



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Departamento de Química

TESIS DE DOCTOR EN QUÍMICA

APLICACIÓN DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS A SISTEMAS
DETERMINATIVOS Y DE "SCREENING" PARA EL ESTUDIO MUESTRAS
AMBIENTALES Y ALIMENTOS. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE
DISPOSITIVOS BASADOS EN DETECCIÓN POR IMÁGENES.

Bioquímico Ezequiel M. Vidal

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2020

[Type here]

[Type here]

[Type here]



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Departamento de Química

TESIS DE DOCTOR EN QUÍMICA

APLICACIÓN DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS A SISTEMAS DETERMINATIVOS Y DE "SCREENING" PARA EL ESTUDIO MUESTRAS AMBIENTALES Y ALIMENTOS. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE DISPOSITIVOS BASADOS EN DETECCIÓN POR IMÁGENES.

Bioquímico Ezequiel M. Vidal

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2020

[Type here]

PREFACIO

“Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Química del Sur (INQUISUR), dependiente del Departamento de Química durante el período comprendido entre el 08 de Septiembre de 2015 y el 1 de Noviembre de 2019, bajo la dirección de la Dra. Adriana G. Lista y la Dra. Claudia E. Domini, Profesoras Titular y Adjunta de las cátedras de Química Analítica Instrumental y Fundamental, respectivamente.”

.....

Bqco. Ezequiel Vidal

<p style="text-align: center;">UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR</p> <p style="text-align: center;">Secretaría General de Posgrado y Educación Continua</p> <p style="text-align: center;">La presente Tesis ha sido aprobada el .../.../... , mereciendo la calificación de(.....)</p>
--

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.

[Type here]

“Simplicitas est ultimum ruditatis.”

(La simplicidad es la máxima sofisticación.)

Leonardo Da Vinci

[Type here]

DEDICATORIA

Quisiera dedicar la presente tesis a mis hijos, Vicky y Ema, para que recuerden que siempre el esfuerzo vale la pena.

A mis padres, Bernardo y Ñata, porque siempre me lo recordaron.

Y a mi esposa, Ana, porque con amor, cada día se esfuerza a mi lado.

[Type here]

AGRADECIMIENTOS

Quisiera ser justo a la hora de agradecer a todas las personas que aportaron en algún momento a la realización de la presente tesis, sabiendo que será tarea imposible ser ecuánime al hacerlo intentaré no olvidar a nadie.

En primer lugar quiero agradecer a dos personas que creyeron en mi cuando más lejos se encontraba la posibilidad del doctorado, Cali y Adriana, su apoyo fue indispensable para iniciar este camino. Siempre voy a recordar el momento en el que les presenté el primer dispositivo de papel, cumplimos el objetivo, nos divertimos haciendo esta tesis.

A mi esposa, Anabella, que me acompañó con paciencia durante todo este largo proceso. A mis hijos, a quienes les quité muchas horas de compañía y a mis padres, ya que sin su apoyo y su fe en mi este sueño no se hubiese cumplido.

A mi gran familia, que siempre creyeron en mí y me apoyaron, en muchos momentos sin tener idea de qué estaba haciendo yo, siempre adelante. Un gran abrazo Ale, Esteban, Mirna, Angie, Flor y Nico.

Quiero agradecer también a Ana, mi amiga/compañera/codirectora/editora, con quien se forjó una amistad y un equipo de trabajo inmejorable. Queda mucho camino por delante y muchos proyectos para desarrollar.

A los amigos que conocí en la universidad: Dami, Nati, Maite, Cintia, Nico y Flor. Porque siempre estuvieron para enseñarme todo lo que necesitara sin egoísmos. Y por tanta diversión, por supuesto. También quiero agradecer a Mariano y Marcelo, porque siempre estuvieron dispuestos a ayudar y acompañar.

[Type here]

Mi agradecimiento también a dos personas que desde lejos me invitaron a soñar, convirtiéndolo este proyecto en un sueño real, vaya un gran abrazo para Carlos García y Antonio Canals, ya nos estaremos viendo.

Quiero agradecer a la persona que me abrió la puerta a un laboratorio de investigación y que siempre me expresó su confianza, Beatriz, sin su colaboración hace ya más de 20 años, nada de esto existiría.

Y a cada uno de los profesores que impartieron cursos de posgrado, sin dudas fueron de gran valor en mi formación como científico.

Al área de Química Analítica del departamento de Química de la UNS.

A la Universidad Nacional del Sur, por ser la institución que dio el marco para mi estudio, mi formación y mi crecimiento.

[Type here]

Resumen

Las nuevas tecnologías han evolucionado y forman parte de nuestra vida cotidiana. De esta manera, tecnologías prácticamente marginales hace apenas un cuarto de siglo, hoy se consolidan como esenciales. Tales avances han propiciado la aparición de técnicas analíticas que, basándose en instrumentación no convencional, han permitido simplificar, economizar y popularizar sistemas determinativos. El desarrollo de técnicas de fabricación automatizadas y accesibles como lo son las impresoras en tres dimensiones incrementan la cantidad de posibilidades para crear dispositivos o sistemas para determinaciones químicas.

La presente tesis consiste en el desarrollo de sistemas analíticos originales basados en detección por imagen y aplicando técnicas de impresión en tres dimensiones, así como también la implementación del papel como sustrato para la generación de dispositivos determinativos. El primer trabajo describe la generación de un dispositivo microfluídico basado en papel con detección simultánea de fluoruros y nitritos, utilizando un teléfono celular inteligente en muestras de aguas de la ciudad de Bahía Blanca y la región. En el segundo trabajo se desarrolló un dispositivo analítico impreso en 3D con detección por imagen para la determinación de sulfatos y quinina en muestras de agua y bebidas gaseosas. El tercer trabajo desarrolla la creación de un espectrofotómetro con detección basada en imagen para el control de diluciones de hipoclorito de sodio realizadas en diferentes muestras de aguas. El cuarto trabajo desarrolla el diseño, la fabricación y la validación de un espectrofotómetro-fluorímetro dual para la determinación de curcumina en muestras de alimentos. A lo largo de esta tesis los métodos utilizados se basaron en la aplicación de los principios de la química verde, sobre todo en la reducción de reactivos químicos utilizados, aplicando métodos simples, rápidos y económicos.

[Type here]

Abstract

New technologies have evolved and are part of our daily life. In this way, practically marginal technologies just a quarter of a century ago, today are consolidated as essential. Such advances have led to the appearance of analytical techniques that, developed with unconventional instrumentation, have made it possible to simplify, economize, and popularize determinative systems. The development of automated and accessible manufacturing techniques such as three-dimensional printers increase the number of possibilities to create devices or systems for chemical determinations.

This thesis consists of the development of original analytical systems based in image detection and applying three-dimensional printing techniques, as well as the implementation of paper as a substrate for the generation of determinative devices. The first work describes the generation of a paper-based microfluidic device with simultaneous detection of fluorides and nitrites, using a smart cell phone in water samples from the city of Bahía Blanca and its region. In the second work is a 3D printed analytical device with image detection for the determination of sulfates and quinine in local water samples and soft drinks. The third work develops the creation of a spectrophotometer with image-based detection to control dilutions of sodium hypochlorite carried out in different water samples. The fourth work develops the design, manufacture and validation of a dual fluorimeter-spectrophotometer for the determination of curcumin in food samples. Throughout this thesis the methods used were based on the application of the principles of green chemistry, especially in the reduction of chemical reagents used, applying simple, fast and cheap methods.

[Type here]

INDICE

1	Capítulo 1	15
1.1	Introducción	15
1.1.1	Detección por imágenes basada en teléfonos inteligentes.	15
1.1.2	Colorimetría en teléfonos inteligentes.	18
1.1.3	Fluorimetría con teléfonos inteligentes:	25
1.2	Diseño y fabricación en tres dimensiones.	28
1.2.2	Diseño 3D	31
1.2.3	Utilización de la impresión 3D para la fabricación de dispositivos.	31
1.3	Dispositivos analíticos basados en papel	33
1.4	Laboratorio en un teléfono.	35
2	Capítulo 2.	37
2.1	Objetivos.	37
3	Capítulo 3	38
	Dispositivo analítico microfluídico basado en papel (μPAD) para la determinación simultánea de nitrito y fluoruro usando un teléfono inteligente.	38
3.1	Resumen	38
3.2	Introducción.	39
3.3	Parte experimental.	41
3.3.1	Reactivos y soluciones	41
3.3.2	Instrumentación	41
3.3.3	Captura de imágenes	41
3.3.4	Procesamiento de la imagen	42
3.3.5	Muestras	43
3.3.6	Procedimiento	43
3.4	Resultados y discusión	44
3.4.1	Fabricación del μ PAD	44
3.5	Optimización	45
3.5.1	Cifras de mérito	47
3.5.2	Análisis de muestras reales y validación	47
3.6	Conclusiones	51
4	Capítulo 4	52
	Nuevo dispositivo impreso en 3D, económico y simple para determinaciones nefelométricas y fluorimétricas basadas en la detección mediante teléfonos inteligentes.	52
	Resumen	52

[Type here]

4.1	Introducción	52
4.2	Experimental	54
4.2.1	Reactivos y soluciones	54
4.2.2	Instrumentación	54
4.2.3	Captura de imagen.	54
4.2.4	Procesamiento de imágenes	55
4.2.5	Muestras	56
4.2.6	Procedimiento	57
4.2.7	Análisis estadístico de datos.	57
4.3	Resultados y discusión	58
4.3.1	Diseño y fabricación del dispositivo	58
4.3.2	Optimización	59
4.3.3	Desempeño analítico	60
4.3.4	Análisis de muestras reales.	61
4.4	Conclusiones	63
5	Capítulo 5	65
	Uso de un espectrofotómetro impreso en 3D con un smartphone como detector para el análisis cinético de la degradación de hipoclorito	65
	Resumen	65
5.1	Introducción	65
5.2	Parte experimental	66
5.2.1	Reactivos y soluciones.	66
5.2.2	Instrumentación.	67
5.2.3	Dimensiones del dispositivo e impresión.	67
5.2.4	Captura de imagen.	68
5.2.5	Procesamiento de imagen.	69
5.2.6	Procedimientos para los estudios de degradación.	69
5.2.7	Muestras.	70
5.2.8	Análisis estadístico de los datos.	70
5.3	Resultados y discusión	70
5.3.1	Calibración del dispositivo.	70
5.3.2	Evaluación del desempeño del instrumento.	71
5.3.3	Estudio de la degradación del violeta cristal.	72
5.3.4	Validación del Dispositivo.	75
5.3.5	Aplicación práctica.	78
5.4	Conclusiones	79
6	Capítulo 6	80
	Desarrollo de un espectrómetro de absorción y emisión para la cuantificación y estudios de extracción de curcumina en muestras de alimentos.	80
	Resumen	80

[Type here]

6.1	Introducción.	80
6.2	Parte experimental	81
6.2.1	Reactivos y soluciones	81
6.2.2	Instrumentación.	81
6.2.3	Características del dispositivo.	82
6.2.4	Captura de imágenes.	83
6.2.5	Procesamiento de las imágenes.	84
6.2.6	Muestras	84
6.2.7	Procedimiento	84
6.3	Resultados y discusión	85
6.3.1	Calibración del espectrómetro.	85
6.3.2	Estudios de solubilidad de la cúrcuma en el solvente de extracción.	88
6.3.3	Estudio de extracción de curcumina por ultrasonidos.	89
6.3.4	Validación del dispositivo	91
6.3.5	Aplicación a muestras reales.	91
6.4	Conclusión.	92
7	Capítulo 7	93
	Conclusiones	93
8	Producción científica	95
	Publicaciones	95
	Presentaciones a congresos	96
	Bibliografía	98

Índice de Figuras

Figura 1. Principales características de los teléfonos celulares.	16
Figura 2. Ejemplos de determinaciones colorimétricas clásicas asistidas por imagen digital.[24], [26].	17
Figura 3. Dispositivos adaptados para teléfonos celulares. a y b.	18
Figura 4. Representación espacial del espacio de color RGB.	19
Figura 5. En el espacio de color RGB la suma de sus componentes da como resultado el blanco, la ausencia de componentes representa el negro. En el espacio de color CMYk se utiliza el criterio inverso.	19
Figura 6. Representación espacial del modelo HSV.	20
Figura 7. Representación del espacio de color CIE L*a*b*.	20
Figura 8. Elementos dispersivos. a) Esquema de una red de difracción (arriba) y un prisma (abajo). b) Difracción con un disco compacto. c) Red de difracción de transmisión.	22
Figura 9. Imagen real y representación esquemática de un sensor CMOS.	23
Figura 10. Espectros obtenidos mediante un espectrofotómetro creado para un teléfono inteligente. a) Espectro del blanco. b) Espectro de la tartrazina. c) Diferencia entre ambos espectros.	24
Figura 11. Detalle de la transformación del espectro obtenido de la imagen (inferior) en espectros (superior). a) señal del canal azul, b) señal del canal verde, c) señal del canal rojo, d) intensidad total. (deOliveira et al.)	25
Figura 12. Configuración general de los dispositivos espectrométricos. a) Espectrometría de absorción. b) Espectrometría de emisión por fluorescencia.	27
Figura 13. Esquema de un espectrómetro “dual” para absorción y emisión.	28
Figura 14. Esquema de funcionamiento de los diferentes tipos de impresión 3D.	30
Figura 15. Detalle del proceso de laminado.	31
Figura 16. División de los dispositivos impresos en 3D por su funcionalidad en química analítica.	31
Figura 17. Diferentes técnicas utilizando cera. a) Fabricación utilizando lápices de cera. b) Dispositivo creado con una impresora de chorro de tinta modificada para inyectar cera. c) Impresión mediante una impresora de cera[110].	34
Figura 18. Diferentes tipos de dispositivos. μPAD 3D creado por plegado donde se puede ver el papel modificado (a), su cara superior luego del plegado (b), la cara inferior (c), su contenedor metálico (d) y una vez utilizado con colorantes para probar los canales creados (e). A la derecha (f) se presenta un μPAD con electrodos impresos directamente sobre el papel[110].	34
Figura 19. Esquema de la caja de iluminación utilizada para capturar las imágenes.	42
Figura 20. Imagen real de una región de interés (ROI) con detalle del histograma del canal rojo.	43
Figura 21. Fotografía real con el detalle de las dimensiones del μPAD seleccionado. A: área de reacción, B: zona de muestra.	44
Figura 22. Foto real del dispositivo una vez terminada la reacción.	44
Figura 23. Diseños estudiados para el dispositivo.	45
Figura 24. Optimización de la concentración de los reactivos. RMC: concentración del método de referencia	46
Figura 25. Optimización del tiempo de reacción por nitritos. a: μPAD propuesto; b: método de referencia (3,00 mg/L-1).	46
Figura 26. Fotografía real del dispositivo propuesto.	55
Figura 27. Proceso de selección de una región de interés homogénea.	56
Figura 28. Captura de pantalla de la función Macro creada.	56
Figura 29. Ubicación del área de estudio: Bahía Blanca, Coronel Suárez y San Miguel Arcángel (Buenos Aires, Argentina).	57
Figura 30. Dimensiones reales del dispositivo y detalle de las estructuras interiores.	58
Figura 31. Desglose de las piezas que componen el dispositivo.	59
Figura 32. Optimización de las distancias de captura e iluminación.	60
Figura 33. Curvas de calibrado para ambos analitos con detalle de las fotos reales capturadas.	61

[Type here]

Figura 34. Validación de los métodos propuestos frente a los métodos de referencia. A. Sulfato y B. Quinina. Región de confianza conjunta elíptica para la regresión BLS para las muestras reales estudiadas en este trabajo a un nivel de significación del 5%. El círculo verde (o) representa los valores obtenidos para la pendiente y la intersección, y el círculo rojo (o) corresponde al valor teórico de la intersección cero y la pendiente de la unidad para el sulfato (A) y la quinina (B).	62
Figura 35. a) Detalles de cada parte y representación esquemática del espectrofotómetro descrito. B) Foto real del dispositivo propuesto.	68
Figura 36. Espectros obtenidos con diferentes fuentes de luz y utilizados para calibrar el espectrofotómetro propuesto.	71
Figura 37. intensidad de la luz LED en diferentes longitudes de onda durante el experimento	72
Figura 38. Dependencia espectral de la intensidad de una solución de 14 mgL⁻¹ de VC (trazo azul) y su desviación estándar (trazo rojo).	72
Figura 40. Curvas espectrales obtenidas durante un estudio de degradación de VC (7,5 mgL⁻¹) con 0,05% de NaClO a pH = 7,0.	73
Figura 41. Estudio de degradación VC. Cinco niveles de concentración diferente que muestra un comportamiento oxidante.	73
Figura 42. Degradación de una solución 0,05% de Violeta Cristal a diferentes pH.	74
Figura 43. Análisis de la degradación de CV con diferentes tiempos de exposición a la luz solar.	74
Figura 44. Evaluación de la efectividad de soluciones preparadas con aguas potables de acceso doméstico.	75
Figura 45. Gráfico espectral obtenido por el espectrofotómetro HACH 4000 (azul) y el espectrofotómetro para teléfonos inteligentes propuesto (rojo).	76
Figura 46. Curva de calibrado para VC realizada con el dispositivo propuesto.	76
Figura 47. Fotos de los discos de papel durante los estudios de decoloración.	78
Figura 48. Tiempo de decoloración de los discos de papel para diferentes niveles de concentración.	78
Figura 49. Esquema de la disposición del instrumento propuesto. Puede observarse el LED ultravioleta de alta potencia (a), el colimador para la luz blanca (b), el soporte del espectrómetro (c), las sujeciones para el TI (d), y los elementos ópticos (e).	82
Figura 50. Detalle del espectrómetro dual donde se puede observar el portacubetas (a), la ranura de ingreso de luz blanca (b), la ventana para el LED violeta (c), la rendija de salida (d), la red de difracción (e), el cristal portaobjetos (f) y el lente de enfoque (g).	83
Figura 51. Detalle de una captura del espectro obtenido de la luz blanca proveniente del LED blanco, la selección de la región de interés y su posicionamiento.	84
Figura 52. Calibración del dispositivo. Pueden observarse los espectros de cada una de las fuentes de luz utilizadas en este proceso detallando el número de orden de pixeles y la longitud de onda.	86
Figura 53. Espectros de absorción de los curcuminoides.	87
Figura 54. Curva de calibrado para el espectro UV VIS a 431 nm.	87
Figura 55. Espectros de emisión graficados para la realización de la curva de calibrado.	88
Figura 56. Curva de calibrado para fluorescencia. En el interior puede observarse la intensidad de fluorescencia en todo el rango de concentraciones estudiado.	88
Figura 57. Evolución de la extracción de cúrcuma con etanol.	89
Figura 58. Optimización del tiempo de sonicación.	90
Figura 59. Comparación de métodos para la extracción de curcuminoides para diferentes relaciones agua:etanol. a) 3:1, b) 1:1 y c) 1:3.	90
Figura 60. Mediciones realizadas con el dispositivo propuesto y un espectrofotómetro a muestras reales de panificados.	91

[Type here]

Indice de Tablas

Tabla 1. Comparación de métodos para la determinación de F-.	48
Tabla 2. Resultados del estudio de recuperación de nitrito.	49
Tabla 3. Comparación de métodos.	50
Tabla 4. Resultados del análisis de muestras reales.	61
Tabla 5. Comparación de métodos analíticos basados en teléfonos inteligentes.	63
Tabla 6. Comparación de espectrofotómetros basados en teléfonos inteligentes.	77
Tabla 7. Relación de longitudes de onda y número de pixel en el proceso de calibración.	86
Tabla 8. Comparación de métodos para la determinación de curcumina.	92

[Type here]

Índice de abreviaturas

TC : Teléfono Celular

TI: Teléfono Inteligente

RGB: espacio de color basado en los colores rojo, verde y azul.

HSI: espacio de color basado en el matiz, la saturación y la intensidad.

CMOS: sensor óptico utilizado en fotografía digital(Complementary Metal Oxide Semiconductor)

ROI : Región de Interés

ISO: escala de la sensibilidad fotográfica.

LED : Diodo emisor de luz.

FDM: método de fabricación basado en la deposición de material fundido (Fused deposition modeling)

SLA: modelo de fabricación por solidificación de resina fotosensible (Stereolithography)

SLS: modelo de fabricación basado en la fusión de partículas de polvo en suspensión (Selective laser sintering)

CAD: Dibujo asistido por computadora (Computer assisted drawing)

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

SPR: Resonancia plasmónica de superficie (Surface Plasmon Resonance)

μPAD: Microdispositivo analítico basado en papel (Micro Paperbased Device)

PDMS: Poli dimetilsiloxano.

LOD: Límite de detección (Limit of Detection)

LOQ: Límite de cuantificación (Limit of Quantification)

VC: Violeta cristal.

[Type here]

1 Capítulo 1

1.1 Introducción

1.1.1 Detección por imágenes basada en teléfonos inteligentes.

La tecnología de teléfonos celulares (TC) se ha desarrollado a un nivel tecnológico muy alto. Se ha generalizado el uso de móviles debido a su simplicidad y bajo costo. Los avances en la tecnología de los teléfonos inteligentes (TI) o *smartphones*, es igual o superior a la capacidad de procesamiento de una computadora personal de hace solo unos años, sumándose a la ventaja de su portabilidad y la versatilidad que presentan estos dispositivos[1].

Los factores que han posicionado a los TC como accesorios necesarios se deben a la cantidad de funciones integradas al teléfono, conectividad a internet, etc.[2]. Existe una gran variedad de avances tecnológicos que pueden ser incorporados en los teléfonos móviles (sensores de imagen, lentes ópticas, giroscopios, GPS, etc.), haciendo de éstos una herramienta con mucha proyección en campos muy lejanos a las telecomunicaciones. Esto último, genera grandes expectativas para el desarrollo de instrumental científico o accesorios de TI que hagan posible llevar adelante determinaciones analíticas[3]. Las principales características de los teléfonos celulares actuales se resumen en la Figura 1.

Las disciplinas en las que se realizan estas investigaciones y avances, suelen estar asociadas al diagnóstico médico in situ (Análisis en el punto de control, por sus siglas siglas en ingles POCT)[4], control ambiental[5], industrial[6] y agrícola[7]. Al ser portátiles, tener conectividad, incluir diferentes sensores y su bajo coste hacen de los TC una opción ineludible para el desarrollo de nuevas metodologías analíticas.

[Type here]



Figura 1. Principales características de los teléfonos celulares.

1.1.1.1 Teléfonos inteligentes en determinaciones analíticas.

Hace más de una década, que comenzó a desarrollarse instrumentación analítica basada en TI[8], se centró su uso en la lectura de dispositivos para control de parámetros bioquímicos con fines médicos[9]. Al mejorar la calidad de los sensores de las cámaras y la capacidad de procesamiento de datos, permitió la integración del teléfono celular a instrumentos analíticos para determinaciones no solamente ubicadas en un laboratorio sino también portátiles. De esta manera, se desarrollaron instrumentos que integran los smartphones a metodologías tales como colorimetría[10], fluorimetría[11], espectrofotometría[12] y espectrofluorimetría[13], [14].

1.1.1.2 Colorimetría a través de teléfonos inteligentes.

La colorimetría basada en TI consiste en el análisis de la información recibida a través del sensor de la cámara relacionándola con la concentración de un analito en una muestra[15]. Las diferentes características de un color permiten utilizar sus parámetros como respuestas analíticas. Esta técnica se ha ampliado con la incorporación de dispositivos basados en papel[16]. El primer trabajo reportado[8] logró relacionar los cambios de color con la concentración de proteínas o glucosa en una muestra de orina. Esta experiencia demostró que la tecnología presente en un TI permite realizar determinaciones analíticas e incluso procesar los datos obtenidos.

En los últimos años, las determinaciones basadas en captura de imágenes con TI han crecido de manera notable, llegando a simplificar mucho el trabajo cotidiano de laboratorio y

[Type here]

determinaciones in situ, facilitando la toma de decisiones. Esta nueva metodología se ha aplicado a análisis clínicos de laboratorio[17]–[19], alimenticios[14],[20] y ambientales[1].

El concepto de detección por imagen fue incorporado rápidamente y una gran variedad de determinaciones fueron reportadas utilizando la cámara del teléfono celular a manera de detector colorimétrico[21].

La utilización de TC para determinaciones de campo requiere confiabilidad, simplicidad en el uso y reproducibilidad[22]. Aun así, el inconveniente encontrado a la hora de estandarizar los resultados fue lograr evitar la influencia de las variaciones de la luz ambiental al momento de capturar la imagen[23]. Para afrontar esta complicación se trabajó en algoritmos de calibración con patrones colorimétricos previamente impresos en el dispositivo de papel. De esta manera el algoritmo permitía procesar la imagen teniendo como referencia recuadros coloreados (Figura 2) con parámetros de color previamente establecidos[24],[25].



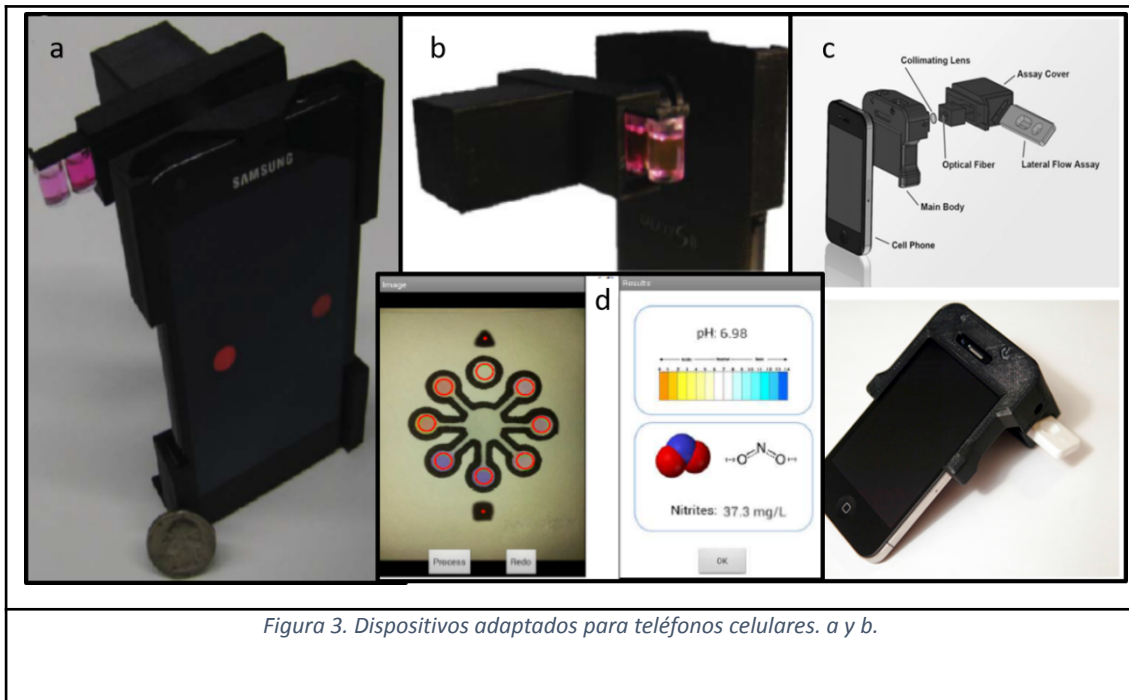
Figura 2. Ejemplos de determinaciones colorimétricas clásicas asistidas por imagen digital.[24, 26].

