 2018, doi: 10.1016/j.talanta.2017.08.073.
- [21] C. Puangbanlang, K. Sirivibulkovit, D. Nacapricha, and Y. Sameenoi, "A paper-based device for simultaneous determination of antioxidant activity and total phenolic content in food samples," *Talanta*, vol. 198, no. November 2018, pp. 542–549, 2019, doi: 10.1016/j.talanta.2019.02.048.
- [22] Y. Liu, "Investigation of Physical and Chemical Reactions on Microfluidic Paper-Based Analytical Devices," California State Politechnic University, 2016.
- [23] L. Castro Morales, "Evaluación de antioxidantes en granos de café arabica (*Coffea arabica*) con diferentes grados de tostado," Universidad Nacional Autónoma de México, 2020.
- [24] P. P. Morillas, *Guía EURACHEM: La adecuación al uso de los métodos analíticos - Una guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados*. España: Eurolab, 2016.
- [25] CCAYAC-CR-03/1, *Criterios para la validación interna y confirmación de métodos fisicoquímicos*. México: Cofepris, 2014.
- [26] N. Paixao, R. Perestrelo, J. Marques, and J. Camara, "Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines," *Food Chemistry*, vol. 105, pp. 204–214, 2007, doi: 10.1016/j.foodchem.2007.04.017.
- [27] N. K. Mani, A. Prabhu, S. K. Biswas, and S. Chakraborty, "Fabricating Paper Based Devices Using Correction Pens," *Sci. Rep.*, pp. 1–8, 2019, doi: 10.1038/s41598-018-38308-6.
- [28] T. K. Komatsu, M. M. Maeki, A. I. Ishida, H. T. Tani, and M. Tokeshi, "Characteristics of Microfluidic Paper-based Analytical Devices Fabricated by Four Different Methods," *Anal. Sci.*, vol. 34, pp. 39–44, 2018.
- [29] E. M. Fenton, M. R. Mascarenas, G. P. López, and S. S. Sibbett, "Multiplex lateral-flow test strips fabricated by two-dimensional shaping," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 1, pp. 124–129, 2009, doi: 10.1021/am800043z.
- [30] W. Dungchai, O. Chailapakul, and C. S. Henry, "Use of multiple colorimetric indicators for paper-based microfluidic devices," *Anal. Chim. Acta*, vol. 674, no. 2, pp. 227–233, 2010, doi: 10.1016/j.aca.2010.06.019.

- [31] E. Evans, M. Gabriel, W. Karlos, T. Coltro, and C. D. Garcia, "Rational selection of substrates to improve color intensity and uniformity on microfluidic paper-based analytical devices," *Analyst*, vol. 139, pp. 2127–2132, 2014, doi: 10.1039/c4an00230j.
- [32] E. Fu, S. A. Ramsey, P. Kauffman, B. Lutz, and P. Yager, "Transport in two-dimensional paper networks," *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 10, no. 1, pp. 29–35, 2011, doi: 10.1007/s10404-010-0643-y.
- [33] D. Puangpronpitag, P. Areejitranusorn, P. Boonsiri, M. Suttajit, and P. Yongvanit, "Antioxidant activities of polyphenolic compounds isolated from *antidesma thwaitesianum* müll. arg. Seeds and marcs," *J. Food Sci.*, vol. 73, no. 9, pp. 648–653, 2008, doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00951.x.
- [34] V. M. Moo-huchin *et al.*, "Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico," *Food Chem.*, vol. 166, pp. 17–22, 2015.
- [35] A. M. Grancarić, N. Ristić, A. Tarbuk, and I. Ristić, "Electrokinetic Phenomena of Cationised Cotton and its Dyeability with Reactive Dyes," *Fibres Text. East. Eur.*, vol. 21, no. 6, pp. 106–110, 2013.
- [36] EMD Millipore Corporation, "Clarificación de carrez," vol. 49, no. 19, p. 64271, 2013.
- [37] K. Chávez Ramos, L. F. Olguín Contreras, and M. del P. Cañizares Macías, "Lab-On-A-Chip Extraction of Phenolic Compounds from Extra Virgin Olive Oil," *Food Anal. Methods*, vol. 13, pp. 21–34, 2019.