La teoría del color en imágenes digitales nació históricamente como una necesidad comercial de parametrizar los colores y así lograr su estandarización. De esta manera, un color podría ser impreso de forma reproducible en diferentes lugares del mundo asegurando el mismo efecto. Posteriormente, se realizó el registro de combinaciones particulares de colores para la identificación de marcas comerciales o productos específicos.

La corrección del color y el procesamiento de imágenes son solo algunas de las áreas en las que se ha avanzado para la utilización de estas tecnologías[27]. Por otra parte, se han diseñado gran cantidad de accesorios adaptados a TI en el desarrollo de técnicas de preparación de muestras[28], [29]. Otros estudios se han realizado con nanomateriales para detecciones colorimétricas, basados en el fenómeno de la resonancia plasmónica de superficie (SPR)[30], e incluso se han realizado estudios de fluorescencia con quantum dots[31]. Además, otros investigadores han adaptado diversos dispositivos microfluídicos utilizando diferentes

[Type here]

plataformas (papel, polímeros y vidrio)[32] y hasta se han realizado estudios utilizando líquidos iónicos en conjunto con técnicas de detección por imagen[33] (Figura 3).



1.1.2 Colorimetría en teléfonos inteligentes.

Cada modelo de color propone diferentes parámetros para la especificación normalizada de un color individual[34]. Estos modelos representan un sistema de coordenadas en tres dimensiones en el que cada color individual queda representado por un único triplete de parámetros.

- Modelo RGB.

El modelo RGB identifica las componentes espectrales fundamentales de cada uno de los colores siendo estos Rojo (R, del inglés red), verde (G, del inglés green) y azul (B, del inglés blue). Este modelo está basado en un sistema de coordenadas cartesianas, en el cual cada eje corresponde a una de las variables. Dado que en la configuración digital de color más frecuente es la de 8 bits, el número posible de valores de cada eje es de $2^8 = 256$ puntos en la escala. De esta manera, cuando se utiliza este espacio de color los valores posibles para cada uno de los canales se encuentra entre 0 y 255. El negro corresponde al origen (0, 0, 0) y el blanco se ubica en el vértice opuesto del espacio (255, 255, 255), como se puede observar en la Figura 4. La escala de grises queda definida por una diagonal que une el origen con su vértice opuesto. La

[Type here]

mayoría de las cámaras fotográficas digitales se fabrican utilizando el espacio RGB, siendo así el sistema nativo para el estudio de imágenes tanto en la química analítica como en otras áreas[35].

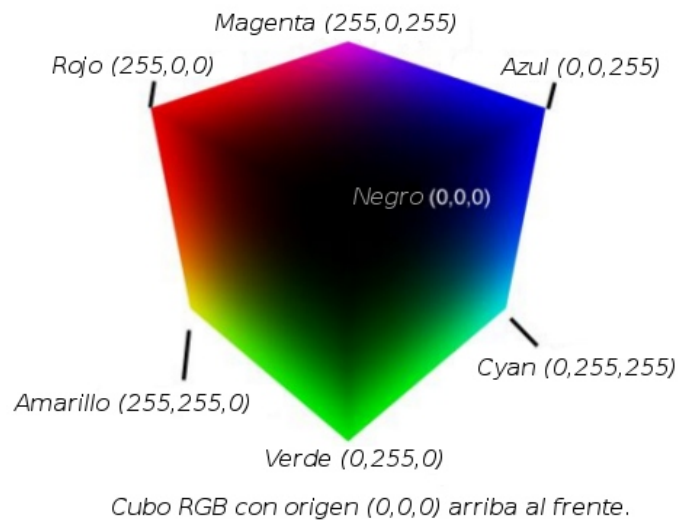


Figura 4. Representación espacial del espacio de color RGB.

- Modelo CMYk

El sistema CMYk (código cian, magenta y amarillo) se basa en los colores primarios de los pigmentos (ampliamente utilizados en impresiones a color). Son llamados colores sustractivos dado que son utilizados como filtros para sustraer colores de una fuente de luz blanca. Para poder ser impresos, los colores (clásicamente definidos por un sistema RGB) deben ser convertidos al espacio CMYk. Esto es representado espacialmente en un sistema de ejes cartesianos. La diferencia con el sistema RGB es que los colores se encuentran invertidos en sus valores (Figura 5).

[Type here]

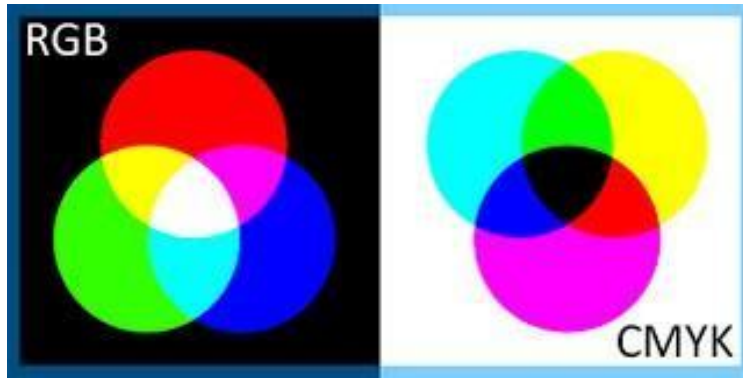


Figura 5. En el espacio de color RGB la suma de sus componentes da como resultado el blanco, la ausencia de componentes representa el negro. En el espacio de color CMYk se utiliza el criterio inverso.

- Modelo HSI

Este modelo de espacio de color se basa en las siglas de sus componentes en inglés, H corresponde a tonalidad (*Hue*), S es la saturación (*Saturation*), y V es el valor de intensidad (*Value*). Este espacio separa el valor de intensidad de la imagen de los componentes cromáticos. A su vez la saturación y la tonalidad son valores asociados a la percepción del color por parte del ojo humano. Es muy utilizado en el desarrollo de algoritmos para ser aplicados a procesado de imágenes emulando la percepción humana del color. Se esquematiza en un sistema de coordenadas como se muestra en la *Figura 6*.

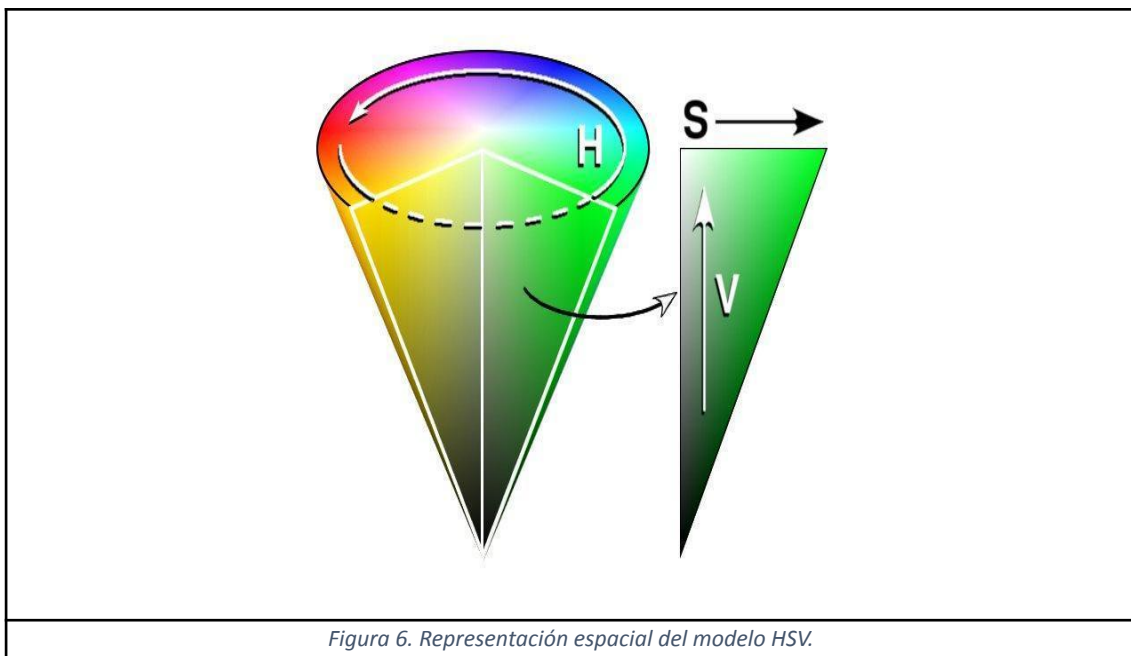


Figura 6. Representación espacial del modelo HSV.

- Modelo CIE L*a*b*

El siguiente modelo está basado en la percepción de los colores por medio del ojo humano. Fue el primer espacio de color propuesto[36]. Su nombre se debe a la Commission

[Type here]

Internationale de l'Éclairage (CIE). El parámetro L^* corresponde a la luminosidad, a^* determina la posición en el eje rojo/verde y b^* la ubicación en el eje amarillo/azul (Figura 7).

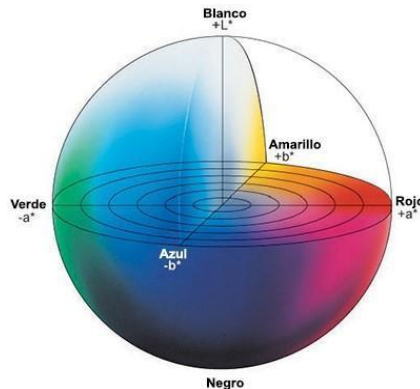


Figura 7. Representación del espacio de color CIE $L^*a^*b^*$.

1.1.2.1 Aplicación de imágenes digitales en química

El uso de los diferentes espacios de color (principalmente RGB y HSI) hizo posible la fusión real de la química analítica con la tecnología de celulares a través de la cámara. En principio los avances realizados fueron utilizados para la enseñanza de la química analítica[37],[38]. Estas técnicas permiten una explicación adecuada y comprensible de la ley de Lambert y Beer, e incluso se pueden realizar experiencias prácticas requiriendo poco equipamiento y siendo totalmente portátil[39].

Sin embargo, algunos autores utilizaron estos avances en investigación[1],[40]. Algunos de estos prefirieron aplicar los nuevos conocimientos a estandarizar la forma de interpretar colores en sistemas que históricamente requerían de la percepción humana para ser estudiados. Inicialmente se utilizaron las imágenes digitales para la lectura de tiras reactivas comerciales tanto en estudios bioquímicos clínicos como en otras áreas[23]. A partir de allí, se comenzaron a desarrollar nuevas plataformas en las cuales los colores podían ser objetivamente cuantificados, estudiados e interpretados para poder así obtener resultados analíticos fiables.

El procedimiento realizado consiste en capturar una imagen de la solución (o superficie) y compararla con referencias impresas o preparadas como soluciones. En este proceso los parámetros intrínsecos a la captura de la imagen (foco, balance de blancos, velocidad de

[Type here]

obturación, ISO, etc.) son importantes cuando se intenta mejorar las figuras de mérito de los resultados analíticos.

Han surgido diferentes estrategias para el proceso de captura de las imágenes. Inicialmente, se crearon soportes o cajas adaptadas para estandarizar la posición del teléfono e incluso iluminar la muestra. La introducción de iluminación LED y de técnicas de impresión en 3 dimensiones permitió una reducción sensible en el tamaño, reproducibilidad y calidad de los dispositivos creados para este propósito[41].

1.1.2.2 Espectrofotometría con teléfonos inteligentes

La espectroscopia es el estudio de la interacción entre la radiación electromagnética y la materia, en la cual puede producirse absorción, emisión o dispersión de energía radiante. En estas técnicas se analiza la intensidad de una señal a lo largo del espectro.

- Elementos dispersivos para un espectrómetro

El monocromador es uno de los componentes principales de un espectrómetro ya que su función es dispersar la luz policromática o blanca en sus respectivas longitudes de onda, permitiendo seleccionar una banda estrecha de este espectro usando una rendija[42]. Esta dispersión se logró mediante el uso de prismas (basados en la refracción) y más tarde de redes de difracción (basadas en interferencias constructivas) altamente eficientes en su reemplazo[43]. Las redes de difracción de bajo costo y tamaño compacto son habitualmente las preferidas para espectrómetros portátiles (Figura 8). Las redes de difracción económicas son fabricadas utilizando un molde de sílice con los surcos previamente grabados y sobre el cual se deposita un monómero líquido, el cual luego se polimeriza[44].

En dispositivos de bajo costo, a menudo se utiliza como elemento dispersivo un DVD virgen[45]. Varias publicaciones han utilizado esta opción con resultados satisfactorios[45]. También existe la posibilidad de utilizar láminas de difracción plásticas que pueden ser adquiridas en diversas formas y tamaños (Figura 8)[39].

[Type here]

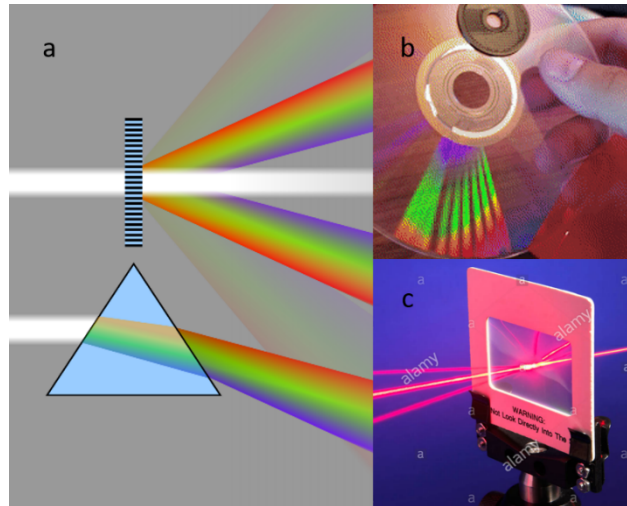


Figura 8. Elementos dispersivos. a) Esquema de una red de difracción (arriba) y un prisma (abajo). b) Difracción con un disco compacto. c) Red de difracción de transmisión.

Otros elementos ópticos son utilizados en la fabricación de estos dispositivos como pueden ser lentes colimadores, lentes de enfoque, espejos o lentes de corrección[40]. Dado el reducido tamaño del sensor CMOS (semiconductor complementario de óxido metálico) del celular, la alineación de la cámara con cualquier elemento óptico externo es una labor compleja y requiere de ajustes y calibraciones. Es por eso que cuantos menos elementos ópticos compongan un dispositivo asociado a un TI, más fácil resultará su ajuste.

1.1.2.2.1 Captura y procesamiento de imágenes.

Configuración de los dispositivos. Una vez que el dispositivo posee un elemento dispersivo, la luz descompuesta (espectro) es dirigida al sensor de la cámara del celular. El detector CMOS puede esquematizarse como una rejilla que divide la imagen en una gran cantidad de pixeles individuales (Figura 9). Los detectores comúnmente utilizados en TI no son sensibles a la región ultravioleta y poseen integrado un filtro para la región infrarroja[46]. Cuando el espectro descompuesto es capturado por el detector, la imagen puede ser fraccionada hasta un pixel individual[39].

[Type here]

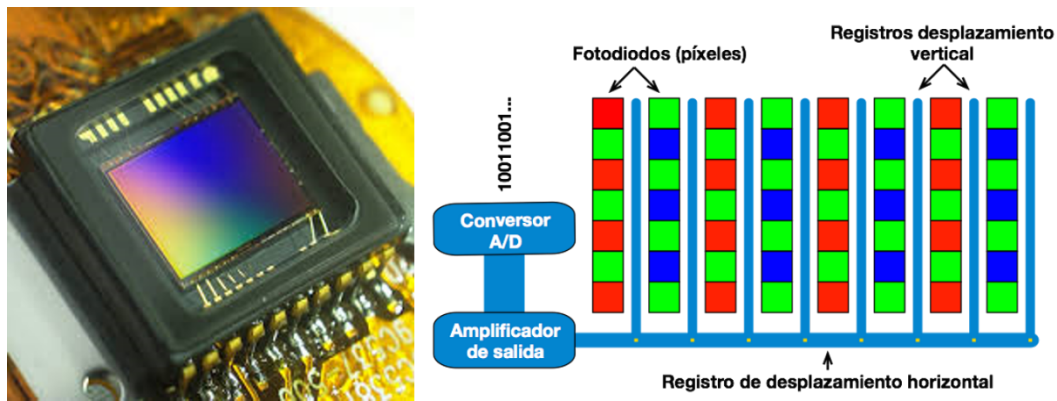


Figura 9. Imagen real y representación esquemática de un sensor CMOS.

Mediante el uso de software específico, integrando a lo ancho de la imagen, los valores de intensidad de cada píxel pueden ser procesados para trazar un espectro de intensidad de la emisión. En la literatura, se han descrito estos dispositivos de diferentes formas, pero todos ellos comparten la utilización de una red de difracción contigua al lente de la cámara[47]. En estos estudios los autores utilizan una fuente de luz colimada, que luego de atravesar la muestra es descompuesta y finalmente capturada en el detector de la cámara del celular[48].

Procesamiento y calibración. Una vez obtenida la imagen, esta deberá ser procesada para obtener un gráfico espectral de píxeles versus intensidad (Figura 10). La intensidad estará dada por alguna de las combinaciones de los componentes del espacio de color elegido para trabajar. Una vez calibrado el instrumento frente a una fuente de bandas espectrales conocidas será posible convertir la escala de píxeles a longitudes de onda (en nanómetros). La intensidad se procesa de la misma manera que en un espectrofotómetro tradicional, calculando la transmitancia y la absorbancia[39].

[Type here]

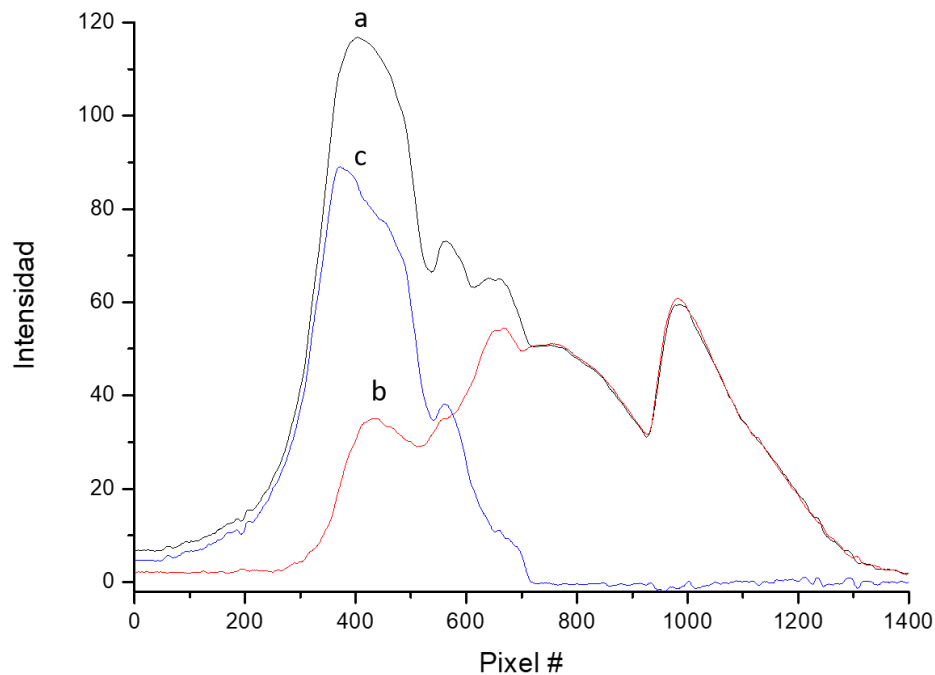


Figura 10. Espectros obtenidos mediante un espectrofotómetro creado para un teléfono inteligente. a) Espectro del blanco. b) Espectro de la tartrazina. c) Diferencia entre ambos espectros.

Si se dispone de una o varias fuentes discretas de luz de bandas conocidas (por ejemplo, un láser) puede calcularse la resolución teórica del sistema. Este valor es teórico dado a que el espectro obtenido no es absolutamente lineal ya que la luz descompuesta incide de manera oblicua sobre el detector[49].

El procesamiento de la imagen, necesario para generar un gráfico espectral de longitud de onda (λ) vs absorbancia (A), se suele realizar con un software de hojas de cálculo (Figura 10). Una vez calibrado el dispositivo es posible realizar determinaciones espectrofotométricas obteniendo los valores de transmitancia y absorbancia a diferentes longitudes de onda.

Software específico. El software más utilizado para procesar las imágenes es el ImageJ, el cual presenta múltiples funciones por ser de código abierto e ir evolucionando constantemente[50]. Este software permite seleccionar una o varias zonas de una imagen, llamadas regiones de interés (ROI por sus siglas en inglés). La selección de la ROI puede hacerse sobre una imagen individual o sobre un conjunto de ellas. Una vez seleccionada la región puede estudiarse individualmente cada canal de color, obteniendo valores promediados de la intensidad de color con su desviación estándar, mediana y moda. Existen diversas funciones aplicables a cada caso

[Type here]

particular, y en ocasiones es necesario desarrollar funciones de tipo macro (función programable), las cuales incluyen una serie de pasos individuales para ser aplicadas sucesivamente en diferentes imágenes[51].

Otra opción, útil en espectrometría es la posibilidad de crear gráficas de intensidad a lo largo de uno de los ejes de la imagen bidimensional. De esa manera es posible graficar un espectro solamente seleccionando la región de interés (*Figura 11*).

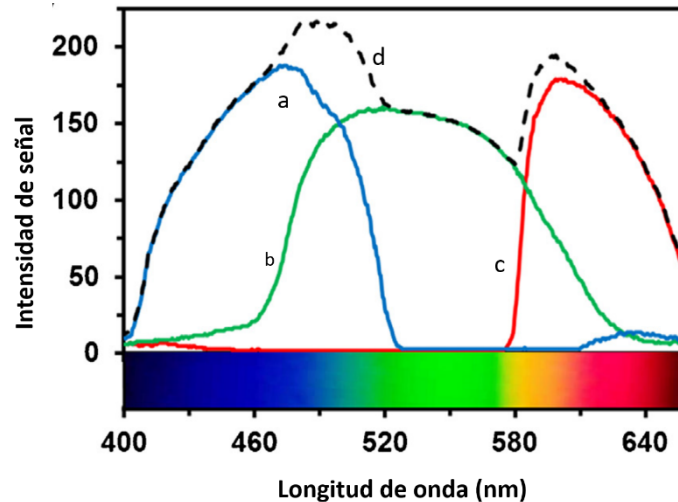


Figura 11. Detalle de la transformación del espectro obtenido de la imagen (inferior) en espectros (superior). a) señal del canal azul, b) señal del canal verde, c) señal del canal rojo, d) intensidad total. (de Oliveira et al.)

1.1.3 Fluorimetría con teléfonos inteligentes:

La fluorescencia molecular es la propiedad física mediante la cual una molécula emite luz de una longitud de onda específica luego de ser irradiado a una longitud de onda menor[52]. Esta emisión ocurre cuando un electrón es excitado por la absorción de un fotón desde su estado electrónico elemental hasta un estado vibracional más energético. Al colisionar entre sí, las moléculas favorecen el paso del mencionado electrón a un nivel electrónico excitado pero de menor energía, liberando parte de la energía absorbida inicialmente. Esta emisión puede ser detectada y cuantificada. La medición de la intensidad de fluorescencia (IF) permite la determinación de la presencia de fluoróforos así como su concentración[42]. Esta técnica tiene una amplia gama de aplicaciones[53].

Aunque la emisión de fluorescencia es una técnica óptica sensible, la realización de determinaciones en lugares alejados a los laboratorios es un desafío. Como antes se mencionó, es un proceso de emisión por lo que su medición se ve influenciada por cualquier otra fuente

[Type here]

de luz presente o luz parásita. En la medición de estos procesos es fundamental controlar las condiciones de captura de las imágenes para garantizar la calidad de los resultados[43].

En cuanto a la instrumentación, la forma clásica de medir la emisión de fluorescencia es colocar la fuente de iluminación y el detector en un ángulo de 90 grados con respecto a la cubeta. Las nuevas tecnologías de fabricación permiten el diseño y adaptación de la tecnología de TI para la medición de estos fenómenos. En este caso, los parámetros de sensibilidad de las cámaras digitales son de mucha utilidad, ya que las emisiones son de baja intensidad, por lo que aumentar la sensibilidad de la cámara digital facilita el proceso[54].

Esta mejora en la sensibilidad se logra modificando el valor de ISO (relación de la cantidad de luz requerida para obtener la misma exposición), y la velocidad de obturación (tiempo que permanece abierto el obturador) de la cámara. Modificando estos parámetros es posible configurar correctamente el TI para la captura imágenes. Cabe destacar que estos parámetros tienen su origen en cámaras fotográficas clásicas con componentes mecánicos, en los TI se recurre a modificaciones de software para ajustar los parámetros antes mencionados[19].

Como fuente de excitación se pueden utilizar una lámpara de xenón, tubos fluorescentes o LED ultravioletas, e incluso LED de luz visible pero cercana al ultravioleta[55]. En la actualidad, los LED ultravioleta presentan la dificultad de generar calor, lo cual hace necesario refrigerar el mismo. La opción más simple, económica y fiable son los LED con longitudes de onda cercanas al ultravioleta. Se ha reportado el uso de instrumentación sofisticada de laboratorio como microscopios de fluorescencia combinados con teléfonos celulares para la realización de determinaciones analíticas[56].

Además, se han publicado numerosos trabajos científicos utilizando fluorescencia con detección por imagen[53], en dispositivos basados en papel[57], e incluso estudios de atenuación de la fluorescencia de quantum dots[58].

1.1.3.1.1 Espectrofluorimetría con teléfonos inteligentes.

Para permitir determinaciones espectrofluorimétricas se han desarrollado tecnologías de bajo costo basados en la detección por imagen[59]. Además de los teléfonos inteligentes, se utilizan fuentes de luz como lámparas de arco de xenón, LED o diodos láser[60–63].

Las fuentes de radiación incorporadas son necesarias para desarrollar un fluorímetro totalmente portátil. En algunos casos, esto se ha solucionado parcialmente utilizando las

[Type here]

fuentes ópticas incorporadas como la pantalla del teléfono inteligente[64, 65], y en otras oportunidades se han utilizado fuentes LED de diversos tipos[66].

1.1.3.1.1.1 Espectrofluorimetría para smartphones.

Como fuente de radiación, las lámparas de xenón pueden ser reemplazadas por fotodiodos LED (del inglés, *Light Emitting Diode*)[61-67]. Los LED son compactos, pueden ser colocados muy cerca de la cubeta y generalmente entregan una emisión con una banda relativamente estrecha. Los LED no emiten en el infrarrojo por lo que no hacen falta introducir filtros adicionales[68]. En caso de requerir diferentes longitudes de onda de excitación se puede recurrir a diferentes tipos de LEDs.

Una vez que se generó la excitación de la muestra, la emisión será registrada en un ángulo de 90 grados con respecto a la fuente de excitación[53]. Antes de llegar al detector, se coloca un elemento dispersivo, el cual (al igual que en los espectrofotómetros) permite descomponer la luz proveniente de la muestra (*Figura 12*).

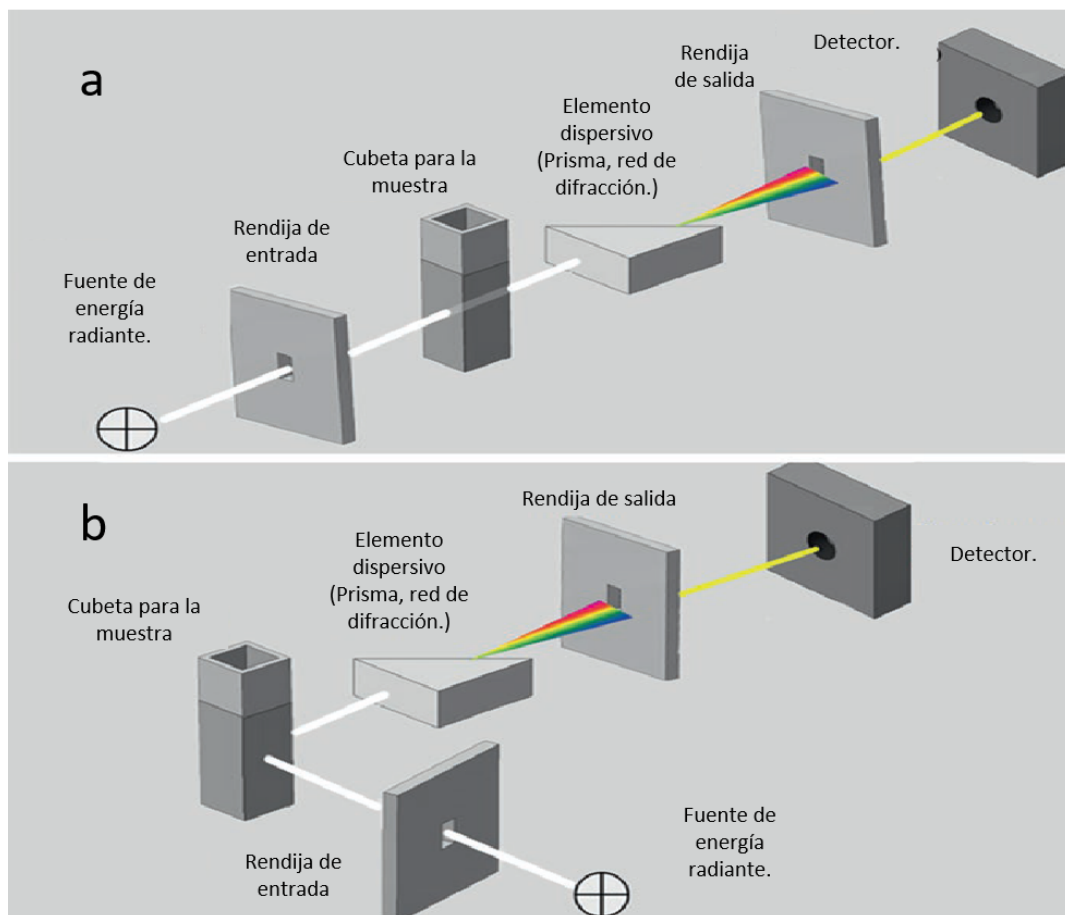


Figura 12. Configuración general de los dispositivos espectrométricos. a) Espectrometría de absorción. b) Espectrometría de emisión por fluorescencia.

[Type here]

1.1.3.1.2 Espectrofotometría "dual".

Todas las características anteriormente descritas hacen que sea posible acoplar más de un sistema de medición al mismo dispositivo[69].

Es posible realizar determinaciones colorimétricas y fluorimétricas con un espectrómetro de absorción y emisión "dual" combinado con un TI. En este caso la radiación incidente llegará a la muestra desde diferentes ángulos alternativamente. Así, existirá una fuente de radiación visible alineada a 180 grados del detector y otra fuente de radiación colocada en ángulo recto (Figura 13). Los LED de luz blanca tienen suficiente intensidad y amplitud espectral para adaptarse a una gran cantidad de aplicaciones. Para mediciones de fluorescencia los LED visibles (violetas o azules) y ultravioletas cumplen la función de fuentes de radiación[70].

Estas técnicas se acoplan para realizar instrumentos de espectroscopía múltiple ya que son las metodologías más utilizadas en determinaciones tanto químicas, biológicas, ambientales y clínicas[71].

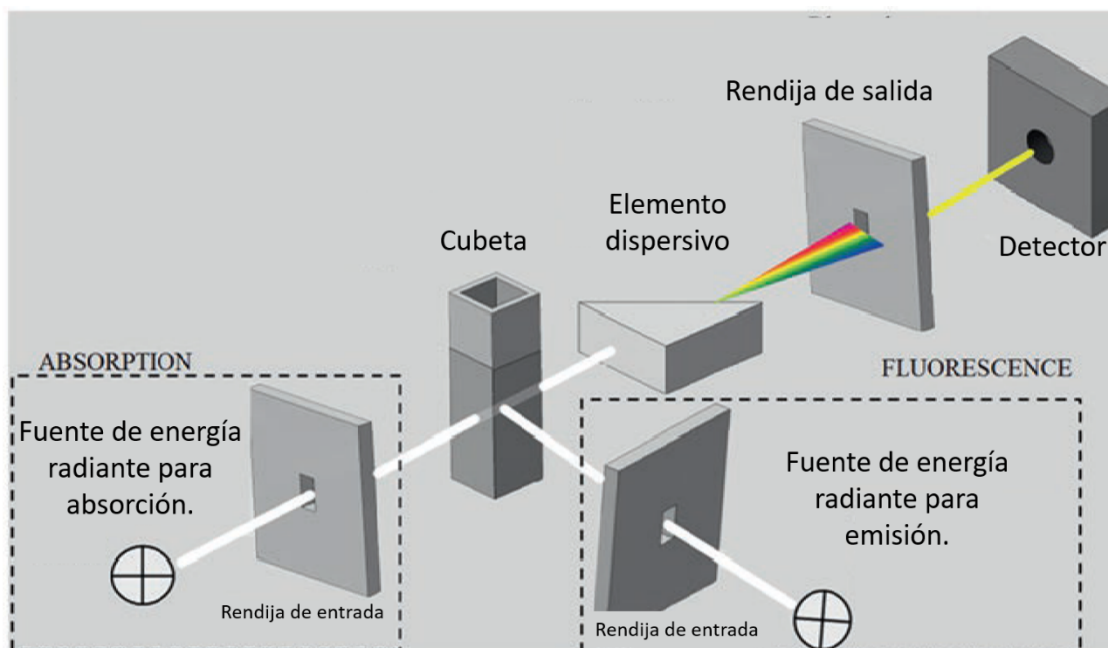


Figura 13. Esquema de un espectrómetro "dual" para absorción y emisión.

1.2 Diseño y fabricación en tres dimensiones.

La impresión en tres dimensiones (3D) es una técnica de fabricación mediante la cual se convierte un objeto tridimensional en formato digital a un objeto físico en tres dimensiones.

[Type here]

Este objeto es procesado para ser interpretado por la impresora y finalmente es creado por medio de alguna de las técnicas de impresión[72].

4.2.1.1

Actualmente, la fabricación de objetos tridimensionales se encuentra en un momento de gran desarrollo. Las técnicas más populares de impresión son la de fabricación aditiva de material fundido (FDM, del inglés fused deposition modeling), la de solidificación de resina fotosensible (SLA, del inglés Stereolithography) y finalmente la técnica de síntesis selectiva por láser (SLS, del inglés Selective Laser Sintering). Cada una de estas técnicas se basa en un concepto distinto de fabricación (Figura 14).



FDM. El material plástico se encuentra en forma de filamento, el cual es fundido en un cabezal a una temperatura cercana a los 200°C y es empujado hacia afuera por medio de un pico de un diámetro conocido. De esta manera, se realiza la impresión de una capa, luego el cabezal se desplaza hacia arriba y repite la acción, al acumularse capas una sobre la otra la pieza adquiere un volumen[73].



SLA. El material es una resina líquida fotosensible, en este caso la base de impresión se encontrará en la parte superior. Esta base de impresión estará sumergida en resina líquida dentro de un recipiente cuyo fondo tiene una ventana transparente a la luz ultravioleta. En este caso, en la pantalla que separa la luz ultravioleta de la resina se forma una imagen en negativo, luego se realiza el encendido de la luz, lo que genera el endurecimiento de la resina, así toda la capa se imprime a la vez. Luego la base se desplaza una fracción de milímetro hacia arriba y repite el proceso[74].

[Type here]



SLS. Un láser funde partículas de un material pulverizado y las deja solidificar sobre una superficie para luego generar la capa siguiente[74].

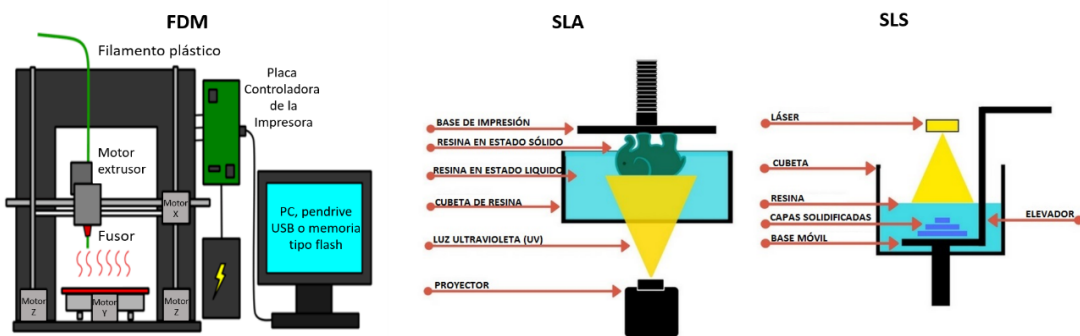


Figura 14. Esquema de funcionamiento de los diferentes tipos de impresión 3D.

1.2.1.2 Proceso de impresión

Inicialmente, el objeto debe estar digitalizado, el cual puede diseñarse con un software de dibujo asistido por computadora (por su nombre en inglés, CAD) o, utilizar un escáner 3D el cual registra tridimensionalmente un objeto y genera una copia digital[75].

Una vez que el modelo se encuentra en formato digital se debe realizar un proceso de laminado comúnmente denominado por el término inglés *slicing* (Figura 15), en el cual se delimitan digitalmente capas muy finas superpuestas, las cuales apiladas conformarán el volumen tridimensional de la pieza. Una vez realizado este proceso, se utiliza un software que adecúa toda esa información en un archivo en formato G-Code, el cual contiene las instrucciones para que la impresora realice la pieza. Dicho archivo suele introducirse a la impresora por medio de una memoria extraíble y desde el panel de mando de la impresora se inicia el trabajo[76].

[Type here]

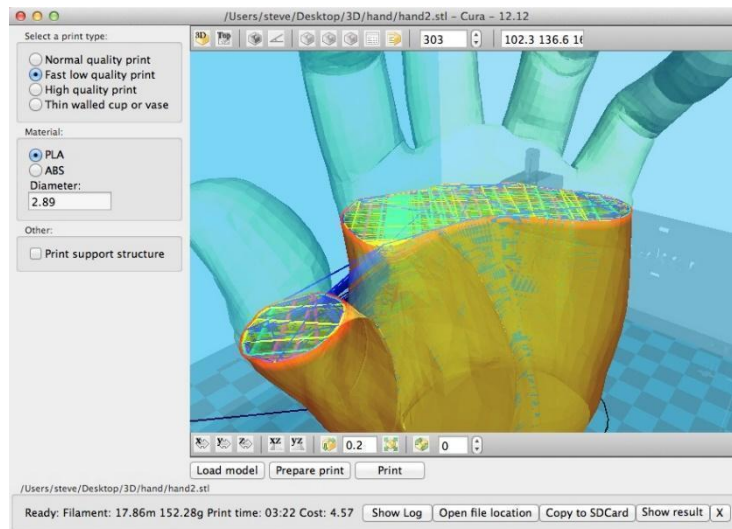


Figura 15. Detalle del proceso de laminado.

1.2.2 Diseño 3D

Para llevar a cabo el diseño de estos objetos se dispone de una variedad de programas informáticos de diferente grado de complejidad. Existen programas profesionales para el diseño industrial (AutoCAD), programas de uso libre de alta complejidad (LibreCAD), y por último, existen programas de uso relativamente sencillo mediante los cuales se pueden realizar modelos en tres dimensiones con facilidad (123D Autodesk)[75].

1.2.3 Utilización de la impresión 3D para la fabricación de dispositivos.

Los dispositivos creados en 3D para aplicaciones químicas pueden dividirse en tres grupos: aquellos dispositivos para ser utilizados en el pretratamiento de la muestra, en manipulación de fluidos y finalmente los diseñados para detección, monitoreo y separación de analitos (Figura 16).



Figura 16. División de los dispositivos impresos en 3D por su funcionalidad en química analítica.

[Type here]

- Dispositivos para pretratamiento de la muestra.

La mayoría de las muestras que poseen una relativa complejidad como matrices biológicas, ambientales o alimenticias, conllevan procesos de preparación previa[77]. Estos procesos tienen como finalidad adecuar la matriz, diluir para ajustar la muestra al rango dinámico de detección de un método, o preconcentrar un analito con la finalidad de alcanzar límites de detección más bajos[75]. Un ejemplo de ello es una separadora de plasma impresa en 3 dimensiones superhidrofóbica[78] o un separador de plasma sanguíneo ultrarrápido basado en microfluídos inerciales[79]. Los desafíos en éste área son llevar adelante una integración real entre el proceso de preconcentración y la detección, lo cual hasta el momento son procesos prácticamente independientes y separados.

- Dispositivos para la manipulación de fluidos.

Uno de los sistemas de control fluídico más conocido es la presurización neumática (bombas neumáticas) las cuales solo se encuentran en laboratorios y tienen costos elevados; lo mismo sucede con otros métodos para el control de flujos eléctricos y magnéticos[80]. Se ha reportado un juego de herramientas para accionar el fluido utilizando bombas de par o accionamiento rotativo con válvulas[16], donde todos los componentes se fabricaron utilizando una Impresora SLA. Otros autores desarrollaron equipos de bombeo para microfluídica impresos en 3D con diferentes materiales[81]. Además, se ha reportado la fabricación de dispositivos microfluídicos de estructuras complejas[82], e incluso estudios introduciendo válvulas de membrana en dispositivos 3D impresos en resina[70],[83].

- Dispositivos para separaciones y determinaciones.

Una de las disciplinas en las que más se ha utilizado esta tecnología es en microsistemas de análisis total (μ TAS), por ejemplo, en análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) mejorando su sensibilidad[84]. Además, utilizando una impresora en tres dimensiones fue posible desarrollar una técnica diagnóstica para malaria[85].

La impresión 3D ha facilitado procesos adaptando dispositivos analíticos a teléfonos celulares. Como anteriormente se ha mencionado, numerosos dispositivos para detección de resonancia plasmónica de superficie (SPR del inglés, Surface Plasmon Resonance), lectura de microcubetas

[Type here]

o lectores de fluorescencia fueron descritos[40, 86, 87]. Además, se han reportado un microscopio de fluorescencia[88] e incluso espectrofotómetros[12].

1.3 Dispositivos analíticos basados en papel

Los dispositivos microanalíticos basados en papel (llamados μ PADs por sus siglas en inglés) consisten en un pequeño trozo de papel estampado (simple o en capas) con capacidad para un pequeño volumen de muestra, en el cual es posible evidenciar y cuantificar cambios a partir de la presencia de un analito en un corto periodo de tiempo[89]. Durante la última década, numerosos trabajos se han publicado en este campo[90-91]. En general los dispositivos propuestos tienen canales microfluídicos creados al disponer materiales hidrofóbicos sobre papel hidrofílico[92-93]. Estos dispositivos han sido utilizados para muestras biológicas (por ejemplo lágrimas, orina, sangre, sudor o saliva)[94-95], alimentos[96-97] y analitos de importancia ambiental (metales, nutrientes, contaminantes orgánicos o microorganismos)[98-99].

El proceso implica absorber la muestra hacia la zona de detección bajo los efectos de la capilaridad sin la necesidad de una bomba externa[100-101]. La detección puede ser colorimétrica, electroquímica y/o fenómenos luminiscentes[89]. Los μ PADs representan una oportunidad para simplificar procesos analíticos, economizar análisis y llegar a regiones remotas con determinaciones de calidad[97,102].

Se pueden emplear diferentes tipos de papel en μ PADs dependiendo del método de fabricación utilizado y la matriz de la muestra, como papel de filtro, de cromatografía, satinado, vegetal, membrana de nitrocelulosa o papel de grafito[103-104]. El papel de filtro y el de cromatografía se encuentran entre los más utilizados debido a su espesor uniforme y un mayor tamaño de poro, lo que lleva a una mejor conducción del flujo[105-106].

En algunos casos las características originales de la fibra de celulosa se modifican para lograr un objetivo específico (cambiar la polaridad, aumentar la interacción electrostática o fijar nanopartículas)[107]. Para la fabricación de estos dispositivos se debe encontrar un equilibrio entre sus propiedades y las técnicas a utilizar para delimitar los canales. En el caso del papel de grafeno es utilizado para aplicaciones con detección electroquímica[108].

[Type here]

1.3.1.1 Técnicas de fabricación

Para fabricar μ PADs pueden utilizarse técnicas de modificación química o deposición física para alterar las características de la matriz de celulosa (Figura 17). En general, el tratamiento altera las propiedades de áreas específicas del papel creando líneas hidrofóbicas paralelas proporcionando canales para guiar el flujo de líquido a medida que penetra en el papel por capilaridad[109].

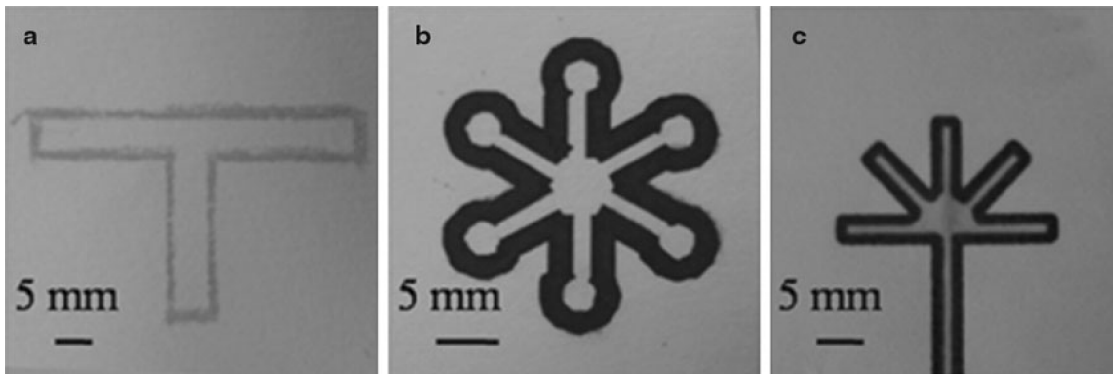


Figura 17. Diferentes técnicas utilizando cera. a) Fabricación utilizando lápices de cera. b) Dispositivo creado con una impresora de chorro de tinta modificada para inyectar cera. c) Impresión mediante una impresora de cera[110].

Los μ PADs se clasifican en bidimensionales (2D)[111],[112] o tridimensionales (3D)[113],[114], dependiendo de la dirección en la que fluye el líquido (Figura 18, a-e). Se han propuesto muchos métodos para fabricar μ PADs, entre ellos la litografía, Impresión 3d, impresión de cera, chorro de cera, mancha de cera, impresión por chorro de tinta, enmascaramiento de polidimetilsiloxano (PDMS), corte por láser, e incluso rotulador permanente[115],[116]. Además, se ha utilizado un plegado de papel de tipo "origami" (llamado así por el arte japonés de generar figuras plegando papel) eficiente y de bajo costo para la construcción de μ PADs[117],[118].

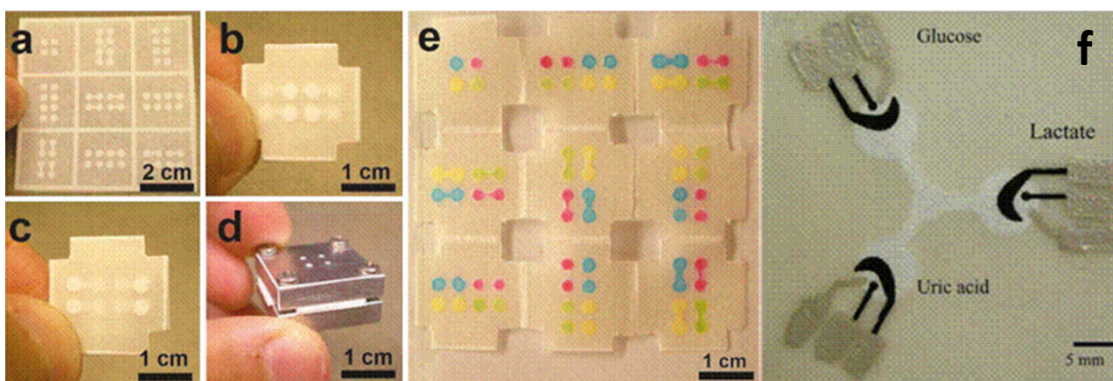


Figura 18. Diferentes tipos de dispositivos. μ PAD 3D creado por plegado donde se puede ver el papel modificado (a), su cara superior luego del plegado (b), la cara inferior (c), su contenedor metálico (d) y una vez utilizado con

[Type here]

colorantes para probar los canales creados (e). A la derecha (f) se presenta un μ PAD con electrodos impresos directamente sobre el papel[110].

1.3.1.2

1.3.1.3 Técnicas de detección

La mayoría de las investigaciones desarrolladas sobre μ PADs se han centrado en el diseño del chip microfluídico y no en el sistema de detección[95]. La detección colorimétrica es la técnica más utilizada para μ PADs la cual consiste en capturar el cambio de color de una zona particular del dispositivo luego del movimiento pasivo de la solución de analito por acción capilar hacia la zona de detección[119]. En estas técnicas los reactivos se colocan previamente en el dispositivo, y luego de reaccionar con el analito permiten evidenciar un cambio de color[120]. Las imágenes de los cambios de color son digitalizadas (a través de un escáner, cámara digital o teléfono celular), y posteriormente procesadas. Los límites de detección (LOD) obtenidos con estas técnicas son relativamente altos (niveles de parte por millón)[100].

Utilizar técnicas de fluorescencia y luminiscencia como métodos de detección permiten mejorar los LOD con respecto a la colorimetría[121]. Métodos de quimioluminiscencia[119] y electroquimioluminiscencia[122] han sido propuestos para la detección en μ PADs.

Las técnicas electroquímicas utilizadas en μ PADs (Figura 18f) incluyen voltametría cíclica, amperometría, coulometría y potenciometría[108]. Estos métodos tienen la ventaja de ser miniaturizables, lo cual los convierte en una excelente opción para los μ PAD. El límite de detección para tales métodos puede llegar a niveles femtomolares[119].

En la literatura también se ha descrito detección por espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear, espectrometría de Raman, espectroscopía en el infrarrojo cercano, etc.[123,124].

En conclusión, el análisis cuantitativo a través de μ PADs ha sido aplicado en muchos campos: pruebas diagnósticas[109], monitoreo ambiental[125] y seguridad alimentaria[126]. La idea de realizar múltiples ensayos en un único μ PAD es prometedora, porque este hecho puede enriquecer la información obtenida y minimizar sus falencias con respecto a otros métodos analíticos.

1.4 Laboratorio en un teléfono.

La combinación de técnicas y estrategias con la utilización de teléfonos inteligentes, imágenes digitales, impresión en tres dimensiones y dispositivos basados en papel permite arribar al

[Type here]

concepto de “un laboratorio en un teléfono”, mediante el cual, todos los procesos requeridos para la obtención de resultados puede realizarse de forma simple, portátil y económica[127].

Esta tecnología puede llegar a generar resultados impresionantes en cuanto a su impacto en la sociedad moderna, dotando a los usuarios de posibilidades hasta hace poco tiempo inimaginables.

[Type here]

2 Capítulo 2.

2.1 Objetivos.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral se ha basado en el diseño, desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías para la creación de dispositivos analíticos destinados a diferentes matrices (ambientales, alimentarias, etc.), buscando de esa manera simplificar, economizar y facilitar el acceso a la obtención de información analítica de calidad. En todos los casos se respetaron los principios de la química verde intentando minimizar las cantidades de reactivos y evitando la utilización o generación de productos químicos contaminantes o peligrosos para los operarios.

En el marco del objetivo general se desprenden seis objetivos particulares:

- (a) Utilización de técnicas de determinación por imagen basadas en tecnología de teléfonos celulares inteligentes.
- (b) Creación de dispositivos microfluídicos basados en papel para análisis de muestras reales.
- (c) Aplicación de tecnología de fabricación en tres dimensiones para la creación de instrumentación analítica.
- (d) Diseño de instrumentación analítica combinando tecnologías de teléfonos inteligentes e impresión 3D.
- (e) Desarrollo de instrumentos para espectroscopia basados en detección por imagen.
- (f) Aplicación de los dispositivos creados a muestras reales en diferentes matrices.

[Type here]

3 Capítulo 3

Dispositivo analítico microfluídico basado en papel (μ PAD) para la determinación simultánea de nitrito y fluoruro usando un teléfono inteligente.

Microchemical Journal 143 (2018) 467–473



Micropaper-based analytical device (μ PAD) for the simultaneous determination of nitrite and fluoride using a smartphone



Ezequiel Vidal, Anabela S. Lorenzetti, Adriana G. Lista*, Claudia E. Domini*

INQUISUR, Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur (UNS)-CONICET, Av. Alem 1253, 8000 Bahía Blanca, Argentina

ARTICLE INFO

Keywords
 μ PAD
Nitrite
Fluoride
RGB
Smartphone

ABSTRACT

The design, optimization and evaluation of a micro paper-based analytical device (μ PAD) for the simultaneous determination of fluoride and nitrite in real water samples was developed. In order to create hydrophilic and hydrophobic zones on the laboratory filter paper device, a wax ink printer was used. The μ PAD has four reaction zones for each analyte where the respective colorimetric reactions took place using the SPADNS method and Griess method for fluoride and nitrite respectively. A Smartphone was used to capture the corresponding images which were then converted to the RGB colour space by the software ImageJ using a personal computer. Under the optimal conditions, the linear range was 0.23–2.26 mg L⁻¹ for fluoride with limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of 0.13 mg L⁻¹ and 0.25 mg L⁻¹. The working range for nitrite was 0.05–10.0 mg L⁻¹ with LOD of 0.03 mg L⁻¹ and LOQ 0.13 mg L⁻¹. The μ PAD was used to determine the analytes in water samples obtaining satisfactory results in both cases. The validation of fluoride determination was performed comparing the μ PAD with the reference method and for nitrite determination, a recovery study was carried out. In both cases, the obtained results demonstrated a good agreement.

3.1 Resumen

Se diseñó, optimizó y la evaluó un micro dispositivo analítico basado en papel (μ PAD) para la determinación simultánea de fluoruro y nitrito en muestras de agua. Con el fin de crear zonas hidrofílicas e hidrofóbicas en el dispositivo de papel de filtro, se utilizó una impresora de tinta de cera. El μ PAD tiene cuatro zonas de reacción para cada analito, donde tuvieron lugar las reacciones colorimétricas respectivas utilizando los métodos SPADNS y Griess para fluoruro y nitrito respectivamente. Se usó un TI para capturar las imágenes que luego fueron convertidos al espacio de color RGB mediante el software ImageJ usando una computadora personal. Trabajando en condiciones óptimas, el rango lineal fue de 0,23–2,26 mgL⁻¹ para el fluoruro con un límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) de 0,13 mgL⁻¹ y 0,25 mgL⁻¹. El rango de concentraciones de trabajo para nitrito fue 0,05–10,0 mgL⁻¹ con LOD de 0,03 mgL⁻¹ y LOQ 0,13 mgL⁻¹. El μ PAD se utilizó para determinar dichos analitos en muestras de agua obteniendo resultados satisfactorios en ambos casos. La validación de la determinación de fluoruro fue realizado comparando el μ PAD con el método de referencia y para la

[Type here]

determinación de nitrito, se llevó a cabo un estudio de recuperación. En ambos casos, los resultados obtenidos demostraron una buena concordancia.

3.2 Introducción.

Debido al creciente impacto de la industria, el crecimiento de la población, la urbanización y muchas otras actividades humanas, la contaminación del agua se está convirtiendo en una preocupación para los seres humanos.

Dos de los contaminantes inorgánicos más comunes presentes en fuentes de agua son los nitritos (NO_2^-) y los fluoruros (F^-). El primero es ampliamente utilizado como aditivo, componente de fertilizantes a base de nitrógeno y conservantes de alimentos[128]. Los altos niveles de concentración de nitrito en el agua potable pueden desencadenar numerosas enfermedades humanas como la metahemoglobinemia[129,130] o el cáncer de estómago a través de formación de nitrosaminas. La Comisión Europea y el Código Alimentario Argentino han regulado el valor máximo para este ion en el agua potable en 0,5 y 0,1 mgL^{-1} , respectivamente[131,132], concentraciones por encima de estos valores indican contaminación. Por otra parte, el ion fluoruro es uno de los aniones más importantes debido a su papel en la prevención de la osteoporosis y las caries dentales[133]. Sin embargo, el exceso de ingesta de flúor, durante un largo período de tiempo, puede resultar en enfermedades graves como trastornos gástricos, renales y fluorosis[134,135]. El fluoruro se incorpora naturalmente en las fuentes de agua a través de meteorización y la disolución de rocas y suelo[136]. En argentina y otras regiones del mundo, hay zonas ricas en fluoruro las cuales afectan a millones de personas[137]. Según la Comisión Europea, el ion fluoruro (F^-) es perjudicial para la salud humana cuando su concentración en el agua potable es superior a 1,5 mgL^{-1} . Para el Código Alimentario Argentino los niveles se encuentran en el rango de 0,7 a 1,2 mgL^{-1} [131,138].

Algunos de los métodos más comunes desarrollados para determinar el nitrito en muestras de agua son las técnicas espectrofotométricas[139], [140], quimioluminiscentes[141,142], cromatográfica[143], espectrofluorimétricas[144,145], electroquimioluminiscentes[146] y electroquímicas[147],[148]. En el caso del fluoruro, se han utilizado en general técnicas no espectroscópicas, como el electrodo selectivo de iones de flúor[149] o cromatografía iónica[150]. Además, se han reportado otros métodos que incluyen la espectrofotometría UV-Vis[151], fluorimetría[152] y electroforesis capilar de zona[153].

Es necesario desarrollar métodos simples, de bajo costo, portátiles y fáciles de usar para el control de agua[119,154]. Los métodos que utilizan dispositivos analíticos basados en papel

[Type here]

(μ PAD) satisfacen estas características. Los μ PAD son dispositivos desarrollados con un sustrato de celulosa sobre el cual se crean barreras hidrofóbicas, generando canales hidrofílicos. Son esencialmente herramientas microfluídicas fabricadas con diferentes tipos y calidades de papel. Una amplia variedad de métodos como la fotolitografía[155], impresión con pantalla de polímeros[156], corte[157], grabado por inyección de tinta[158] e impresión con cera[159] han sido referidos para su fabricación. Los μ PAD ofrecen muchas ventajas ya que son plataformas simples y portátiles que requieren solo una gota de muestra para detectar diversos analitos como: proteínas, contaminantes ambientales, patógenos, productos químicos, metales pesados y drogas[160,161].

La detección en un μ PAD se puede realizar visualmente comparando la intensidad del color en cada zona de reacción. Para obtener información colorimétrica se pueden emplear diversos dispositivos como cámaras fotográficas[162,163], escáneres[164,165] y teléfonos inteligentes[166]. Al utilizar una aplicación de software adecuada, es posible obtener los parámetros de cualquier espacio de color de la imagen digital del μ PAD. Estos parámetros se pueden usar para correlacionar la intensidad del color con la concentración por medio de una curva de regresión. Por ejemplo, el espacio de color RGB aplicado a las imágenes digitales proporciona tres canales de información (rojo, verde y azul) que se pueden utilizar para generar una curva de calibración[167]. Otra de sus ventajas radica en que la imagen digital puede ser enviada luego de su captura y analizada en otras partes del mundo.

Hace muchos años, los métodos analíticos generalmente requerían gran cantidad reactivos y estos generaban residuos tóxicos. La tendencia actual es alcanzar los principios de la química verde[168] reduciendo volumen de reactivos, disminuyendo la cantidad de residuos, entre otros. Al usar solventes no tóxicos, materias primas biodegradables y poniendo énfasis en el análisis in situ, el “laboratorio sobre un papel”, se convierte en una opción interesante. En un futuro cercano es posible proyectar una química totalmente sostenible que genere el menor impacto negativo en el medio ambiente.

De acuerdo con la literatura sobre el tema, existen estudios sobre el uso de dispositivos basados en papel para la determinación de nitritos utilizando el mismo reactivo que el presente estudio[169,170]. Sin embargo, hasta el momento el empleo de un sistema para la detección simultánea de fluoruro y nitrito no ha sido informado.

El objetivo de este trabajo es el desarrollo de un nuevo dispositivo analítico basado en papel impreso con tinta de cera y compuesto por 8 zonas de reacción (4 para cada analito) y una región central para la muestra. El nuevo μ PAD fue utilizado para la determinación simultánea

[Type here]

de nitrito y fluoruro en muestras de aguas, empleando un teléfono móvil para la detección. Las determinaciones se realizaron utilizando los tradicionales reactivos SPADNS y Griess[171] para fluoruro y nitrito, respectivamente. El análisis de las cuatro réplicas de muestras de agua fue realizado en solo 12 min. Este nuevo μ PAD de bajo costo y fácil uso permitió una miniaturización del proceso analítico con ventajas en el monitoreo in situ y la portabilidad.

3.3 Parte experimental.

3.3.1 Reactivos y soluciones

Todas las soluciones fueron preparadas a partir de reactivos químicos de grado analítico y utilizando agua ultra pura (18.0 M Ω) provista por el sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, Estados Unidos). Las soluciones estándar de fluoruro de sodio y nitrito de sodio (Sigma, Buenos Aires, Argentina) se prepararon disolviendo una cantidad adecuada de la sal en agua. Estas soluciones se almacenaron a 2 °C hasta su uso. Soluciones de trabajo de fluoruro y nitrito fueron preparadas diariamente, diluyendo las soluciones estándar mencionadas anteriormente con agua ultra pura. Se prepararon soluciones de ácido fosfórico 5%, sulfanilamida 2% y N-(1-naftil) etilendiamina (NED) 0,2%, los reactivos fueron adquiridos de Sigma Aldrich Co. (Saint Louis, MO, EUA). El reactivo SPADNS ácido (4,5-dihidroxi-3-(p-sulfofenilazo)-2,7-naftaleno disulfónico, sal trisódica) se adquirió de Hach (EE. UU.). La tinta sólida para la impresora Xerox 8400 (negro, amarillo, magenta y cian) fue adquirida a Xerox argentina. El papel de filtro utilizado fue el CLT 597 Whatman S&S (Ref. 10311887, peso base 85 g/m²; espesor 190 μ m; retención 4–7 μ m).

3.3.2 Instrumentación

Los μ PAD fueron diseñados usando el software Inkscape de Free Software Foundation, Inc. Después de eso, se utilizó una impresora de tinta de cera Xerox Phaser 8400 para imprimirlos y un teléfono inteligente (Motorola Moto G5 Plus) fue seleccionado para capturar las fotos. Se utilizó el software libre ImageJ 1.50i para analizar los archivos de imagen. Un espectrofotómetro Agilent 8453 UV-visible, un electrodo selectivo de fluoruro (Van London Co.), el medidor de pH/ISE Orion 710A y la estufa de laboratorio San Jor SE60A fueron también utilizados.

[Type here]

3.3.3 Captura de imágenes

Para evaluar el cambio de color después de la reacción en el μ PAD, fue tomada una foto en formato JPEG con un teléfono inteligente. El dispositivo fue fotografiado bajo las siguientes condiciones optimizadas: ISO 64, velocidad de obturación 1/187, apertura $f / 1.7$ y distancia focal de 4.28 mm. El μ PAD se colocó sobre un cubo de madera (3 mm de espesor) de $14 \times 14 \times 30$ cm para aislarlo de la luz exterior y estandarizar las condiciones de iluminación. La caja fue pintada negro por dentro y se colocaron 16 diodos led en la parte inferior de la misma, en dos filas de 8 luces cada una (las filas estaban separadas por una distancia de 2 centímetros entre sí). La distancia lineal entre los focos en cada una de las dos filas era de 1 cm. Se realizó un orificio para la cámara en el centro de la cara superior para proporcionar una captura correcta del μ PAD, el teléfono inteligente se colocó encima de la caja. El μ PAD estaba ubicado a medio camino entre la base de la caja y la tapa sostenido por una base plástica (Figura 19).

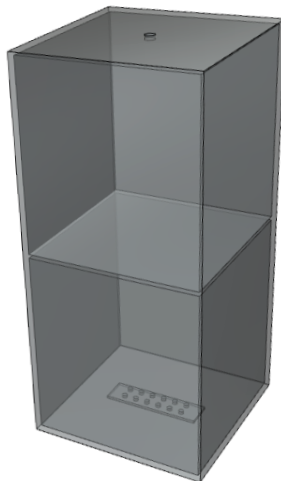


Figura 19. Esquema de la caja de iluminación utilizada para capturar las imágenes.

3.3.4 Procesamiento de la imagen

Para realizar la evaluación del color, se utilizó el espacio de color RGB. Usando el software ImageJ 1.50i. Posteriormente, las imágenes se procesaron para obtener los valores de los tres canales de color por separado. Una región de interés (ROI) circular única (2400 píxeles) fue seleccionada para cada zona de reacción y la distribución de los resultados de cada píxel se incluyó en un histograma (Figura 20). Los valores RGB obtenidos se utilizaron para realizar las curvas de calibrado. Para el caso del fluoruro, el parámetro G mostró una respuesta lineal a la

[Type here]

concentración. Por otro lado, en el caso del nitrito, la diferencia entre los canales G y B (G-B) fue evaluada como respuesta analítica.

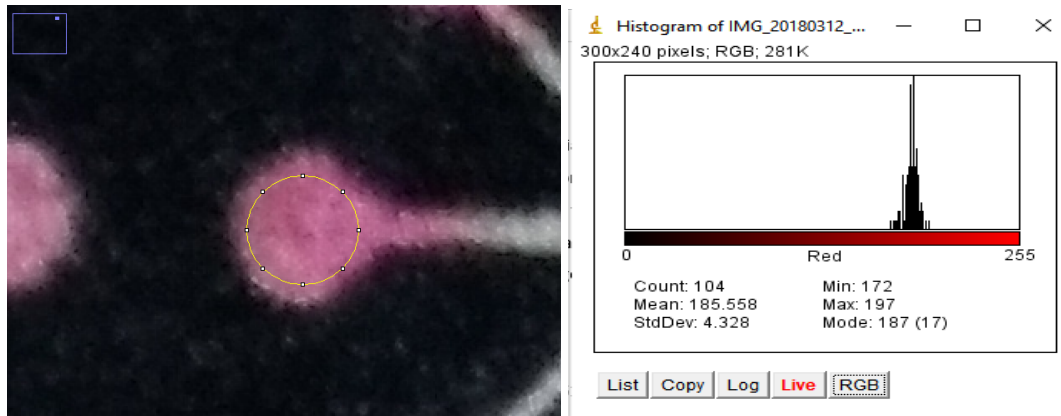


Figura 20. Imagen real de una región de interés (ROI) con detalle del histograma del canal rojo.

3.3.5 Muestras

Se analizaron seis muestras de diferentes sitios de muestreo: tres de Coronel Dorrego, provincia de Buenos Aires (agua subterránea (A), agua corriente (B) y agua corriente de red tratada con ósmosis inversa (C)), otras dos de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires (agua corriente (D) y agua filtrada (E)). La última fue tomada de Abramo (F), provincia de La Pampa. Todas las muestras fueron recolectadas en 2017. Las muestras de Coronel Dorrego fueron seleccionadas estratégicamente debido a su alto contenido de fluoruro.

3.3.6 Procedimiento

Las reacciones colorimétricas tradicionales de Griess para NO_2^- y SPADNS para F^- fueron seleccionados para este estudio. La Figura 21 muestra el dispositivo utilizado para llevar a cabo las determinaciones simultáneas. En primer lugar, se colocaron 0,5 μL de cada reactivo en las correspondientes áreas de reacción, seleccionando cuatro zonas para NO_2^- y las cuatro restantes para F^- . Luego, se introdujo una muestra de agua de 20 μL en el centro de la zona de muestreo. El líquido comenzó a fluir a lo largo de los canales hacia las áreas de reacción y después de dos minutos, la muestra completa alcanzó la zona donde estaban confinados los reactivos. Diez minutos después, las fotografías fueron tomadas con la cámara del TI (Figura 22) y enviadas a una computadora, primero para obtener los valores correspondientes para cada canal del espacio de color RGB, y luego para procesar los datos.

[Type here]

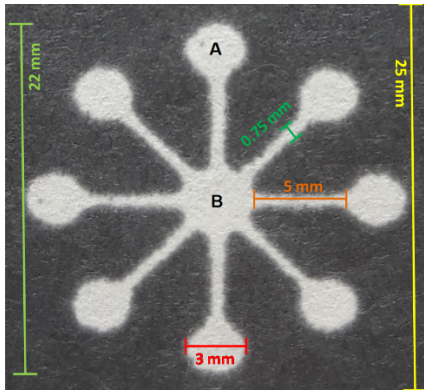


Figura 21. Fotografía real con el detalle de las dimensiones del μ PAD seleccionado. A: área de reacción, B: zona de muestra.

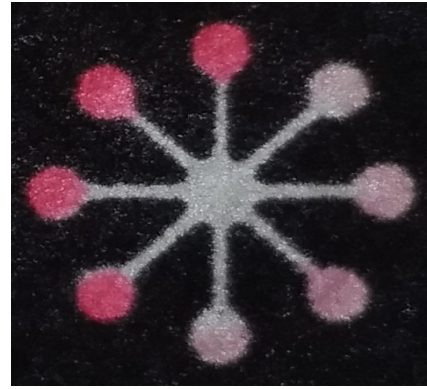


Figura 22. Foto real del dispositivo una vez terminada la reacción.

3.4 Resultados y discusión

3.4.1 Fabricación del μ PAD

- Diseño

Los μ PAD fueron diseñados usando el programa Inkscape e impresos en papel de filtro de laboratorio. Las áreas de reacción y muestreo de los μ PAD tienen la forma de un asterisco de ocho puntas y presentan cuatro zonas de reacción para cada analito. Se analizaron varios diseños para obtener el óptimo rendimiento microfluídico y la mejor iluminación para fotografiar. Los diferentes modelos probados se muestran en la Figura 23. El modelo seleccionado fue el "d", ya que mostró una distribución de la muestra más homogénea, tiempos de detección idénticos en todas las zonas de reacción y mayor número de determinaciones por centímetro cuadrado del dispositivo. Además, este modelo presentó la siembra de la muestra de una manera más sencilla. Por otro lado, como se pudo observar en la Figura 21, se seleccionaron las dimensiones de los canales hidrofílicos para el dispositivo. Se generaron así canales lo suficientemente anchos como para permitir un flujo apropiado sin aumentar el volumen de muestra y el tiempo de determinación. Las dimensiones de las zonas de reacción fueron adecuadas para contener los 0,5 μ L de reactivo requerido para las determinaciones. Por otro lado, el sector exterior del dispositivo se imprimió en negro para mejorar los parámetros de la captura fotográfica. Las dimensiones finales del μ PAD fueron 25 \times 25 mm con un área efectiva (hidrofílica) de 221 mm².

[Type here]

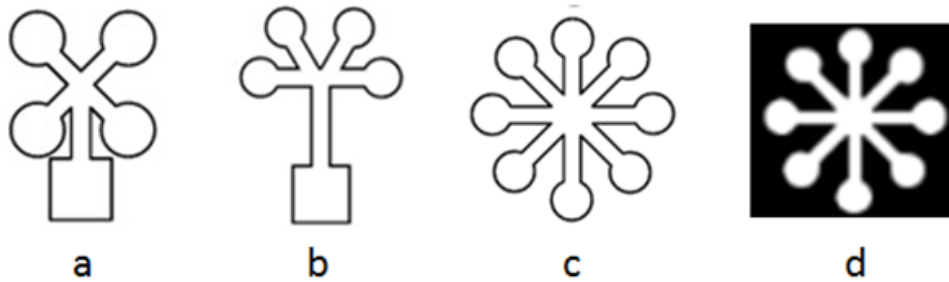


Figura 23. Diseños estudiados para el dispositivo.

- Selección del papel, impresión y fusión.

La selección del tipo de papel apropiado se realizó teniendo en cuenta la calidad del sustrato y la homogeneidad de los resultados. Se imprimieron dispositivos de varios tamaños y formas. Luego, se calentaron hasta que la cera fuese absorbida por el papel. Se realizaron pruebas con servilletas de cocina, pañuelos descartables, papel higiénico y de filtro sin evidencias de cristalización de la cera. El papel de filtro Whatman CLT 597 S&S mostró las mejores características en el proceso completo de fabricación y, al mismo tiempo, presentó buena repetibilidad en los resultados. Los μ PAD utilizados en todos los experimentos se obtuvieron con tinta de cera utilizando una impresora Xerox Phaser 8400 convencional (trabajando bajo las condiciones preestablecidas por el fabricante). Después, el papel impreso se calentó en una estufa de laboratorio durante 2 minutos (180°C) para permitir la penetración de la cera en las fibras de celulosa y generar barreras hidrofóbicas. Para el calentamiento del dispositivo se realizaron pruebas con estufas y placas calentadoras. Se seleccionó el uso de estufas dado que no aparecían en el papel signos de ennegrecimiento. Esto probablemente se deba a que en la estufa se aplica el calor de una manera homogénea. Para crear una barrera impermeable, se usó cinta adhesiva en la parte posterior del dispositivo y así evitar la permeación de líquidos.

3.5 Optimización

- Optimización de volúmenes de reactivos y muestras

Para evaluar la concentración óptima de reactivos a utilizar, se llevaron a cabo diferentes experimentos. Como se puede ver en la Figura 24, la condición óptima para la determinación de nitritos y fluoruros fue la concentración utilizada por los métodos de referencia. El volumen óptimo de reactivos a depositar en el área de reacción fue de $0,5 \mu\text{L}$. Volúmenes más bajos de reactivos fueron insuficientes para cubrir la zona de reacción, lo que condujo a una distribución irregular del color. Por el otro lado, mayores volúmenes causaron el avance del reactivo a través del canal de muestra lo que generaba reacciones fuera del área de detección.

[Type here]

20 μL de muestra fue el volumen óptimo para llenar un μPAD . Volúmenes bajos no cubrían totalmente las zonas de reacción y volúmenes mayores generaban que los productos coloreados se desplacen retrocediendo por los canales hidrofílicos.

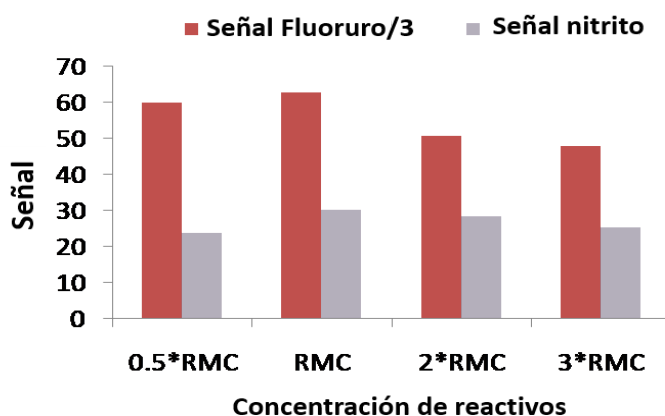


Figura 24. Optimización de la concentración de los reactivos. RMC: concentración del método de referencia

- *Optimización del tiempo de reacción*

Para conocer el momento más apropiado en el que capturar las imágenes, se realizó un estudio de intensidad de señal en función del tiempo. En el caso del fluoruro, dos minutos después del contacto entre el reactivo y la muestra, la señal se mantuvo constante. Para nitrito, el método de referencia establece que las mediciones espectrofotométricas deben realizarse entre 10 y 120 minutos después de agregar el reactivo de Griess. Cuando el estudio se realizó con el μPAD , el momento óptimo para tomar las fotografías fue de 10 minutos (Figura 25a). Es decir que el tiempo de reacción coincide con el método de referencia[171] (Figura 25b).

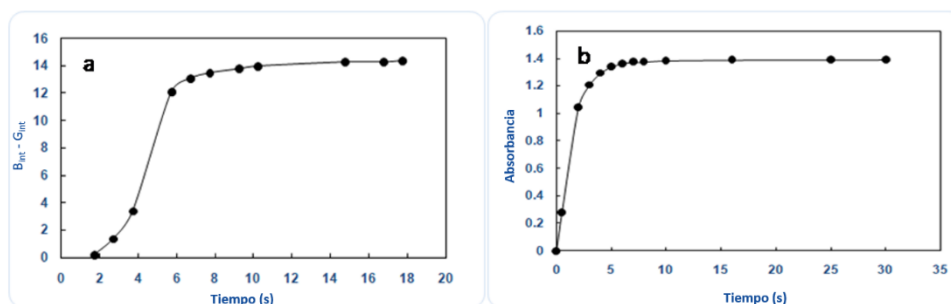


Figura 25. Optimización del tiempo de reacción par nitritos. a: μPAD propuesto; b: método de referencia (3,00 mg/L).

[Type here]

3.5.1 Cifras de mérito

Trabajando bajo condiciones optimizadas, se obtuvo una recta de calibración para fluoruro $G_{\text{int}} = (12,43 \pm 0,38) [F^-] + (38,52 \pm 0,52)$, en el rango lineal de 0,23 a 2,26 mgL^{-1} , presentando un coeficiente de determinación (R^2) de 0,996. El límite de detección (LOD) fue de 0,13 mgL^{-1} , y el límite de cuantificación (LOQ) fue de 0,25 mgL^{-1} , ambos calculados de acuerdo con IUPAC[172]. Se calcularon los valores de la desviación estándar relativa (% RSD) a partir de 8 mediciones independientes de cada muestra real. En términos de repetibilidad (intradía, es decir, el mismo μPAD) los valores obtenidos fueron inferiores al 3,8% y en términos de precisión intermedia (entre días, usando diferentes μPADs) no superaron el 6,3%.

En el caso de la determinación de nitrito, el rango de trabajo fue desde 0,05 a 10,0 mgL^{-1} y la curva de calibrado fue exponencial, tomando como señal analítica la diferencia entre el canal azul y el canal verde. Aplicando el logaritmo a la curva original, se obtiene un modelo lineal. La función correspondiente, después de aplicar la regresión fue $\log (B_{\text{int}} - G_{\text{int}}) = (0,53 \pm 0,01) \log [\text{NO}_2^-] + (0,82 \pm 0,01)$, con un coeficiente de determinación de 0,998. Los LOD y LOQ fueron 0,03 mgL^{-1} y 0,13 mgL^{-1} respectivamente, teniendo en cuenta la recomendación de IUPAC. El nitrito contenido en las muestras reales se determinó por el método de referencia, no obteniendo valores detectables. Por lo tanto, se realizó un estudio de recuperación, y las desviaciones estándar relativas (% RSD) se calcularon a partir de 8 repeticiones para cada muestra y cada nivel de concentración. Los valores fueron inferiores al 5,8% en términos de repetibilidad (intradía, mismo μPAD) y de 6,5% en términos de precisión intermedia (entre días, diferentes μPAD).

3.5.2 Análisis de muestras reales y validación

El μPAD se aplicó a seis muestras de agua de diferentes orígenes. Cuando se utilizó el método de referencia ninguna de ellas contenía valores de nitrito detectables, por lo que fueron fortificados en tres niveles de concentración. La determinación de fluoruro y nitrito se realizó en forma simultánea en muestras fortificadas con 3,00 mgL^{-1} . En la Tabla 1 se muestran los valores obtenidos en el μPAD y en el método de referencia[173] para la determinación de F. Para validar el método, se realizó una comparación entre el μPAD propuesto y el método de referencia utilizando la prueba t de muestras emparejadas. Previamente, se probó la homocedasticidad y el valor calculado ($t_{\text{calc}}=0,024$) fue menor que el valor tabulado ($t_{\text{tab}}=2,306$) con un nivel de confianza del 95%, lo que indica que no hubo diferencias estadísticas significativas entre ambos métodos. La validación de la determinación de nitrito se realizó haciendo el estudio de recuperación que se muestra en la Tabla 2. La recuperación y la

[Type here]

desviación estándar demostraron una buena precisión y repetibilidad cuando el dispositivo se aplicó a muestras reales. Los resultados obtenidos mostraron la idoneidad y fiabilidad del μ PAD propuesto para la determinación simultánea de fluoruro y nitrito en muestras de agua. Como se puede ver en la Tabla 3. Es importante destacar la novedad del uso de impresión de tinta de cera para la determinación de nitritos. Por otra parte, el dispositivo propuesto presenta las siguientes ventajas: el LOD obtenido es el más bajo en comparación con trabajos anteriores para el mismo analito, y se utilizó el mínimo volumen de reactivo reportado hasta la fecha[170].

Tabla 1. Comparación de métodos para la determinación de F ⁻ .		
Fluoruro		
Muestra	μ PAD	Método de referencia
	Encontrado*(DS)** [mg L ⁻¹]	Encontrado*(DS)** [mg L ⁻¹]
A	2.34 (0.39)	2.64 (0.03)
B	1.84 (0.10)	1.80 (0.01)
C	0.42 (0.06)	0.40 (0.01)
D	0.36 (0.08)	0.40 (0.01)
E	0.37 (0.07)	0.39 (0.01)
F	0.19 (0.16)	0.24 (0.01)

[Type here]

Tabla 2. Resultados del estudio de recuperación de nitrato.			
Nitrato			
Muestr a	Agregado [mg L ⁻¹]	Encontrado*(SD)** [mg L ⁻¹]	% Recuperación*
A	1.00	1.01 (0.03)	100.9
	3.00	2.88 (0.07)	96.1
	7.50	7.64 (0.13)	101.9
B	1.00	1.00 (0.03)	99.7
	3.00	2.92 (0.11)	97.3
	7.50	7.69 (0.26)	102.6
C	1.00	0.94 (0.03)	93.9
	3.00	3.06 (0.14)	101.9
	7.50	7.59 (0.14)	101.2
D	1.00	0.96 (0.04)	96.0
	3.00	2.98 (0.17)	99.5
	7.50	7.54 (0.27)	100.5
E	1.00	1.06 (0.06)	106.4
	3.00	3.10 (0.07)	103.4
	7.50	7.53 (0.19)	100.4
F	1.00	0.99 (0.05)	99.4
	3.00	3.18 (0.04)	106.1
	7.50	7.55 (0.17)	100.7

*Promedio de 8 réplicas
** Desviación estándar

[Type here]

[Type here]

Tabla 3. Comparación de métodos.

Muestras	Preparación de PAD	Reactivos	Detección	Características analíticas del μ PAD	Referencia
Aguas residuales (30 μ L)	Estampado 10:1 v/v (mezcla de tinta y solvente)	Reactivo de Griess modificado (Ácido cítrico) (3 μ L)	Teléfono Samsung Galaxy SII	Rango de trabajo: 4.0-85.0 mg L ⁻¹ LOD: 0.52 mg L ⁻¹ RSD: 0.51% at 4.0 mgL ⁻¹	[15]
Agua de estanque (1.40 μ L)	Fibra de tinta indeleble	Reactivo de Griess modificado (Ácido Cítrico)	Cámara-teléfono	Rango de trabajo: 0.156-1.25 mM RSD < 5%.	[104]
Saliva, agua preservante, jamón, salchicha y agua de río (50 μ L)	Estampado	Reactivo de Griess modificado (HCl) (0.75 μ L)	Scanner (Scanjet G4050)	Rango de trabajo: 0-25 μ M	[165]
Agua corriente (20 μ L)	Impresión de chorro de tinta	Reactivo de Griess (1 μ L)	Scanner plano (Canoscan Lide 700f)	Rango de trabajo: 10-150 μ M LOD 1.0 μ M RSD < 2.9% (n \leq 8)	[169]
Saliva artificial (5 μ L)	Fotolitografía. Mezcla de polimeros.	Reactivo de Griess modificado: (ácido cítrico) (0.5 μ L)	Scanner plano (Microtek Scanmaker 4800)	Rango de trabajo: 5 to 2,000 μ M. LOD: 5 μ M	[170]
Agua corriente (10 μ L)	Técnica de corte artesanal. Reactivo 3,6-bis(3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)-1,4-dihydro-1,2,4,5-tetrazine (DHBPTz) inmovilizado.	Ácido Cítrico (1 μ L) DHBPTz (1 μ L)	Cámara digital Canon PowerShot G12 y teléfono iPhone 4.0	Working range: 5–500 (μ M) LOD 1.30 μ M LOD 2.20 μ M RSD 3.5 (10 μ M) RSD 4.5 (100 μ M) RSD 4.7 (200 μ M)	[174]
Saliva (0.20 μ L)	Generador de efecto corona. OTS–hexano	Reactivo de Griess (5 μ L)	Scanner Epson Perfection V300 Photo desktop	Rango de trabajo: 20-160 μ M LOD: 7.8 μ M SD: 5.1 μ M	[175]
Orina humana sintética (2/3.5 μ L)	μ TAD	Reactivo de Griess modificado (Ácido cítrico) (2 / 4.5 μ L)	Regla y teléfono iPhone 5	Rango de trabajo: 0–1000 M	[176]
Agua de perforación y	Impresión con tinta de cera	Reactivo de Griess (0.5 μ L)	Teléfono Motorola Moto G5 Plus	Rango de trabajo: 0.05 – 10.0 mgL ⁻¹ LOD: 0.03 mgL ⁻¹	Este trabajo.

[Type here]

agua corriente de red (20 µL)					
----------------------------------	--	--	--	--	--

3.6 Conclusiones

Se desarrolló un μ PAD simple, portátil, económico (menos de U \$ D 0,01 por dispositivo) y fácil de usar para la determinación simultánea de fluoruro y nitrito en muestras de agua. Es de suma importancia mencionar que este es el primer μ PAD desarrollado para la determinación de fluoruro. Este nuevo dispositivo combina las ventajas de utilizar materiales biodegradables, así como volúmenes mínimos de muestra y reactivos. De esta manera el procedimiento analítico se miniaturizó y el pretratamiento de la muestra, como paso previo a la detección, no fue necesario. El dispositivo fue aplicado con éxito para la determinación de ambos analitos en muestras de diferentes orígenes con límites de detección más bajos que los valores recomendados por la Comisión Europea y por el Código Alimentario Argentino. Estos resultados no solo demuestran la aplicabilidad y los beneficios de esta herramienta analítica, sino también su versatilidad en un amplio campo de aplicación.

[Type here]

4 Capítulo 4

Nuevo dispositivo impreso en 3D, económico y simple para determinaciones nefelométricas y fluorimétricas basadas en la detección mediante teléfonos inteligentes.

RSC Advances



PAPER

[View Article Online](#)
[View Journal](#) | [View Issue](#)



Cite this: *RSC Adv.*, 2020, **10**, 19713

New, inexpensive and simple 3D printable device for nephelometric and fluorimetric determination based on smartphone sensing †

Ezequiel Vidal, ^{†*} Anabela S. Lorenzetti, ^{†*} Miguel Ángel Aguirre, ^b Antonio Canals^b and Claudia E. Domini ^{*a}

A new, inexpensive and easy to use 3D printable device was developed for nephelometric and fluorimetric determination. Its applicability was tested for the quantification of quinine in tonic drinks and sulfate in natural water with good analytical accuracy. In this way, sulfate determination was carried out by nephelometry using a red LED, while quinine was determined using a blue LED by fluorimetry. A smartphone camera was used to take the pictures and afterwards transform them into the RGB color space using the software ImageJ by a personal computer. The linear range was 2.0–50.0 mg L⁻¹ for sulfate with a LOD of 0.13 mg L⁻¹, and the corresponding quantification limit (LOQ) was 0.43 mg L⁻¹. The linear range for quinine was from 0.42 to 3.10 mg L⁻¹. The LOD and LOQ were 0.11 mg L⁻¹ and 0.38 mg L⁻¹, respectively.

Received 2nd April 2020

Accepted 12th May 2020

DOI: 10.1039/d0ra02975k

rsc.li/rsc-advances

Resumen

Se desarrolló un dispositivo novedoso impreso en 3D, económico y fácil de usar para determinaciones nefelométricas y fluorimétricas. Se aplicó en la cuantificación de quinina en bebidas tónicas y de sulfato en muestras de agua potable. De esta manera, la determinación de sulfato se realizó por nefelometría usando un LED rojo, mientras que la quinina se determinó usando un LED azul por fluorimetría. Se usó la cámara de un TI para tomar las fotografías, luego se las procesó usando el software ImageJ con una computadora. El rango lineal fue de 2,0 a 50,0 mgL⁻¹ para sulfato con un LOD de 0,13 mgL⁻¹, el LOQ fue de 0,43 mgL⁻¹. El rango lineal para la quinina fue de 0,42 a 3,10 mgL⁻¹, el LOD y LOQ fueron 0,11 mgL⁻¹ y 0,38 mgL⁻¹, respectivamente.

[Type here]

4.1 Introducción

Una gran parte de los análisis de laboratorios de baja complejidad son realizados utilizando determinaciones colorimétricas. Se han realizado esfuerzos por simplificar este tipo de análisis pero solamente resuelven problemas específicos, y no están adaptados al equipamiento de laboratorio tradicional[177–180]. En los últimos años, muchos sensores químicos basados en la detección de imágenes con cámaras digitales o TI se han realizados, con la ventaja de que el uso de celulares se ha generalizado[181]. En este tipo de sensores es de suma importancia verificar y estandarizar la iluminación y la captura de la imagen para obtener resultados reproducibles[14]. Se han desarrollado una amplia variedad de dispositivos de varias formas y tamaños: desde cajas con iluminación externa[182] hasta sistemas sofisticados acoplados al teléfono a través de interfaces de computadora[183]. Por otro lado, considerando que los países en desarrollo no tienen suficientes recursos económicos para comprar instrumentación adecuada, las nuevas tecnologías, inteligentes y simples, ofrecen un amplio potencial para proporcionar una solución en el control de la calidad del agua y de los alimentos.

El ion sulfato es un constituyente común en las aguas de consumo, una concentración elevada en el agua potable puede causar enfermedades gastrointestinales en los niños[184]. La Directiva 98/83/CE10 del Consejo Europeo establece una tolerancia de 250 mgL^{-1} , siendo las técnicas más utilizadas para su determinación la gravimétrica, nefelométrica[173], potenciométrica[185], espectrofotométrica[186], y volumétrica.

La quinina es usada en la industria de bebidas, en aguas tónicas y ginger ale. Este alcaloide tiene una variedad de beneficios terapéuticos, como analgésico, antipirético y antipalúdico. Sin embargo, concentraciones excesivamente altas en sangre de este compuesto pueden causar varios trastornos de salud[187]. Se ha desarrollado una amplia variedad de técnicas para su determinación, como lo son la HPLC con detección fluorimétrica[188], electroforesis capilar con detección UV[189], fluorimetría[190], quimioluminiscencia[191], AAS[192], LC-MS[193] y detección electroquímica[194]. Por lo expuesto, las mediciones fluorimétricas y nefelométricas son técnicas muy comunes en el análisis de aguas y bebidas. Sin embargo, nunca se han descrito dispositivos versátiles que brinden la capacidad de utilizar ambas técnicas.

En este trabajo, presentamos un dispositivo económico, portátil y fácil de usar para determinar el sulfato en el agua potable mediante técnicas nefelométricas y la quinina en las bebidas comerciales por fluorescencia. La determinación de sulfato se realizó mediante un método nefelométrico con un LED rojo como fuente de luz, mientras que la quinina se determinó por fluorimetría utilizando un LED azul, ambos con el dispositivo creado. Los resultados se compararon con los obtenidos por los métodos de referencia, lo que demuestra que el

[Type here]

dispositivo propuesto es efectivo en la determinación de ambos analitos en muestras reales de una manera rápida y sencilla.

4.2 Experimental

4.2.1 Reactivos y soluciones

Se usaron productos químicos de grado analítico para preparar todas las soluciones. El agua desionizada (AD) se obtuvo de un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EE. UU) (18.0 M Ω .cm). Se prepararon soluciones estándar de sulfato de quinina y sulfato de sodio (Merck Darmstadt, Alemania) disolviendo la cantidad apropiada de reactivo sólido en agua AD, para obtener concentraciones de 50 mgL⁻¹ y 100 mgL⁻¹, respectivamente. Estas soluciones se mantuvieron a 2°C hasta su uso. Las soluciones estándar de sulfato de sodio y sulfato de quinina se prepararon cada día diluyendo las soluciones madre. Se utilizó H₂SO₄ (1 M), NaCl, BaCl₂, etanol y glicerina los cuales fueron adquiridos en Merck (Darmstadt, Alemania).

La solución de acondicionamiento para la determinación de sulfatos se preparó mezclando 50,0 mL de agua; 25,00 g de NaCl; 10,00 mL de HCl concentrado al 37% m/m (Merck, Darmstadt, Alemania); 33,0 mL de etanol; 16,7 mL de glicerina y finalmente añadiendo agua AD a 100,0 mL.

4.2.2 Instrumentación

El dispositivo impreso en 3D fue diseñado utilizando el software Autodesk de TinkerCAD (San Rafael, California, EE. UU.). Luego, se utilizó una impresora 3D Creality CR-10 (Creality 3D Technology, China), empleando como sustrato un filamento de impresión PLA+ de 1.75 mm para impresión de alta calidad. Una vez impreso, se obtuvo un dispositivo negro opaco y rígido.

El dispositivo estaba equipado con un LED rojo intercambiable (620 nm, 0,06 w, 5 mm, HLMP-EH31-SV000, Hewlett-Packard, Avago Technologies Ltd., Singapur, Singapur) o un LED azul (465 nm, 0,1 w, 8 mm, Patagoniatec, Buenos Aires, Argentina) usados para la determinación de sulfato y quinina, respectivamente. Se empleó un teléfono inteligente Motorola Moto G5Plus equipado con una cámara de 12 MPixel para capturar las fotos, y se utilizó el software gratuito ImageJ 1.50i para analizarlas.

Se utilizaron un espectrofotómetro Agilent 8453 (equipado con un detector de arreglo de diodos) y un espectrofluorímetro JASCO FP-6500 (con lámpara de xenón) para los estudios de validación. Los espectros de absorción UV-vis se registraron a 450 nm y las medidas de fluorescencia fueron registradas a $\lambda_{\text{excitación}} = 350 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 450 \text{ nm}$.

[Type here]

4.2.3 Captura de imagen.

Se tomaron fotos JPEG con el TI con el fin de evaluar los cambios de color después de las reacciones químicas. Las condiciones seleccionadas para la captura fueron: ISO 400, velocidad de obturación 1/3 s, valor de apertura f/1,53 y longitud focal de 4,3 mm en el caso de sulfato, y en el caso de la quinina, ISO 800, velocidad de obturación 1/3 s, valor de apertura f/1,7 y longitud focal de 4,3 mm. En ambos casos, el foco de la cámara se configuró manualmente en modo infinito.

El dispositivo de captura impreso en 3D (Figura 26) se acopló al TI mediante un soporte, unido a la funda protectora del teléfono, fijando así la distancia desde la cubeta hasta la lente de la cámara. Una vez que la cubeta es colocada en su sitio, se enciende la luz de la fuente y se fijan los parámetros de configuración de la cámara hasta completar la determinación.

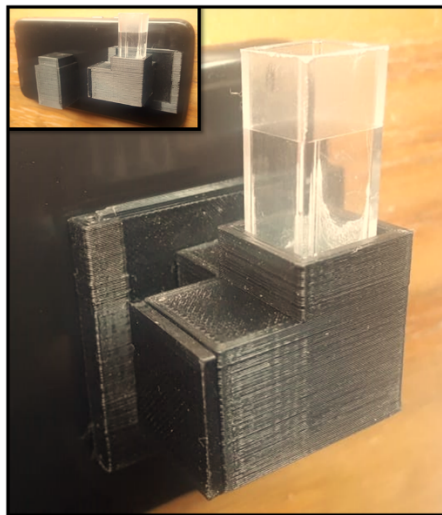


Figura 26. Fotografía real del dispositivo propuesto.

4.2.4 Procesamiento de imágenes

Los archivos JPEG se procesaron para obtener los histogramas de los tres canales RGB utilizando el software ImageJ 1.50i. Se usó una única región rectangular de interés (ROI) de 10000 píxeles en cada imagen.

La ROI se posicionó buscando una zona homogénea de intensidad con la mínima desviación estándar (valor proporcionado por el software ImageJ). Se escogió una ROI dentro de la zona coloreada de las imágenes, de esa manera, se eliminó el fondo negro y el efecto de gradiente a lo largo de la región iluminada (Figura 27). Una función *Macro* se creó con la opción *Macro Edit* del software. En primer lugar, se abrió una imagen como ejemplo de la determinación, el color de la imagen se dividió en tres canales diferentes (R, G y B), y luego, se ejecutó la función

[Type here]

analizar histograma con la que se obtienen tanto el gráfico como los valores del histograma (mediana, media, moda y desvío estándar). La función Macro fue finalmente grabada.

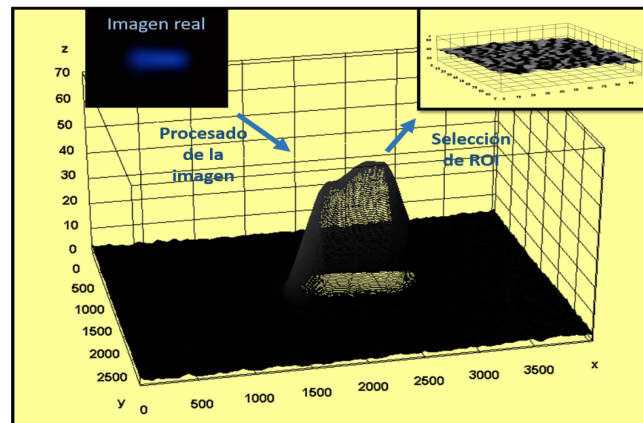


Figura 27. Proceso de selección de una región de interés homogénea.

Cada imagen se analizó por separado con la función *Macro* creada (Figura 28). El valor máximo del histograma se seleccionó como señal analítica. La selección automática de la ROI permite comparar las diferentes fotografías asegurando que las variaciones se deban solamente a diferencias en la concentración.

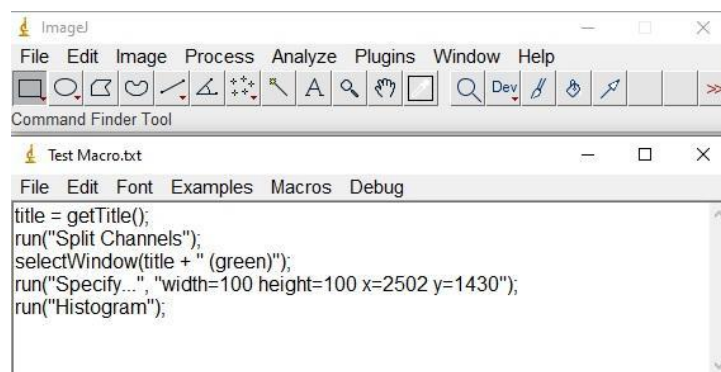


Figura 28. Captura de pantalla de la función Macro creada.

4.2.5 Muestras

Para la determinación del sulfato, se analizaron cinco muestras agua de diferentes orígenes: surgente natural (A), arroyo Napostá (B), perforación de Bahía Blanca (C), agua potable de las localidades San Miguel Arcángel (D) y Coronel Suárez (E) (Figura 29).

En el caso de la determinación de quinina, se adquirieron cinco bebidas tónicas (F, G, H, I y J) en supermercados de Bahía Blanca. Las muestras de gaseosas, se desgasificaron previamente, utilizando un baño ultrasónico (TESTLAB modelo TB 04 TA, 160 W de potencia ultrasónica, frecuencia de 40 kHz).

[Type here]

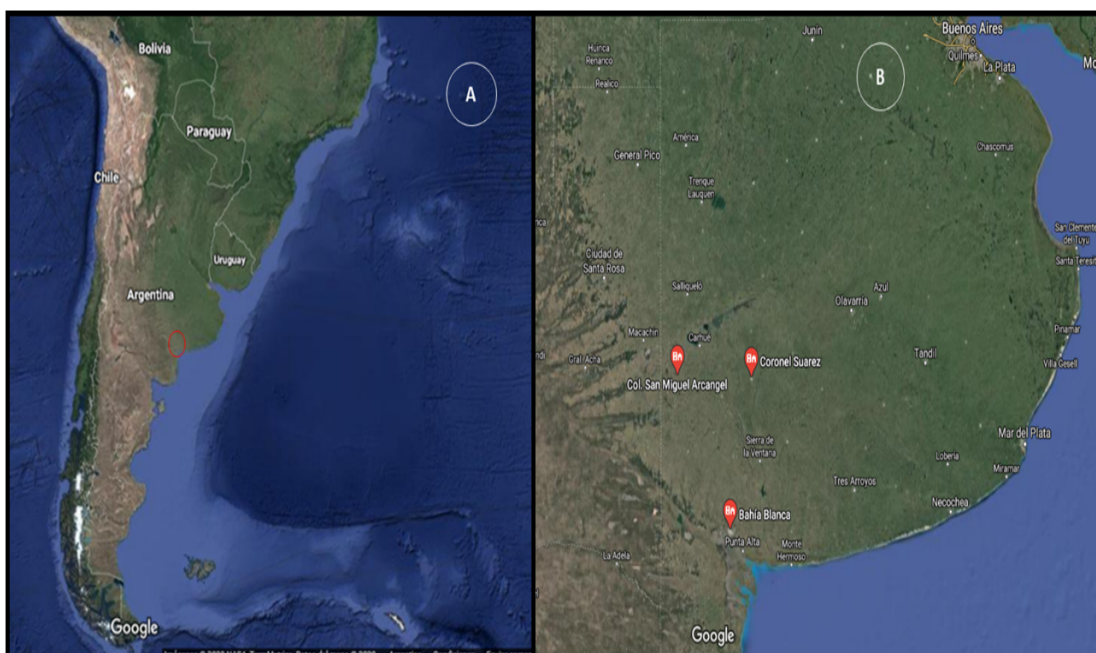


Figura 29. Ubicación del área de estudio: Bahía Blanca, Coronel Suárez y San Miguel Arcángel (Buenos Aires, Argentina).

4.2.6 Procedimiento

Para el estudio de validación se emplearon los métodos de referencia nefelométricos[173] y fluorimétricos[195], para sulfato y quinina, respectivamente. Los reactivos utilizados en los métodos de referencia y en el método propuesto fueron los mismos.

Para la determinación de sulfato, una alícuota de 10,00 mL de muestra se colocó en un matraz volumétrico de 25.00 ml donde se agregaron 1,0 ml de solución de acondicionamiento y 5,0 ml de solución de BaCl_2 al 5%. Cinco minutos después, la solución se volvió turbia y de color blanco pálido. En primer lugar, se midió un blanco sin reactivos para evitar interferencias de otro origen. La muestra pretratada se colocó en una cubeta de 1 cm de espesor y ésta en el dispositivo de captura. Se encendió el LED rojo, se configuró la cámara, se capturaron las imágenes y se enviaron a la computadora para su análisis.

En el caso de la quinina, se colocaron 2,5 ml de H_2SO_4 1 M en un matraz volumétrico de 25,00 ml en el cual se añadieron 500 μl de muestra y se llevó a volumen con agua. En este caso, no fue necesario esperar el tiempo de reacción. La muestra acondicionada se colocó en una cubeta de cuarzo con un paso óptico de 10 mm y se colocó en el dispositivo de captura. El LED azul se encendió y las imágenes fueron capturadas y enviadas a la computadora para su procesamiento.

[Type here]

4.2.7 Análisis estadístico de datos.

Cada parámetro de las curvas de calibración se calculó utilizando Microsoft Office Excel® 2010 (Microsoft, Redmond, WA, EE. UU.). Se realizaron cálculos estadísticos adicionales utilizando MATLAB®, versión 6.5 (The Mathworks, Natick, MA, EE. UU.).

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Diseño y fabricación del dispositivo

El dispositivo se imprimió en color negro (Figura 26) para evitar la filtración de luz de fuentes externas durante la captura de imágenes. La Figura 30 muestra de manera detallada las dimensiones reales del dispositivo y sus estructuras internas.

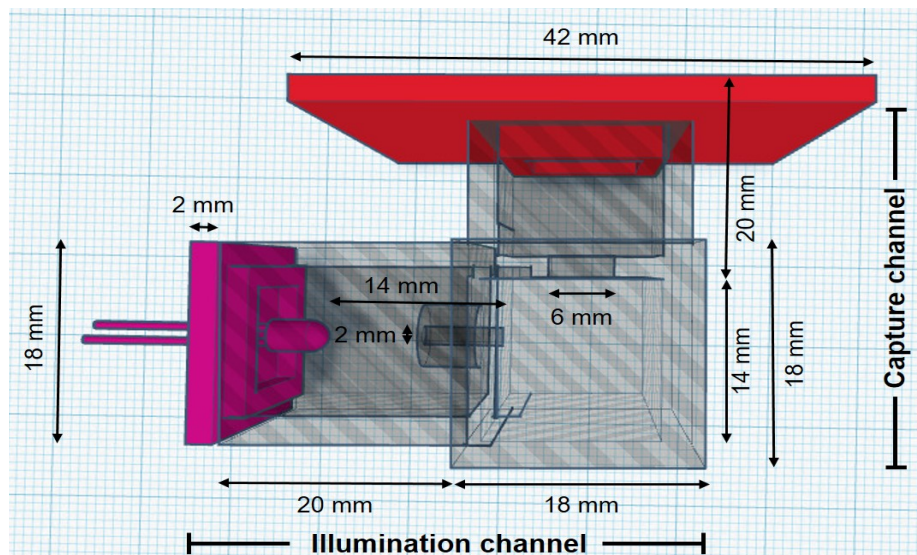


Figura 30. Dimensiones reales del dispositivo y detalle de las estructuras interiores.

Para ajustar el dispositivo al teléfono inteligente, se usó una carcasa de plástico negra (Figura 31) con un soporte deslizante fijado a ella (Figura 31c). Este soporte permitió cambiar fácilmente las diferentes configuraciones de dispositivos. Además, se construyó una corredera móvil (Figura 31g) para acoplar al soporte.

Se introdujo una cubeta de cuarzo (Figura 31e) dentro del portacubeta (Figura 31b) del dispositivo que posee una ventana cuadrada de 6 mm frente a la lente de la cámara. De este modo, solo se podía fotografiar el área central de la cubeta. En un ángulo de 90 grados, estaba el canal de 2 mm a través del cual entraba la luz evitando dejar ingresar luz dispersa del LED. El diodo LED estaba unido a una tapa ajustada por presión al final del canal (Figura 31f). El diodo

[Type here]

se conectó por medio de pinzas de cocodrilo al cable micro USB del teléfono inteligente. Para capturar las imágenes, fue necesario colocar una tapa oscura sobre la cubeta como se muestra en la Figura 31a y Figura 31d.

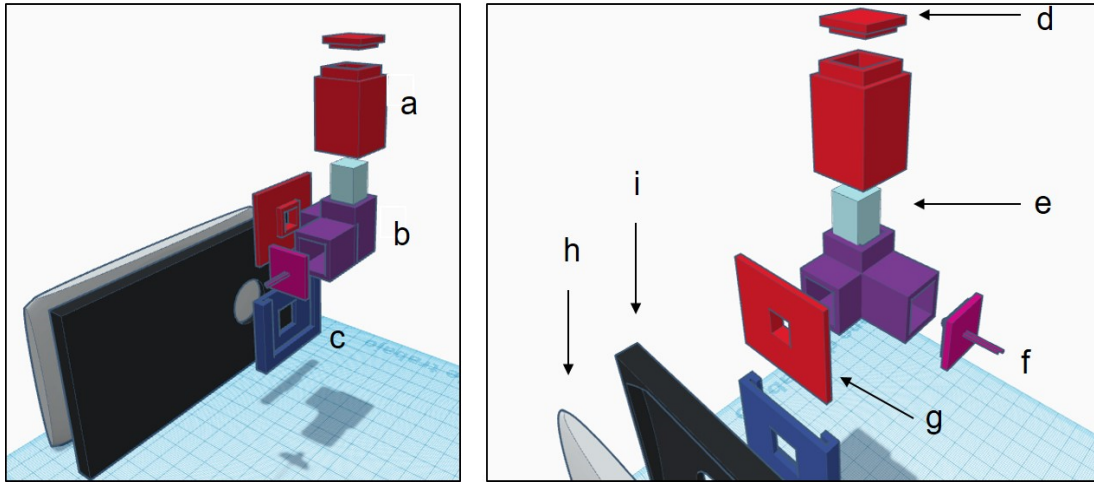


Figura 31. Desglose de las piezas que componen el dispositivo.

4.3.2 Optimización

Se analizaron diferentes opciones de color de diodos LED para la iluminación en la determinación de ambos analitos. Se probaron diodos de color azul, rojo, violeta, verde y blanco. Se eligió el LED rojo (620 nm) para los ensayos de sulfato y así evitar procesos de absorción en longitudes de onda más bajas[196]. El LED azul era el óptimo para la quinina porque esa longitud de onda intensificaba la emisión de fluorescencia.

Las dimensiones óptimas del dispositivo se analizaron utilizando diferentes accesorios impresos con la misma impresora. Con los accesorios propuestos, se podían probar diferentes distancias entre la cámara y la cubeta, y entre la fuente de luz y la cubeta (Figura 32). Las diferentes configuraciones del dispositivo permitieron evaluar distancias de 20, 28, 37, 42 y 56 mm para el canal de captura, y de 14, 22, 33 y 40 mm para el canal de iluminación. Mientras se analizaba el canal de iluminación, el canal de captura se mantuvo fijo en el valor más bajo. El mismo procedimiento se llevó a cabo al estudiar la distancia del canal de captura. Basado en la intensidad de G_{int} para sulfato y la intensidad de B_{int} para quinina, se eligieron 20 mm como la mejor distancia para la captura y 14 mm para el canal de iluminación. Distancias de captura más cortas producen una imagen desenfocada permanente, evitando la posibilidad de ajustar dicho parámetro. En el diseño del dispositivo se puede ver que el canal de iluminación tiene un cilindro longitudinal (Figura 30), ese pequeño tubo funciona como un colimador primitivo. Si la

[Type here]

distancia entre la luz y el canal fuese menor, el colimador no cumpliría su función, la iluminación de la imagen sería dispersa y los valores saturarían el detector.

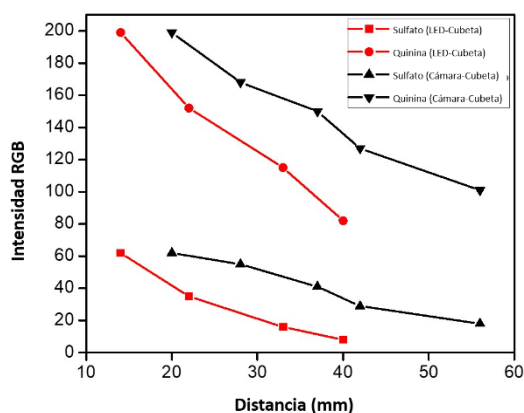


Figura 32. Optimización de las distancias de captura e iluminación.

4.3.3 Desempeño analítico

La curva de calibración con soluciones estándar de sulfato se construyó utilizando el canal azul como respuesta ($B_{int} = (1,28 \pm 0,05) [SO_4^- \text{ mgL}^{-1}] + (3,47 \pm 1,30)$), en un rango de concentraciones de 2,0 a 50,0 mgL^{-1} (número de soluciones estándar $N = 5$, y el número de réplicas $n = 3$). El coeficiente de determinación fue de 0,992. Además, los límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ), calculados de acuerdo con IUPAC[172], fueron 0,13 mgL^{-1} y 0,43 mgL^{-1} , respectivamente. Los valores de la desviación estándar relativa (% RSD) se obtuvieron a partir de 3 determinaciones independientes de cada muestra. Se evaluó la repetibilidad (intradía) y los valores obtenidos fueron inferiores al 1,2% para todas las muestras analizadas ($n=3$).

Para el análisis de quinina, el rango lineal fue de 0,42 a 3,10 mgL^{-1} , tomando como respuesta analítica la intensidad del canal verde. La ecuación correspondiente, después de aplicar el análisis de regresión, fue $G_{int} = (63,52 \pm 2,40) [QN, \text{ mgL}^{-1}] + (6,56 \pm 3,45)$, con un R^2 de 0,994 ($N = 5$, $n = 3$). Los LOD y LOQ se evaluaron de la misma manera que para el sulfato, siendo estos 0,11 mgL^{-1} y 0,38 mgL^{-1} respectivamente. Los valores de RSD fueron inferiores a 2,1% realizando 3 réplicas para cada muestra (repetibilidad intradía).

En la Figura 33 se muestran las fotografías reales de cada punto de los gráficos de calibración y las curvas correspondientes.

[Type here]

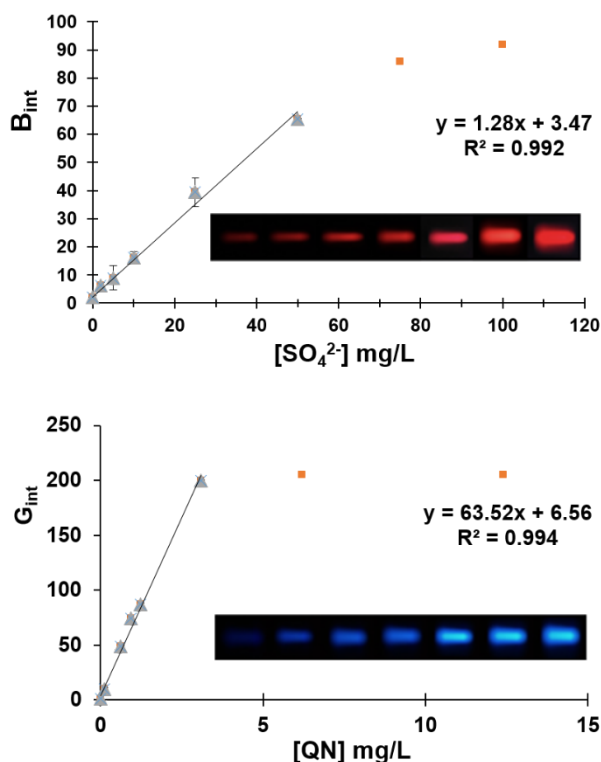


Figura 33. Curvas de calibración para ambos analitos con detalle de las fotos reales capturadas.

4.3.4 Análisis de muestras reales.

Para evaluar la aplicabilidad del dispositivo propuesto, se analizaron cinco muestras de bebidas tónicas comerciales y cinco muestras de agua de diferentes orígenes. Una técnica apropiada para realizar la validación de los métodos propuestos es el estudio de cuadrados mínimos bivariados (Bivariate Least Squares, BLS). Esta técnica considera errores en ambos ejes. En la Tabla 4 se comparan los resultados obtenidos para ambos analitos y por los diferentes métodos.

Tabla 4. Resultados del análisis de muestras reales.

Muestr a	Sulfato		Muestr a	Quinina	
	Método propuesto* $B \pm SD$	Método de referencia* $B \pm SD$		Método propuesto* $B \pm SD$	Método de referencia* $B \pm SD$
A	499.98 \pm 0.02	452.33 \pm 0.32	A	31.91 \pm 0.30	31.63 \pm 0.22
B	75.93 \pm 0.05	81.03 \pm 0.15	B	29.30 \pm 0.40	32.88 \pm 0.32
C	283.50 \pm 0.01	284.56 \pm 0.03	C	20.04 \pm 0.53	22.91 \pm 0.48
D	61.32 \pm 0.14	55.16 \pm 0.09	D	7.70 \pm 0.15	8.83 \pm 0.22
E	247.55 \pm 0.13	261.80 \pm 0.08	E	5.47 \pm 0.29	5.93 \pm 0.20

^a B : promedio ($mg L^{-1}$); SD: desviación estándar ($mg L^{-1}$) (n=3).

[Type here]

Usando el dispositivo propuesto, los resultados obtenidos se trazaron frente a los valores obtenidos por los métodos de referencia y aplicando mínimos cuadrados bivariados se obtuvieron las siguientes líneas de regresión: [dispositivo propuesto] = 1,14 [Método de referencia] -0,03 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para sulfato y [dispositivo propuesto] = 0,96 [Método de referencia] -0,0008 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para quinina, con una pendiente cercana a 1 y una intersección cercana a 0. (Figura 34)[197],[198]. Se consideró un $\alpha = 0,05$ como el nivel de confianza.

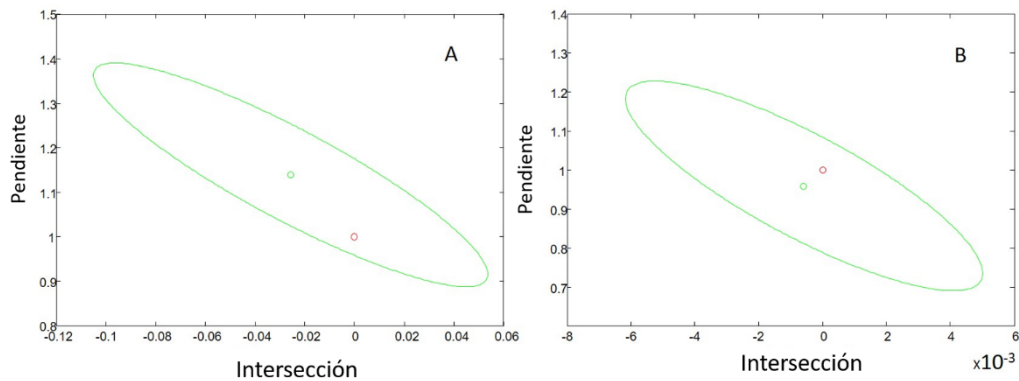


Figura 34. Validación de los métodos propuestos frente a los métodos de referencia. A. Sulfato y B. Quinina. Región de confianza conjunta elíptica para la regresión BLS para las muestras reales estudiadas en este trabajo a un nivel de significación del 5%. El círculo verde (o) representa los valores obtenidos para la pendiente y la intersección, y el círculo violeta (o) corresponde al valor teórico de la intersección cero y la pendiente de la unidad para el sulfato (A) y la quinina (B).

El dispositivo se comparó con otros trabajos publicados (Tabla 5), observando que es la primera vez que un instrumento se ha desarrollado para dos técnicas diferentes en un mismo dispositivo de baja complejidad. Además, podría usarse en análisis remotos, ya que el sistema propuesto es totalmente transportable, económico y no requiere el uso de una red de difracción, lentes ópticas adicionales o colimadores. La tecnología de conectividad del Smartphone le permite enviar toda la información para ser procesada de manera remota. Todas estas características lo convierten en una opción muy prometedora para el análisis de rutina que abre las puertas hacia nuevos dispositivos para realización de análisis *in situ*.

[Type here]

Tabla 5. Comparación de métodos analíticos basados en teléfonos inteligentes.

Técnica	Analito	Sensor	Fuente de iluminación	de Reservoirio de muestra	Matriz de la muestra	Rango de trabajo	Ópticas	Ref.
Fluorimétrica	Fluoresceína, quinina, calcio, rivo flavina, etc.	Smartphone	LED	Cubeta	Cerveza, vino blanco, bebidas energéticas y suplementos vitamínicos.	Hasta 5 mg/L	Lentes	[11]
Colorimétrica	Polvo coloreado sabor a cereza. (con fines demostrativos)	Smartphone	Lámpara de escritorio, flash o LED	Cubeta	Agua	0,0625 mg/mL hasta 2.0 mg/mL	Red de difracción	[39]
Colorimétrica	Estreptomina	Smartphone	LED	Cubeta	Miel, leche y agua.	50 to 267 nM	Difusor	[199]
Colorimétrica	Hierro (II), Hipoclorito	Webcam, notebook.	LED	Cubeta	Agua	0-50 mg/L Hierro, 0-1,7 mg/L Hipoclorito	-	[200]
Turbidimétrica	Solución standard de Formazina	Smartphone	Flash del teléfono.	Vial	Agua de río.	0-40 NTU	Red de difracción.	[201]
Turbidimétrica	Solución standard de Formazina	Smartphone	LED	-	Agua superficial y corriente.	0-400 NTU	Colimador, filtro infrarrojo	[202]
Fluorimétrica y nefelométrica	Sulfato y quinina	Smartphone	LED	Cubeta	Agua potable y bebidas comerciales.	2-50 mg/L sulfate, 0.42-3.10 mg/L quinine	-	Este trabajo

4.4 Conclusiones

El dispositivo diseñado conforma un sistema de detección versátil, económico y portátil. Es una excelente opción para determinaciones nefelométricas y fluorimétricas en muestras reales. En comparación con los métodos fluorimétricos y nefelométrico de referencia, que requieren equipos de laboratorio convencionales (voluminosos, pesados y sensibles a movimientos), el método propuesto aplica los mismos reactivos químicos, proporcionando un sistema portátil y económico para las determinaciones *in situ*, especialmente en regiones de recursos limitados.

[Type here]

El dispositivo fue desarrollado utilizando tecnología de impresión 3D y empleando la cámara del teléfono inteligente para la detección. La posibilidad de tener diversas fuentes de radiación amplía las posibles aplicaciones de este sistema.

El dispositivo descrito podría adaptarse a cualquier modelo de teléfono inteligente. Este tipo de sistema puede aplicarse para diversos usos, como reacciones quimiluminiscentes o para la detección en μ PAD.

En este trabajo, el dispositivo pudo determinar la concentración de quinina en bebidas tónicas, así como la concentración de sulfato en muestras de agua potable por debajo de los valores máximos permitidos por la Directiva 98/83 / CE del Consejo Europeo.

[Type here]

5 Capítulo 5

Uso de un espectrofotómetro impreso en 3D con un smartphone como detector para el análisis cinético de la degradación de hipoclorito

Resumen

Se diseñó y construyó un espectrofotómetro basado en un teléfono inteligente completamente funcional utilizando tecnología de impresión 3D. Este tipo de dispositivo representa una herramienta simple y económica para el uso diario de laboratorio y podría abordar desafíos analíticos importantes en comunidades de bajos ingresos. Para demostrar la aplicabilidad del espectrofotómetro, se realizó un estudio de la degradación del hipoclorito de sodio (basándose su poder oxidante). Este desinfectante es uno de los agentes más recomendados contra virus (incluido el SARS-CoV-2) y bacterias debido a su eficiencia, bajo costo y amplia disponibilidad. Sin embargo, dado a que el NaClO es termo y fotosensible, el control de la concentración de estas soluciones es particularmente importante. Además, se desarrolló un ensayo simple, efectivo y fácil de realizar para medir soluciones utilizando el colorante violeta cristal, absorbido sobre un papel. Este proceso, en el que el tiempo requerido para blanquear el papel depende de la concentración de la solución de NaClO, se implementó para el control de las pautas de uso para desinfección de superficies proporcionadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

5.1 Introducción

Impulsado por los bajos costos y la gran disponibilidad, en los últimos años se han descrito una gran cantidad de dispositivos portátiles que integran detección mediante teléfonos inteligentes[1,41,203]. Estos sistemas han avanzado gradualmente desde simples pruebas colorimétricas realizadas en modelos artesanales o incluso diseños al descubierto hasta instrumentos relativamente complejos[53,177,204,205]. Esto último requiere el desarrollo de diferentes plataformas y tecnologías que se han vuelto paulatinamente más accesibles[4]. Debido a estos avances, la tecnología de impresión 3D le brindó a la detección por imagen una herramienta poderosa para crear instrumentos más adaptables, asequibles y precisos[21,206,207].

Los espectrofotómetros basados en teléfonos inteligentes ya se han descrito en la literatura[208–211]. Sin embargo, una limitación común para estos instrumentos es el sistema óptico, incluso en las configuraciones más simples, el cual requiere una cuidadosa alineación de los componentes involucrados[177,212,213]. Este paso de alineación entre los

[Type here]

componentes ópticos en el TI (lentes de la cámara) y las partes impresas del instrumento, se ha abordado tradicionalmente fijando el teléfono inteligente a adaptadores *ad-hoc*, que a menudo son específicos para un modelo y/o marca de teléfono[177,12]. Hasta el momento, no se ha informado de un espectrofotómetro que puedan adaptarse a una amplia gama de teléfonos inteligentes simplemente ajustando la posición de los componentes ópticos a la ubicación de la cámara. Con el objetivo de abordar estas limitaciones y proporcionar una forma simple de integrar diferentes modelos de teléfonos con una variedad de instrumentos analíticos, este trabajo describe un espectrofotómetro que utiliza la cámara integrada al TI como detector. Los componentes se desarrollaron utilizando tecnología de impresión 3D. El instrumento se calibró primero con dos láseres, convirtiendo este sensor de imagen en un espectrofotómetro completamente funcional. Para demostrar su aplicabilidad al abordar un problema común, el instrumento se utilizó para estudiar la cinética de degradación del violeta cristal (VC) al ser oxidado por soluciones de hipoclorito de sodio (lavandina comercial)[214, 215]. El VC es un colorante fácilmente soluble en agua y altamente estable, con una banda de absorción simple a 590 nm. Los resultados cinéticos se usaron para calcular la concentración de varias soluciones de hipoclorito y se ajustaron específicamente para alcanzar el rango de concentración utilizado con fines de desinfección[216]. A pesar de que las soluciones de NaClO no logran eliminar la totalidad de los patógenos, es el desinfectante más utilizado debido a su disponibilidad y bajo precio[217]. Por lo tanto, el enfoque propuesto puede usarse para determinar la idoneidad de una solución para la desinfección de superficies contaminadas. Se describe además un sensor práctico basado en papel para controlar la concentración de hipoclorito (como solución desinfectante) que solo requiere de un cronómetro.

5.2 Parte experimental

5.2.1 Reactivos y soluciones.

El VC fue adquirido de Harleco (Harleco-Sigma Aldrich). El hidróxido de sodio para estudios de pH se adquirió de Cicarelli (Buenos Aires, Argentina). Todas las soluciones acuosas se prepararon usando agua ultrapura (18,0 MΩ.cm), obtenida de un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EE. UU.). Todos los productos químicos utilizados fueron de grado analítico. El pH de la solución se midió utilizando un electrodo de vidrio conectado a un medidor de pH digital (Orion 420A +, Thermo; Waltham, MA, EE.UU.), y se ajustó con una solución 1 mol·L⁻¹ de NaOH o HCl. Se usó papel de filtro (CLT 597 Whatman S&S, Ref. 10311887, densidad 85 g/m²; espesor 190 μm; retención 4–7 μm) para contener una cantidad fija y conocida de VC.

[Type here]

5.2.2 Instrumentación.

El dispositivo impreso en 3D fue diseñado con el software Autodesk 123D Design (San Rafael, CA, EE.UU.). Para ello se utilizó una impresora 3D (Geeetech Prusa I3 Pro b, Shenzhen Getech Technology Co. Shenzhen, China) para fabricar todas las piezas requeridas, empleando como sustrato filamento de impresión PLA de 1,75 mm de Grilon3D (NTH, Chivilcoy, Buenos Aires, Argentina). Como software de impresión se utilizó el programa Ultimaker Cura v4.5.0 (Geldermalsen, Países Bajos). Todas las piezas fueron impresas y unidas con tuercas diseñadas en 3D o tornillos metálicos. El espectrofotómetro propuesto se equipó con un LED blanco (0,1 W, 5 mm, Patagoniatec, Buenos Aires, Argentina), un portaobjetos de vidrio para microscopio y una red de difracción Rainbow Symphony de 1000 líneas por milímetro (Reseda, CA, EE.UU.). La muestra se colocó en una cubeta de plástico, de 1 cm de paso óptico. La calibración del espectrofotómetro desarrollado se realizó con dos láseres, uno verde y otro rojo ambos del mismo proveedor (Zhang Kun, Yiwu, Jinhua, Zhejiang, China. Modelo TYLaser 303, 532 nm y 650 nm, 100 mW).

Los experimentos aquí descritos se llevaron a cabo usando un teléfono Motorola Moto G5 plus y un Samsung Neo J7. Se empleó un espectrofotómetro HACH DR 4000 para los estudios de validación. Los espectros de absorción UV-vis se registraron en un intervalo de longitudes de onda entre 450 y 650 nm, coincidiendo con la banda de absorción del colorante seleccionado.

5.2.3 Dimensiones del dispositivo e impresión.

El dispositivo diseñado tiene tres partes funcionales diferentes: la base, el soporte del teléfono y el propio espectrofotómetro. La base fue diseñada para una fácil manipulación del sistema. El soporte fue creado y desarrollado para permitir la alineación correcta de la cámara con la interferencia de primer orden de la red de difracción. El espectrofotómetro consiste en una red de difracción, una ranura interna, un portacubetas y una pieza externa con un colimador y el diodo LED (Figura 35a). El soporte del teléfono se ajusta en tres puntos para el posicionamiento horizontal y una tuerca adicional (Figura 35a, dentro del recuadro en color amarillo) para corrección de altura en el eje vertical.

Para el proceso de calibración, se encendió el LED, se colocó el teléfono inteligente con la cámara encendida, ajustando la posición hasta que la imagen descompuesta de la luz proveniente del LED se encuadró en la pantalla de teléfono. La distancia entre la cámara y la red de difracción es de 1,5 mm, correspondiente al grosor del portaobjetos de vidrio. Una distancia tan corta y el ángulo de difracción hicieron que la alineación del teléfono inteligente sea un paso muy simple pero crítico.

[Type here]

El componente principal del dispositivo es un tubo de perfil cuadrado de 80 mm de largo colocado en un ángulo de 45 grados con el soporte del teléfono y alineado con el brazo de calibración de altura (Figura 35a, en verde). Se colocó una red de difracción de film plástico frente a la salida del fotómetro y se sostuvo con un portaobjetos de vidrio (Figura 35a, en rosa). El portaobjetos de vidrio se usó tanto para proteger la red de difracción como para aplanarla y así obtener una imagen nítida. En el otro extremo del espectrómetro, se colocó un soporte para cubetas y en la parte posterior del canal se creó un reborde para conectar la fuente de luz. El LED de 5 mm se fijó a una pequeña tapa cuadrada y luego se unió a un colimador simple que reduce la dispersión de la luz (Figura 35a, en rojo). La distancia entre la cubeta y el LED es de 20 mm.

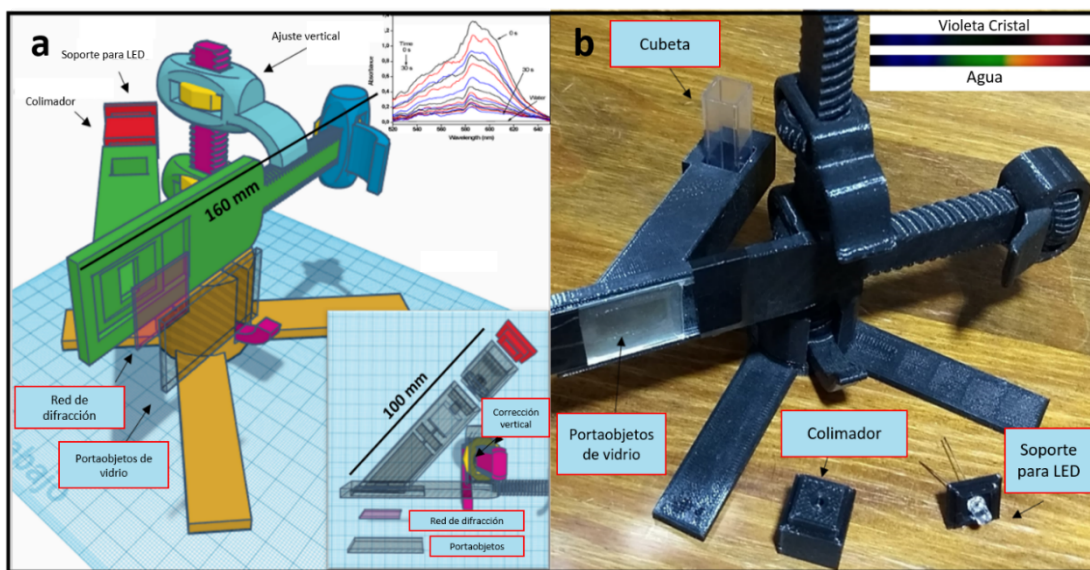


Figura 35. a) Detalles de cada parte y representación esquemática del espectrofotómetro descrito. b) Foto real del dispositivo propuesto.

Todas las piezas de plástico se imprimieron con la impresora 3D en filamento PLA negro, lo que dio como resultado el dispositivo que se muestra en la Figura 35b. Para la impresión, la altura de capa se configuró en 0,3 mm, la temperatura del fusor fue de 195°C y la temperatura de la base fue de 55°C. No se necesitaron soportes de impresión para realizar las piezas. El porcentaje de relleno se estableció en 15% para dar una resistencia estructural relativamente buena y reducir la cantidad de filamento utilizado.

5.2.4 Captura de imagen.

Las imágenes en formato JPEG se capturaron con ambos teléfonos utilizando el enfoque fijo en modo macro (ya que genera una imagen más clara a distancias cortas), la iluminación configurada en modo nublado (para lograr exposiciones más homogéneas), la velocidad de

[Type here]

obturación 1/3 s y un valor de ISO fijado en 100 (para reducir el ruido de fondo). Estos valores se mantuvieron en todos los experimentos informados. El parámetro de exposición se mantuvo en valor 0. Para los experimentos de calibración, se capturaron fotografías secuenciales en modo ráfaga. En todos los casos, el teléfono inteligente se colocó en el espectrofotómetro antes de comenzar las capturas con el LED blanco encendido. Se abrió el software nativo de la cámara y las tuercas de calibración del dispositivo se movieron para alinear correctamente la misma. Estas tuercas sirvieron para sostener y alinear el teléfono inteligente usando el conjunto de soportes antes descrito. Frente a la cámara, un portaobjetos de vidrio sirvió de soporte para la red de difracción, colocada al final del canal de entrada de la luz. En el lado opuesto del canal de luz, se colocó el soporte de la cubeta y unido a éste, el módulo de iluminación (que consiste en un colimador simple y un LED) (Figura 35a). Luego, los ajustes de adquisición se seleccionaron en el modo manual de la cámara y se tomaron las fotos. Cabe mencionar que no se usó la configuración automática de las condiciones de captura porque podría afectar significativamente los resultados de los ensayos.

5.2.5 Procesamiento de imagen.

Se utilizó el software libre ImageJ 1.51q para la edición y el procesamiento de las imágenes. Tanto las imágenes de tiempo fijo como las de estudios cinéticos se procesaron como apilamientos o *stacks*, para mejorar la reproducibilidad. En todos los casos, se seleccionó inicialmente una región de interés (ROI) de 1000 píxeles (ancho) por 25 píxeles (alto). El posicionamiento de ésta selección fue sencillo ya que la cámara permaneció durante todo el proceso en la misma posición. Una vez que se seleccionó la ROI para el apilamiento completo de fotografías, se aplicó la función de recortar y la imagen se giró 180 grados, para obtener un espectro con la orientación convencional (en el orden creciente de longitudes de onda). Luego, la imagen en color se dividió en los tres canales (R, G y B) y la intensidad de cada canal se registró por separado como un archivo de texto. Estos archivos de texto se importaron a una hoja de cálculo de Microsoft Excel para su análisis. Toda la información en este archivo se ordenó como una matriz bidimensional, lo que representa un formato muy conveniente para su procesamiento. La intensidad del color, representada en los espectros RGB, corresponde a la ecuación $I = 0,299 R + 0,587 G + 0,114 B$ (en términos de luminancia analógica según la norma ITU-R BT 601-7) [218].

5.2.6 Procedimientos para los estudios de degradación.

Todos los estudios de degradación se realizaron en una cubeta colocada en el espectrofotómetro. Para cada determinación, se colocaron inicialmente 2,5 mL de una solución

[Type here]

acuosa que contenía $7,5 \text{ mgL}^{-1}$ de VC y luego se añadieron $500 \mu\text{L}$ de la solución que contenía NaClO. Antes de comenzar cada conjunto de estudios, se adquirieron tres imágenes correspondientes a la imagen de fondo (apagando el LED), una imagen en blanco (agua destilada) y una imagen para el VC en solución acuosa, que representa la intensidad de color inicial. Luego, la cubeta se llenó con $2,5 \text{ mL}$ de CV y $500 \mu\text{L}$ de una solución que contenía el estándar NaClO o una muestra. Las imágenes se capturaron cada 2 segundos en modo manual y se registraron 15 exposiciones para cada experimento. Este protocolo se aplicó para estudios cinéticos realizados en función del pH de la solución, la concentración de NaClO, exposición a rayos UV (luz solar) y el tiempo de almacenamiento. Se aplicó un protocolo ligeramente diferente para la calibración del dispositivo, a fin de correlacionar el número de píxeles horizontales con su longitud de onda en nanómetros. En estos casos, se encendió el LED blanco y se capturaron diez imágenes del blanco y de la solución del colorante. Luego, el LED se reemplazó con un láser (rojo o verde), se retiró la cubeta y se tomaron diez fotos más para cada fuente de luz.

5.2.7 Muestras.

Se recogieron muestras de agua de diferentes fuentes (agua subterránea (AS), agua de surgente termal (AST), muestra de un sistema comercial purificador de agua (AP) y dos ubicaciones diferentes de agua del red clorada (ARP y ARLF) de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires. El agua comercial desionizada (AD) utilizada como muestra se compró en un mercado local.

5.2.8 Análisis estadístico de los datos.

El procesamiento de todos los datos recuperados de las fotografías se realizó con Microsoft Office Excel® 2010 (Microsoft, Redmond, WA, EE.UU.).

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Calibración del dispositivo.

Se utilizaron dos punteros láseres diferentes como fuente de luz para la calibración de los espectros. El LED blanco se retiró del dispositivo y se reemplazó con cada puntero. Una vez que se colocó la fuente de radiación, se capturó, procesó y promedió un conjunto de fotografías. Se capturaron los espectros de agua destilada y VC utilizando un LED blanco, luego se capturaron los espectros sin utilizar cubeta de los dos láseres. Después, los resultados se superpusieron en un solo gráfico (Figura 36). Las longitudes de onda nominales eran $650 \pm 20 \text{ nm}$ para el láser rojo y $532 \pm 10 \text{ nm}$ para el láser verde. La intensidad máxima para el puntero rojo se ubicó en el

[Type here]

píxel #809, mientras que la intensidad máxima para el láser verde se centró en el píxel #484. La distancia en píxeles entre ambos picos fue de 325 píxeles, y considerando las longitudes de onda declaradas, se calculó una relación de 0,56 nm/píxel.

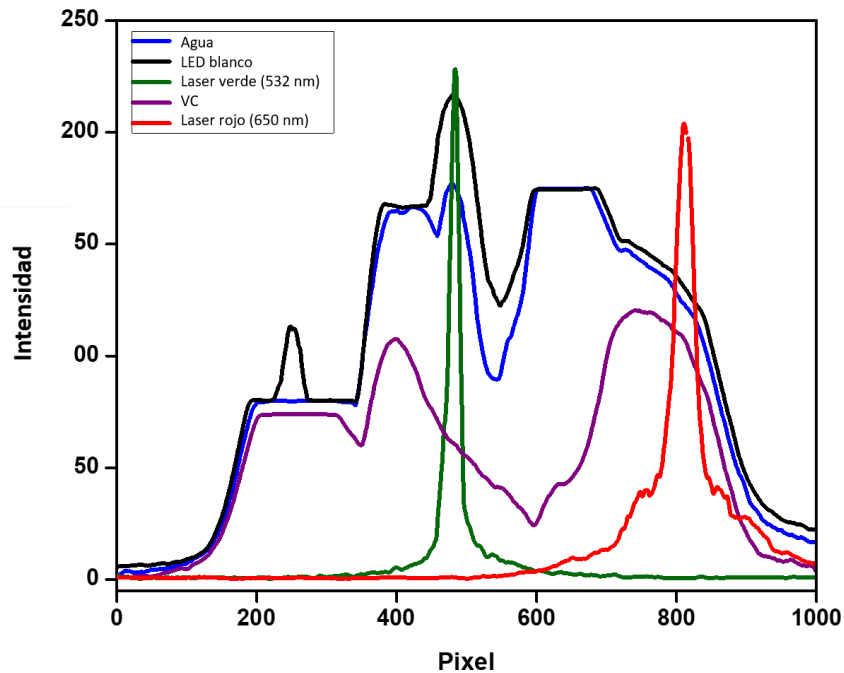


Figura 36. Espectros obtenidos con diferentes fuentes de luz y utilizados para calibrar el espectrofotómetro propuesto.

5.3.2 Evaluación del desempeño del instrumento.

El comportamiento del dispositivo propuesto se investigó mediante la evaluación de la estabilidad de la fuente de luz seleccionada, la dispersión espectral y la repetibilidad. En el primer caso, la intensidad de la luz se midió directamente desde la fuente sin una cubeta, cada 5 minutos durante 70 minutos. En cada instante, se registraron cinco exposiciones y los resultados se analizaron a diferentes longitudes de onda. Como se puede observar en la Figura 37, la fuente de luz seleccionada presenta una buena estabilidad en las longitudes de onda entre 500 nm y 700 nm (desviación estándar relativa, RSD, menor a 1,21%), a lo largo del tiempo estudiado. Sin embargo, los resultados también mostraron que la intensidad de la fuente de luz a longitudes de onda por debajo de 450 nm varía significativamente (RSD menor a 9,94%), rango que se consideró inadecuado para realizar determinaciones.

El estudio de dispersión a lo largo de la región visible de los espectros consistió en capturar 5 exposiciones cada 10 segundos durante un lapso de tiempo de 10 minutos. Como se puede ver

[Type here]

en la Figura 37, la desviación estándar obtenida de la transmitancia es inferior a 0,025 en el rango comprendido entre los 450 nm y los 650 nm, proporcionando una precisión satisfactoria para las determinaciones de rutina. Estos resultados permitieron identificar las regiones espectrales de mayor variabilidad, las cuales se localizaron en regiones con bajas intensidades de luz proveniente de la fuente y en las zonas en la que las pendientes de la curva se hicieron más abruptas, lo que condujo a mayores dispersiones en los espectros resultantes (Figura 38, línea rojo).

Para evaluar la repetibilidad, primero se colocó el teléfono inteligente en el dispositivo y luego se encendió la luz. Se midieron un blanco y una solución que contenía 14 mgL^{-1} de VC a una longitud de onda de 600 nm. Después de eso, el dispositivo se desmontó por completo y la luz se desconectó. Este procedimiento se repitió 8 veces. Los resultados obtenidos en absorbancia mostraron una variabilidad máxima del 13% ($A = 0,754 \pm 0,099$), lo que se considera aceptable para el análisis de rutina. Estos resultados además sugieren que una mayor precisión se obtiene manteniendo la posición fija del teléfono durante los estudios.

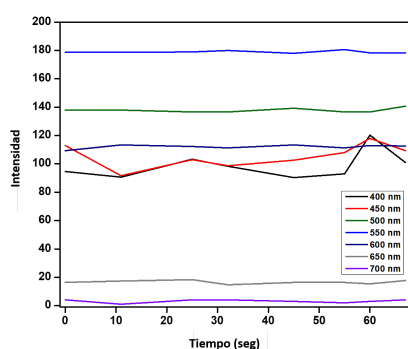


Figura 37. intensidad de la luz LED en diferentes longitudes de onda durante el experimento

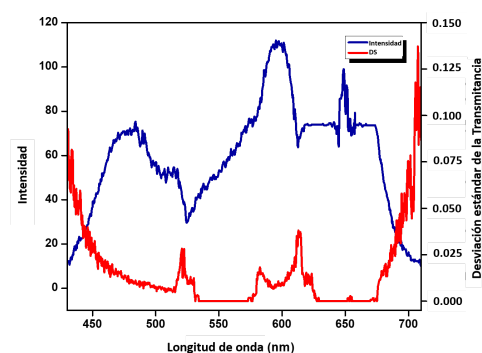


Figura 38. Dependencia espectral de la intensidad de una solución de 14 mgL^{-1} de VC (trazo azul) y su desviación estándar (trazo rojo).

5.3.3 Estudio de la degradación del violeta cristal.

Teniendo en cuenta que el VC es un marcador bien establecido para la reactividad del hipoclorito de sodio (NaClO)[219],[220], se investigó el comportamiento del dispositivo realizando análisis cinéticos de la oxidación en condiciones experimentales seleccionadas. Es importante mencionar que se sabe que esta reacción procede con una velocidad de primer orden y sin dependencia con a la fuerza iónica[221]. Como ejemplo representativo de los resultados obtenidos, la Figura 39 muestra una secuencia de curvas espectrales obtenidas durante la degradación del VC, correlacionando la absorbancia con la longitud de onda, según lo determinado por el espectrofotómetro propuesto. Como se puede observar, se obtuvo una

[Type here]

disminución en la absorbancia de la solución (como resultado del proceso de oxidación) en un lapso de 30 segundos.

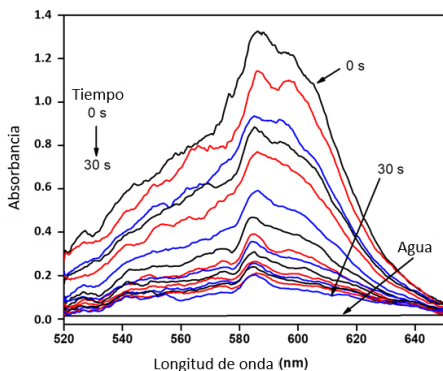


Figura 39. Curvas espectrales obtenidas durante un estudio de degradación de VC (7,5 mgL-1) con 0,05% de NaClO a pH = 7,0.

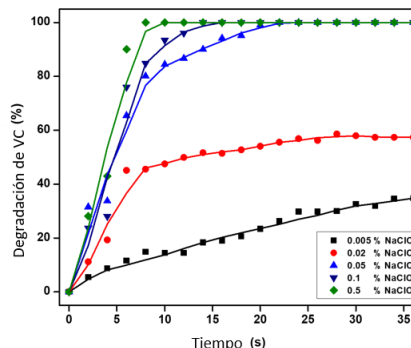


Figura 40. Estudio de degradación VC. Cinco niveles de concentración diferente que muestra un comportamiento oxidante.

A continuación, se prepararon soluciones de cinco concentraciones diferentes de NaClO, incluyendo aquellas recomendadas por la OMS para desinfección. Como se puede observar en la Figura 40, ambas concentraciones recomendadas (0,5% y 0,05%) produjeron una degradación total de la solución VC, pero estas reacciones requirieron diferentes tiempos para completarse. Las soluciones con concentraciones más bajas (0,02% NaClO) solo pudo degradar una fracción del colorante utilizado en el tiempo del experimento, efecto que se atribuyó a una combinación de estequiometría (1VC:2NaClO) y al menor potencial de oxidación de tales soluciones.

Como se ha reportado previamente[222], el HClO ($pK_a = 7,52$) es la principal especie activa en las soluciones de lavandina comercial y, por lo tanto, la reactividad de estas soluciones depende en gran medida del pH. Para probar este efecto sobre el violeta cristal, se analizó la degradación cinética, utilizando una solución que contenía NaClO al 0,05% a tres niveles de pH diferentes (5,0, 7,5 y 10,0). El rango seleccionado representa valores de pH que pueden ajustarse utilizando productos químicos domésticos. En la Figura 41 se muestran los resultados, evidenciando que los valores de pH que promueven la formación de las especies de ClO (menos reactivas) produjeron una menor decoloración del VC (hasta 60% en 25 segundos). Por el contrario, cuando la reacción se realizó a pH = 5 (por debajo del pK_a)[222], se observó un proceso mucho más eficiente, alcanzando una degradación del 95% en 25 segundos.

[Type here]

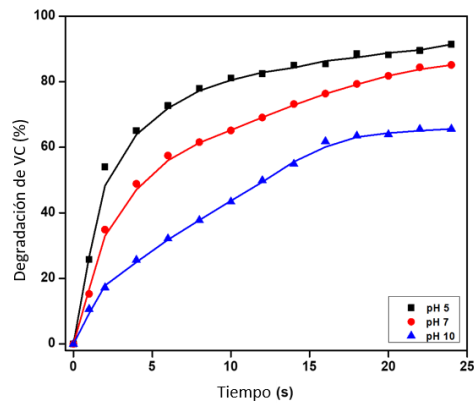


Figura 41. Degradación de una solución 0,05% de Violeta Cristal a diferentes pH.

Otro factor que puede contribuir significativamente a la degradación del NaClO es su exposición a la luz solar. Para estudiar este efecto sobre la capacidad de decoloración del VC, se expuso una solución de NaClO 0,05% a la luz solar durante 30, 60 y 90 minutos. Los datos mostrados en la Figura 42 permiten demostrar que la exposición a la radiación solar modifica significativamente la capacidad de estas soluciones para degradar el VC. Esto concuerda con las recomendaciones de la OMS sobre la conservación del NaClO [216].

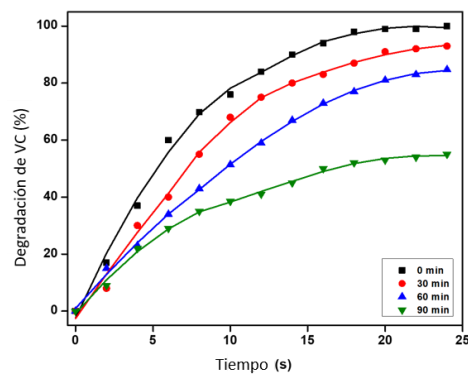


Figura 42. Análisis de la degradación de CV con diferentes tiempos de exposición a la luz solar.

Si bien estas soluciones se prepararon con AD, los estudios preliminares indican que la preparación de soluciones desinfectantes es más eficiente utilizando agua purificada o previamente tratada (agua de red) ya que las de origen natural (surgente y perforación) mostraron menor efectividad desinfectante (Figura 43).

[Type here]

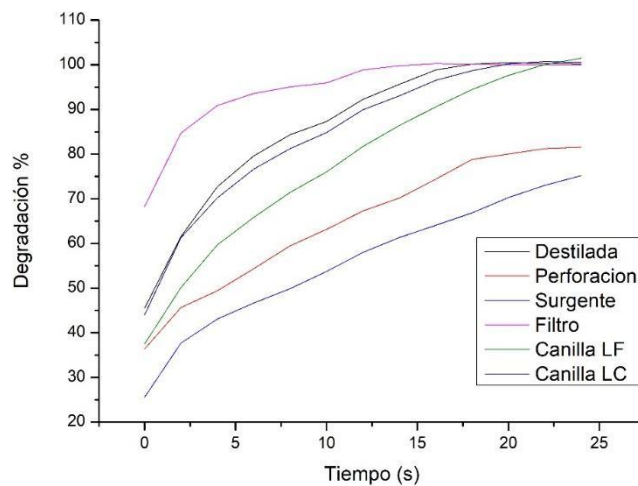


Figura 43. Evaluación de la efectividad de soluciones preparadas con aguas potables de acceso doméstico.

5.3.4 Validación del Dispositivo.

Los espectros de absorción del VC se midieron en un espectrofotómetro HACH DR 4000 y se compararon con los obtenidos mediante el dispositivo propuesto. Como se describió anteriormente, se capturaron diez fotografías para el blanco (agua destilada) y para una solución que contenía $7,5 \text{ mgL}^{-1}$ VC. Los resultados se promediaron y luego se obtuvo la transmitancia como $T = I_{VC} / I_{AD}$. Luego, se representó gráficamente en unidades arbitrarias (UA) como absorbancia. El número de píxeles se transformó en longitud de onda como se detalló anteriormente y, finalmente, ambos gráficos se superpusieron. Como se puede observar en la Figura 44, ambos gráficos espectrales mostraron prácticamente el mismo comportamiento, teniendo en cuenta que la fuente de luz es en un caso una lámpara de tungsteno (instrumento comercial) y un simple LED blanco en el otro (instrumento propuesto). Las imágenes reales capturadas con el dispositivo, muestran que el VC absorbió la longitud de onda de 590 nm (banda amarilla del espectro visible).

[Type here]

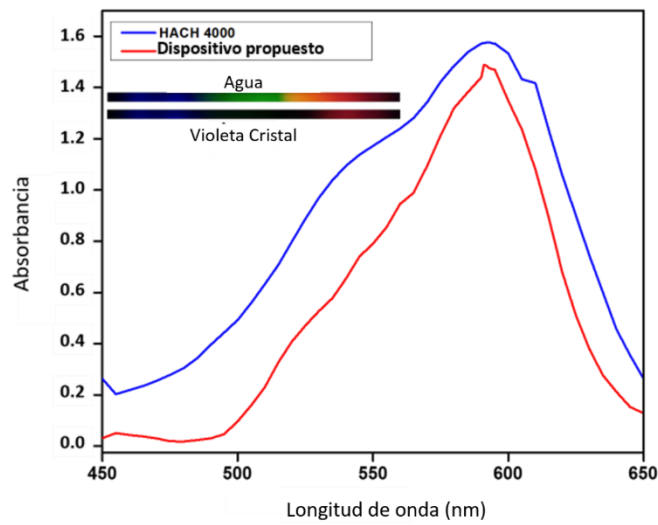


Figura 44. Gráfico espectral obtenido por el espectrofotómetro HACH 4000 (azul) y el espectrofotómetro para teléfonos inteligentes propuesto (rojo).

Además, se realizó una curva de calibración de VC en un rango de concentraciones entre 0,0096 y 75 mgL⁻¹ y se obtuvo una correlación lineal entre 0,06 y 15 mgL⁻¹. La sensibilidad del sistema fue $A = (0,079 \pm 0,0010) [CV, \text{mgL}^{-1}] + (-0,0022 \pm 0,0037)$, con un coeficiente de correlación $R^2 = 0,998$ (Figura 45). Para validar la aplicabilidad del dispositivo, se comparó con un espectrofotómetro HACH DR 4000. En primer lugar, se realizó un estudio F para comparar las varianzas, y dado que el valor de $F_{\text{calculado}}$ fue menor que el F_{tabulado} , las varianzas demostraron ser estadísticamente similares. Posteriormente, se aplicó una prueba *t-student*, y el $t_{\text{calculado}}$ fue menor que el valor de t_{tabulado} , demostrando que no existen diferencias significativas entre las pendientes de ambos métodos.

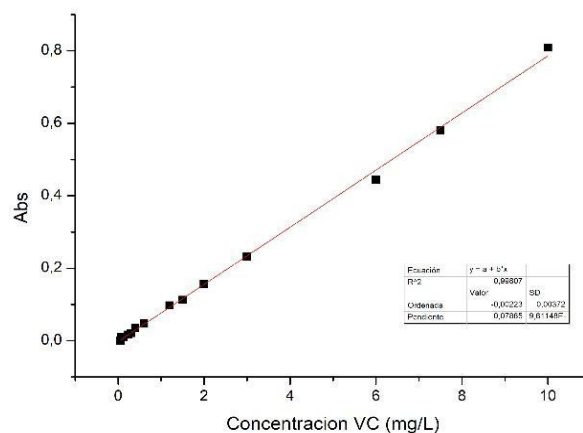


Figura 45. Recta de calibración para VC realizada con el dispositivo propuesto.

[Type here]

Las características principales del dispositivo propuesto se compararon con trabajos similares descritos en la literatura (Tabla 6). De esta información se desprende que no se desarrollaron previamente sistemas de alineación para el teléfono celular. En el espectrofotómetro propuesto, la técnica de impresión 3D simplifica el proceso de diseño y construcción.

Tabla 6. Comparación de espectrofotómetros basados en teléfonos inteligentes.					
Técnica	Fuente de luz	Óptica	Teléfono / sistema de alineación	Diseño y materiales.	Referencia
Absorción	Lámpara de escritorio con bombilla incandescente. Fuera del sistema.	Red de difracción de película y espejo de aluminio	Multiplataforma con adaptador para una funda de teléfono. Posición fija	Plástico impreso en 3D	[12]
Absorción	Lámpara de escritorio, linterna o LED. Fuera del sistema	Espejo de aluminio. Red de difracción (1000 líneas / mm)	Iphone 5. Posición fija.	Plástico impreso en 3D	[39]
Absorción	2 leds	DVD plástico	No detallado ..	Plexiglás negro	[209]
Absorción	LED blanco Fuera del sistema	Red de difracción y lente macro	Nexus 5. Sin sistema de alineación	Cartón	[212]
Absorción y emisión.	LED blanco ultra brillante	DVD plástico	Funda para Smartphone comercial. Posición fija.	MDF (tablero de fibra de densidad media) pegado	[213]
Absorción	Linterna LED	DVD plástico	Universal. Equipado con soporte LEGO.	Caja de zapatos de cartón	[223]
Absorción	Banda ancha fuente óptica	Red de difracción, un colimador y lentes cilíndricos.	Iphone 4 compatible con el dispositivo.	Materiales y diseño no descritos	[224]
Absorción	LED blanco	Red de difracción sinfónica del arco iris	Universal	Impresión 3D	Este trabajo

[Type here]

5.3.5 Aplicación práctica.

Los estudios cinéticos mencionados anteriormente se aplicaron para desarrollar una prueba *ad hoc* simple usando soluciones de lavandina comercial como desinfectante. Se añadieron 5 μL de solución de VC (150 mgL^{-1}) a discos de papel de filtro (5 mm de diámetro) y se dejaron secar durante dos horas. Luego, los discos de papel se mantuvieron en un recipiente oscuro y tapado para evitar la degradación. El experimento consiste en cronometrar la decoloración visual del disco al sumergirlo en 40 ml de una solución de lavandina recién preparada. El cronómetro se detuvo cuando el disco se volvió totalmente blanco. Este estudio reveló que es posible controlar las soluciones desinfectantes de acuerdo con el tiempo requerido para blanquear el disco de papel (Figura 46). Estudios de esta índole han sido descritos con éxito en la literatura[225]. Los tiempos de decoloración se graficaron (Figura 47) y el tiempo se midió con el cronómetro de un teléfono. Como se mencionó anteriormente, la OMS recomienda para la desinfección de la superficie una solución de NaClO al 0,05%. Utilizando una solución de esa concentración, los resultados fueron de $31,7 \pm 6,1$ segundos hasta decoloración total. Según estos estudios, los tiempos por encima de 37,8 segundos significan una concentración insuficiente de NaClO, y los resultados por debajo de 25,6 segundos muestran un exceso del mismo.

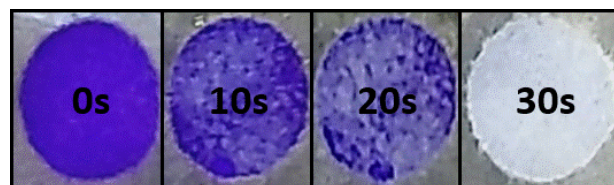
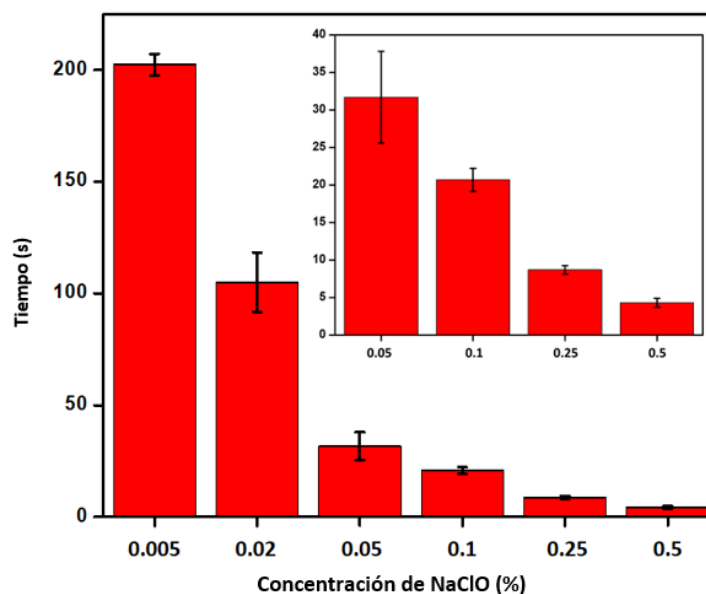


Figura 46. Fotos de los discos de papel durante los estudios de decoloración.



[Type here]

Figura 47. Tiempo de decoloración de los discos de papel para diferentes niveles de concentración.

5.4 Conclusiones

Se desarrolló un espectrofotómetro impreso en 3D simple y económico basado en la detección mediante TI. La principal ventaja de este enfoque es que cualquier tipo de TI se puede conectar fácilmente debido a su mecanismo simple. El dispositivo descrito funcionó como un espectrofotómetro convencional que proporciona una herramienta asequible para realizar gráficos espectrales. La fuente de luz intercambiable permite una fácil calibración del sistema. El dispositivo portátil descrito demostró ser adecuado para llevar adelante estudios cinéticos para la evaluación de soluciones desinfectantes de hipoclorito recomendadas por la OMS. Se utilizó un software de código abierto para el procesamiento de imagen y una hoja de cálculo para obtener gráficos espectrales.

Además, se creó un sensor simple y práctico basado en papel para controlar la concentración correcta de diluciones de hipoclorito. Este dispositivo económico y fácil de usar es importante en términos de desinfección de la superficie en el contexto de la pandemia de COVID-19.

[Type here]

6 Capítulo 6

Desarrollo de un espectrómetro de absorción y emisión para la cuantificación y estudios de extracción de curcumina en muestras de alimentos.

Resumen

En la actualidad la cúrcuma es uno de los productos alimenticios en auge gracias a sus propiedades antioxidantes. Industrias alimenticias y farmacológicas utilizan estas propiedades para enriquecer productos. La curcumina puede ser utilizada como colorante alimentario (por su intenso color amarillo) y a su vez su molécula presenta fluorescencia. Los dispositivos analíticos basados en teléfonos inteligentes diseñados usando impresoras 3D han comenzado a reemplazar algunas funciones del equipamiento tradicional de laboratorio. En el presente trabajo se diseñó, fabricó y validó un dispositivo analítico usando un TI para la detección de curcumina tanto por espectrofotometría visible como por espectrofluorimetría de emisión. Utilizando el dispositivo propuesto para absorción molecular se obtuvo una recta de calibrado tal que $Abs = (0,022 \pm 3.06 \text{ E-4}) [\text{Conc. Curcuminoides}] + (-0,015 \pm 0,005)$, con un coeficiente de correlación $R^2 = 0,997$, siendo su rango lineal de 0,5 a 50 mgL^{-1} . Al realizar la determinación por fluorescencia la recta de calibración obtenida fue $F = (53,32 \pm 1,86) [\text{Conc. Curcuminoides}] + (2,56 \pm 0,68)$, con un coeficiente de correlación $R^2 = 0,993$, con un rango lineal entre 0,06 y 0.75 mgL^{-1} . Los resultados de recuperaciones comparando con instrumentos convencionales arrojaron resultados satisfactorios.

6.1 Introducción.

Dentro de la industria alimenticia, la cúrcuma (*Curcuma longa*) es uno de los condimentos más tradicionales en la cocina asiática[226,227]. En el condimento pulverizado (proveniente de la raíz) se ha reportado la existencia de diversos curcuminoides y aceites volátiles[228,229]. Las propiedades antioxidantes de los curcuminoides han llevado a que se utilicen extractos de cúrcuma en formulaciones farmacéuticas o nutricionales[230,231]. Desde hace algunos años se comercializan mayor cantidad de alimentos conteniendo cúrcuma, por esta razón son necesarios controles de calidad[232,233]. Basados en las propiedades de los curcuminoides, diversos métodos de detección se han desarrollado, tales como espectrofotométricos[234,235], cromatográficos[236,237], electroforesis capilar[238,239] y biosensores[240,241]. Las características moleculares de estos compuestos hacen de las técnicas espectrofotométricas y las fluorimétricas las más utilizadas[242]. Si bien los métodos espectrométricos no permiten evaluar la composición de los curcuminoides individuales,

[Type here]

representan un método ideal para el control de alimentos midiendo la concentración de curcuminoides totales[243].

Una gran gama de dispositivos analíticos basados en TI han sido fabricados utilizando tecnología de impresión en tres dimensiones[244]. La utilización de dispositivos celulares y de fabricaciones en 3D ha permitido la adaptación de técnicas fotométricas clásicas a este tipo de dispositivos[62].

Tanto los espectrofotómetros como los fluorímetros basados en TI han sido reportados con anterioridad [53,245]. La combinación de ambas técnicas en un único instrumento permite simplificar la adquisición de datos no solo para determinaciones aisladas[70] sino que abre la posibilidad a la fusión de los datos obtenidos por ambas técnicas[246].

El diseño, impresión, construcción y aplicación de un instrumento dual (espectrofotómetro y espectrofluorímetro) basado en la detección por imagen ha sido propuesto y desarrollado. El funcionamiento y la validación de dicho instrumento serán analizados por medio de estudios de extracción y cuantificación de curcuminoides totales en productos farináceos.

6.2 Parte experimental

6.2.1 Reactivos y soluciones

La curcumina fue adquirida a Sigma–Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Todas las soluciones acuosas se prepararon usando agua ultrapura (18.0 MΩ.cm), obtenida de un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EE.UU.). Todos los productos químicos utilizados fueron de grado analítico. El pH de la solución se midió utilizando un electrodo de vidrio conectado a un medidor de pH digital (Orion 420A+, Thermo; Waltham, MA, EE. UU.), y se ajustó con soluciones 1 mol·L⁻¹ de NaOH o HCl. Se usó papel de filtro (CLT 597 Whatman S&S, Ref. 10311887, densidad 85 g/m²; espesor 190 μm; retención 4–7 μm) para los estudios de extracción. El etanol utilizado fue adquirido en Cicarelli (Argentina).

6.2.2 Instrumentación.

El espectrómetro “dual” fue diseñado utilizando el software Autodesk 123D Design (San Rafael, CA, EE.UU.). Para la fabricación se recurrió a una impresora 3D (Geeetech Prusa I3 Pro b, Shenzhen Getech Technology Co. Shenzhen, China) con la cual se crearon todas las piezas requeridas, empleando como filamento de impresión PLA de 1,75 mm de Grilon3D (NTH, Chivilcoy, Buenos Aires, Argentina). El software de impresión utilizado fue el programa Ultimaker Cura v4.5.0 (Geldermalsen, Países Bajos). El instrumento propuesto se equipó con un

[Type here]

LED blanco (0,1 W, 5 mm, Patagoniatec, Buenos Aires, Argentina) y un LED violeta (390 nm, fuente 5v x 2000 mA, resistencia en serie 5,3 ohm, 3 W, tensión 3,6 V, 250 mA, Epileds, C.A.B.A., Argentina), un portaobjetos de vidrio para microscopio y una red de difracción Rainbow Symphony con 1000 líneas por milímetro (Reseda, CA, EE. UU.). Se utilizó una cubeta plástica de 10 mm de paso óptico, transparente a la radiación ultravioleta. La calibración del espectrofotómetro desarrollado se realizó a través de dos láseres, uno verde y otro rojo ambos del mismo proveedor (Zhang Kun, Yiwu, Jinhua, Zhejiang, China. Modelo TYLaser 303, 532 nm y 650 nm, 100 mW), y un led violeta (390 nm, 0,1 w, Patagoniatec, Buenos Aires, Argentina). Para el espectrómetro se utilizó un TI marca Motorola, modelo Moto G4 Plus, equipado con una cámara de 16 megapíxeles.

Se utilizó un espectrofotómetro HACH DR 4000 para la validación de los resultados obtenidos con el instrumento propuesto, realizando mediciones en el espectro visible.

Las extracciones asistidas por ultrasonido se llevaron a cabo utilizando un equipo Sonics Vibra-cell, modelo VCX130 (Newton, CT, EEUU) con punta de sonda de titanio (9,5 mm de diámetro, Potencia nominal 130 W, frecuencia de 20 kHz).

6.2.3 Características del dispositivo.

El espectrómetro dual presentado está formado por tres partes (Figura 48) diferenciadas funcionalmente: un pie o base, una sujeción regulable para adaptarse a cualquier modelo de teléfono, y el espectrómetro en sí. El pie aporta comodidad y estabilidad para el uso del dispositivo, manteniendo la horizontalidad del espectrómetro y la verticalidad de la cubeta de muestras. La sujeción regulable permite configurar el instrumento a cualquier modelo de TI con lo cual aporta versatilidad al dispositivo.

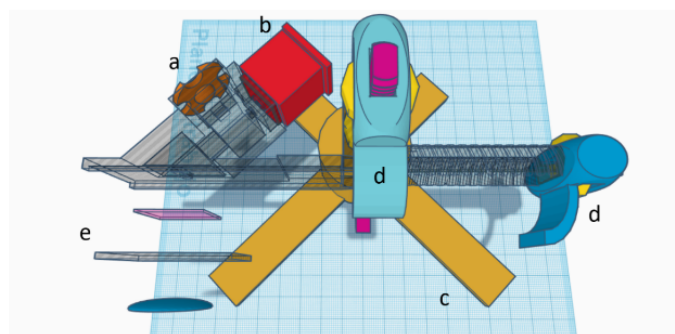


Figura 48. Esquema de la disposición del instrumento propuesto. Puede observarse el LED ultravioleta de alta potencia (a), el colimador para la luz blanca (b), el soporte del espectrómetro (c), las sujeciones para el TI (d), y los elementos ópticos (e).

El espectrómetro está formado por una red de difracción de 1000 líneas/mm, una rendija de 1,2 mm, un portacubetas y dos ventanas para el ingreso de la radiación (una a 180° de la red de

[Type here]

difracción con un colimador de 2 mm equipada con un LED blanco; y otra a 90° con una ventana de 3 mm de lado donde se ubica un LED UV de 3 watt), Figura 48. El cuerpo del espectrómetro es un tubo cuadrado de 20 mm de distancia entre la red de difracción y la cubeta. Por delante de la red de difracción se colocó un vidrio portaobjetos para sujetar y rectificar la misma. Entre el vidrio y la cámara del TI se colocó una lente convergente de 25 mm de diámetro con una longitud focal de 120 mm, la misma tiene la función de mejorar el enfoque del TI a corta distancia (Figura 49).

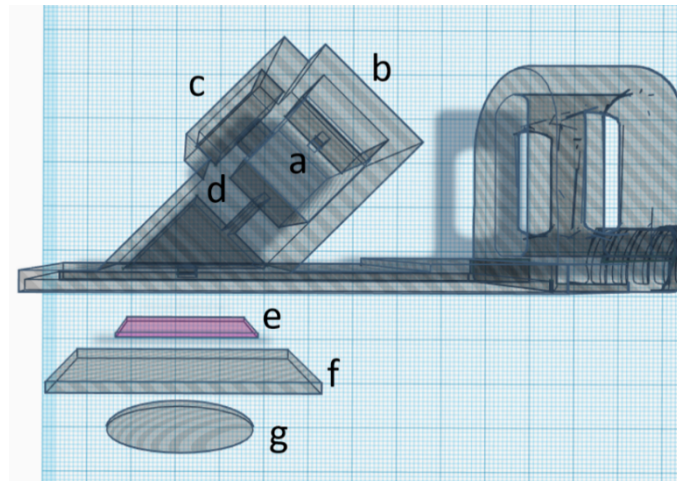


Figura 49. Detalle del espectrómetro dual donde se puede observar el portacubetas (a), la ranura de ingreso de luz blanca (b), la ventana para el LED violeta (c), la rendija de salida (d), la red de difracción (e), el cristal portaobjetos (f) y el lente de enfoque (g).

Las piezas del espectrómetro se fabricaron con PLA de color negro para evitar el ingreso de luz exterior. Para cubrir la cubeta se fabricó una tapa en color negro.

El TI se colocó en el soporte y se dejó conectado a través de un cable USB a una computadora durante todos los experimentos.

6.2.4 Captura de imágenes.

La captura de las imágenes en este dispositivo requirió una optimización previa. Debido a la diferencia en las intensidades que recibe el detector, se realizaron estudios para configuraciones de baja sensibilidad en el caso de la absorción molecular, y de alta sensibilidad para la emisión de fluorescencia.

Una vez colocada la cubeta con la muestra/estándar, se encendió el LED blanco y se configuró la cámara del teléfono con el foco en infinito, la iluminación en modo nublado, la velocidad de obturación en 1/1500 s y el valor de ISO en 100 (el valor más bajo permitido por el TI utilizado). Luego se realizaron tres capturas sucesivas para ser promediadas. Posteriormente se desconectó el LED blanco y se conectó el LED para fluorescencia. La configuración de la cámara

[Type here]

del celular para el caso de la fluorescencia se fijó con una velocidad de obturación en $\frac{1}{6}$ s y el valor de ISO fue de 400. Todas las imágenes capturadas se guardaron en formato JPEG.

6.2.5 Procesamiento de las imágenes.

Una vez capturadas todas las imágenes se separaron las de absorción y las de emisión. Luego se utilizó el software ImageJ 1.52a para extraer de las fotos la información requerida.

Inicialmente se compilaron las imágenes en un apilamiento (denominado en inglés *stack*) que incluía todas las fotos del set de determinaciones. Una vez importadas todas las imágenes al programa, se seleccionó una región de interés (ROI) de 1400 píxeles horizontales por 25 píxeles verticales (Figura 50). Esta ROI se centró con respecto al espectro de la imagen y se promediaron los 25 píxeles verticales para obtener un solo valor promedio. Luego, se guardaron los resultados de intensidades de cada una de las imágenes en un archivo de texto. Una vez realizado esto se separaron los canales R, G y B y nuevamente se guardaron cada canal en un archivo individual.

Finalmente, los resultados fueron visualizados a través de una hoja de cálculo Microsoft Excel para un estudio preliminar previo a su análisis con el software Origin 8.5.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA).

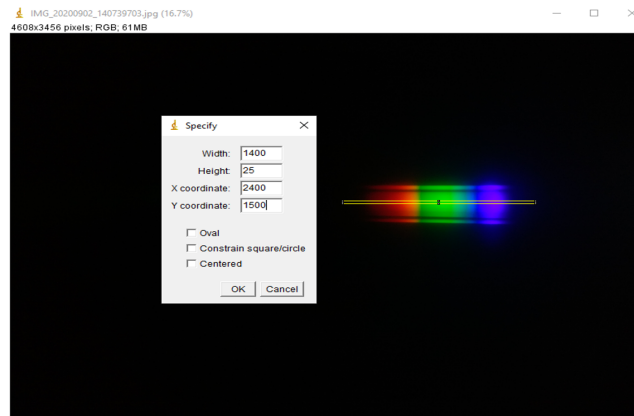


Figura 50. Detalle de una captura del espectro obtenido de la luz blanca proveniente del LED blanco, la selección de la región de interés y su posicionamiento.

6.2.6 Muestras

En este trabajo se analizaron muestras de panificados con y sin agregado de cúrcuma. Las muestras fueron adquiridas en diferentes comercios y panaderías de la ciudad de Bahía Blanca.

[Type here]

6.2.7 Procedimiento

En todos los casos las determinaciones se realizaron tanto por espectrometría de absorción como de emisión utilizando el dispositivo propuesto. De ser necesario, las muestras fueron disueltas en el solvente de extracción para poder ser cuantificadas por fluorescencia.

Se realizaron rectas de calibración utilizando estándares de curcumina disueltos en etanol en un rango de concentraciones de 0,06 a 75 mgL⁻¹. Para esto se utilizaron 1,5 mL de Etanol 96° y se agregaron 30 µL de solución etanólica de curcumina de diferentes concentraciones.

Para los estudios de extracción de la curcumina se utilizó como solvente de extracción etanol-agua en diferentes proporciones. Las muestras reales fueron pesadas (aproximadamente 1 gramo), pulverizadas en mortero y luego se le agregaron 10 mL del solvente de extracción, dado que el método de referencia indica que de esta manera se extrae la totalidad de los curcuminoides. Se utilizó una muestra fortificada (100 y 500 mg de cúrcuma comercial). Por otro lado, se realizó la misma extracción pero solamente con la cúrcuma comercial.

Como extracción de referencia se utilizó el método por calentamiento a reflujo durante 20 minutos[247], y en paralelo se procesaron ensayos de extracción sin la aplicación de calor ni ultrasonidos.

6.3 Resultados y discusión

6.3.1 Calibración del espectrómetro.

Para calibrar el espectrofotómetro se utilizaron dos punteros laser y un LED de color violeta, los cuales se colocaron en el sitio del led blanco. Se realizaron 6 fotografías de cada medida (LED blanco, laser rojo, laser verde y LED violeta). Con estas mediciones se realizó el gráfico que puede verse en la Figura 51. Conociendo la longitud de onda nominal de los láseres y la distancia en píxeles entre los picos de cada curva se obtuvo una resolución teórica de 0,267 nm/píxel. Cabe destacar que el mismo factor se obtuvo relacionando el láser verde con el rojo, el láser verde con el LED violeta y el láser rojo con el led violeta, mostrando que el aumento de longitud de onda es regular y no se distorsiona hacia los extremos del espectro (Tabla 7). Una vez hecho esto se pudo extrapolar y realizar todas las curvas en relación a su longitud de onda.

[Type here]

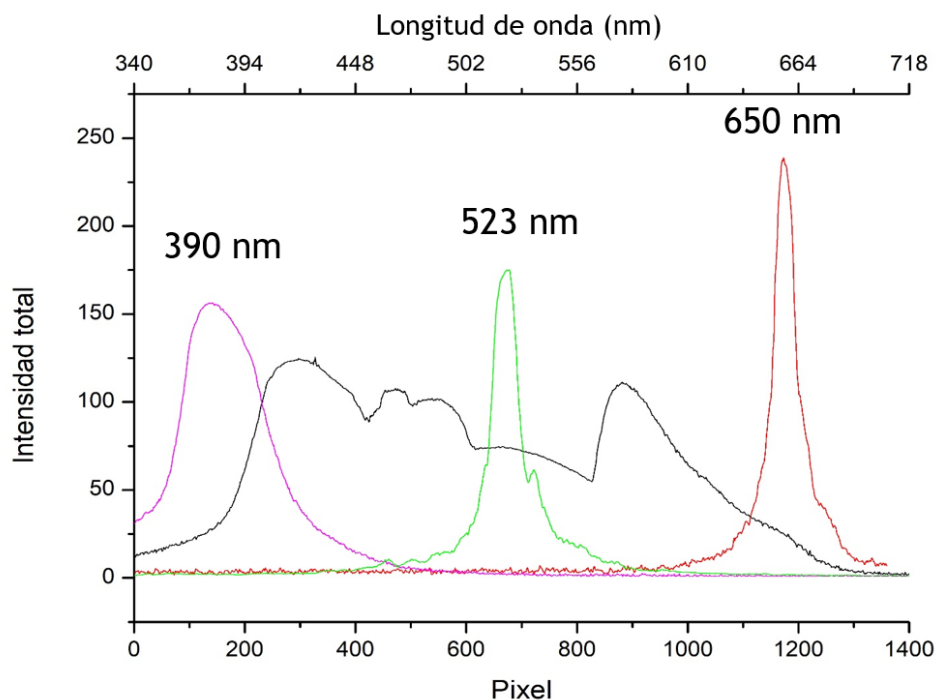


Figura 51. Calibración del dispositivo. Pueden observarse los espectros de cada una de las fuentes de luz utilizadas en este proceso detallando el número de orden de píxeles y la longitud de onda.

Tabla 7. Relación de longitudes de onda y número de píxel en el proceso de calibración.

	Pixel	Longitud de onda (nm)		Relación nm/píxel.
Violeta	247	390	Vio-Ver	0,271511
Verde	770	532	Vio-Rojo	0,267215
Rojo	1220	650	Ver-Rojo	0,262222

Utilizando los datos mencionados en la Tabla 7 se realizaron mediciones para obtener los espectros de absorción y emisión de los curcuminoides. La Figura 52 muestra los espectros de absorción obtenidos. De estos resultados se extrajo una curva de calibrado con la ecuación $Abs = (0,022 \pm 3,06E-4) [Conc. \text{ Curcuminoides}] + (-0,015 \pm 0,005)$, con un coeficiente de determinación $R^2 = 0,997$ (Figura 53), siendo su rango lineal de 0,5 a 50 mgL^{-1} .

[Type here]

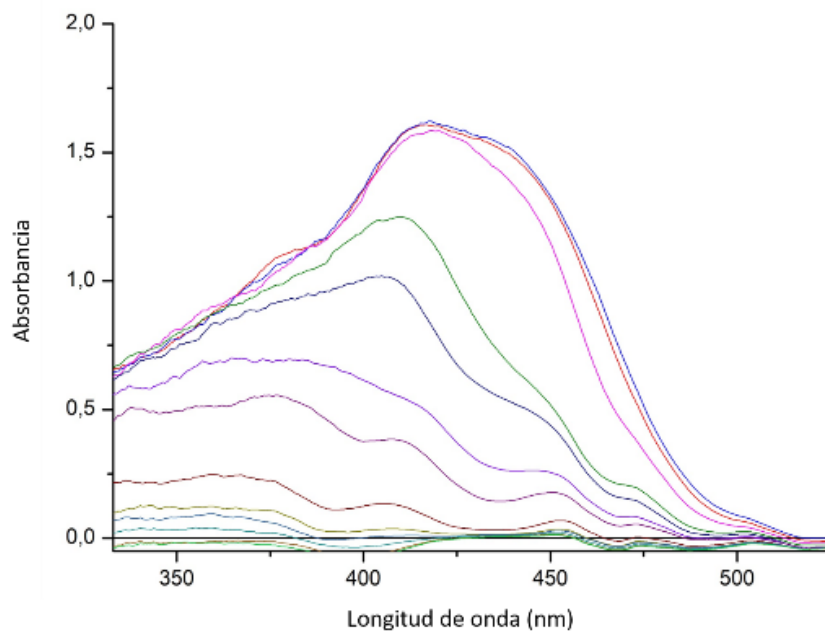


Figura 52. Espectros de absorción de los curcuminoides.

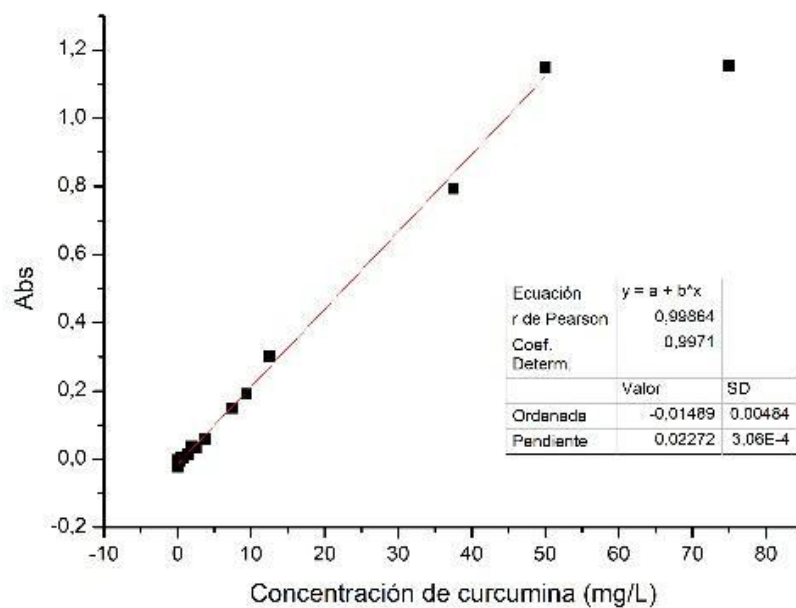


Figura 53. Recta de calibración para el espectro UV VIS a 431 nm.

De la misma forma se obtuvieron los espectros de emisión utilizando para su excitación una longitud de onda de 390 nm (Figura 54). La recta de calibración obtenida para la fluorescencia se puede ver en la Figura 55, donde se obtiene una ecuación de la forma $F = (53,32 \pm 1,86)$

[Type here]

[Conc. Curcuminoides] + (2,56±0,68), con un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9927$, y con un rango lineal entre 0,06 y 0,75 mgL^{-1} .

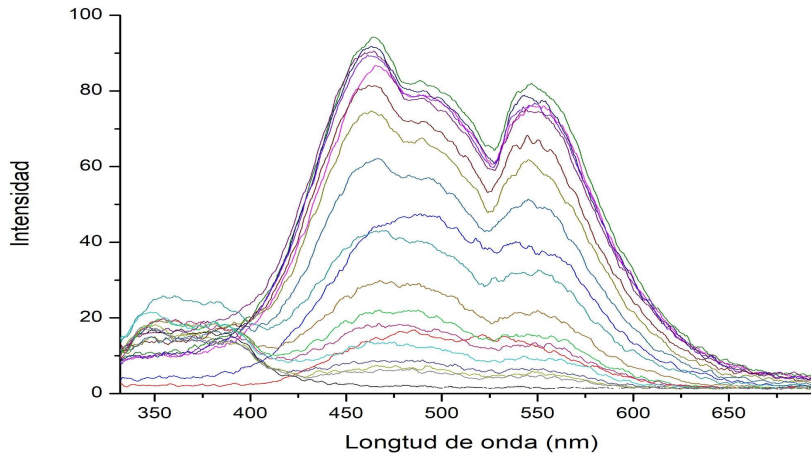


Figura 54. Espectros de emisión graficados para la realización de la curva de calibrado.

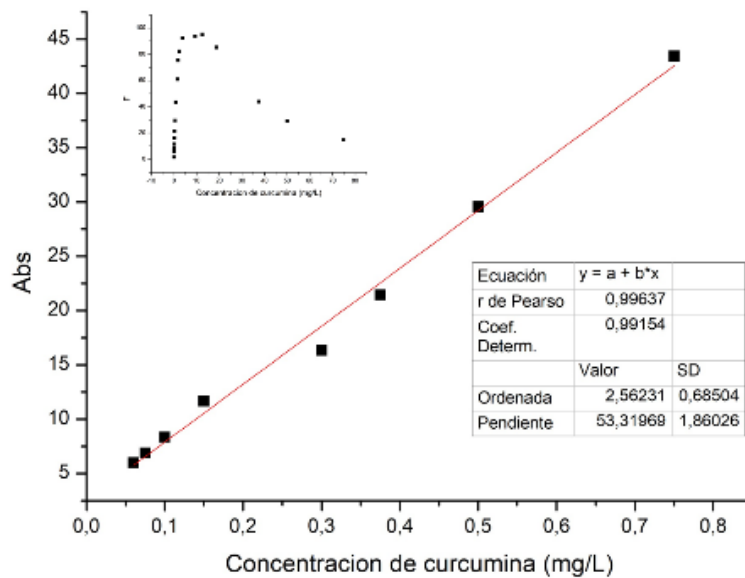


Figura 55. Recta de calibración para fluorescencia. En el interior puede observarse la intensidad de fluorescencia en todo el rango de concentraciones estudiado.

6.3.2 Estudios de solubilidad de la cúrcuma en el solvente de extracción.

Se realizaron ensayos para estudiar la solubilidad de la cúrcuma a diferentes tiempos en una solución de agua-etanol (1:3). En ellos se pudo comprobar que la cúrcuma en polvo es

[Type here]

extremadamente soluble en el solvente utilizado. En dicho ensayo los valores de absorbancia obtenidos en función del tiempo de contacto se pueden ver en la Figura 56, teniendo como resultado que desde el comienzo del ensayo la absorbancia permaneció constante.

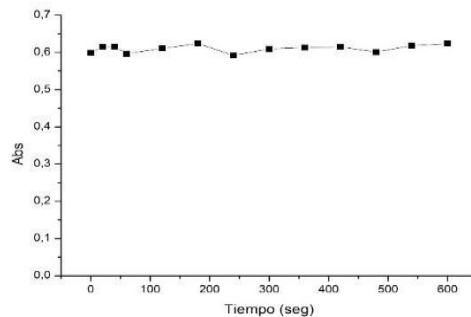


Figura 56. Evolución de la extracción de cúrcuma con etanol.

6.3.3 Estudio de extracción de curcumina por ultrasonidos.

6.3.3.1 Optimización de la potencia y tiempo de ciclos.

Se realizaron estudios variando la potencia de la sonda de ultrasonido, entre 70 w y 120 w, siendo de 91 watt la potencia seleccionada. Los ciclos de encendido (también conocidos como ciclos) se analizaron comenzando desde 5 segundos y llegaron hasta 20 segundos ya que por encima de este tiempo la sonda se apaga automáticamente por exceso de temperatura. Por lo tanto para ensayos posteriores la potencia se configuró en 91 watt (70% de la potencia de salida) y los ciclos fueron de 20 segundos de encendido (*on*) y 10 segundos de apagado (*off*).

6.3.3.2 Estudios del tiempo de sonicación.

Los ensayos se realizaron entre 0 y 600 segundos. Los resultados se observan en la Figura 57, en la cual se aprecia que la intensidad de fluorescencia aumenta hasta los 100 segundos de sonicación a partir de los cuales se mantiene casi constante. Superados los 360 segundos, la fluorescencia comienza a decaer, debido a la degradación de los productos extraídos. Por lo tanto, el tiempo óptimo de extracción se fijó en 100 segundos.

[Type here]

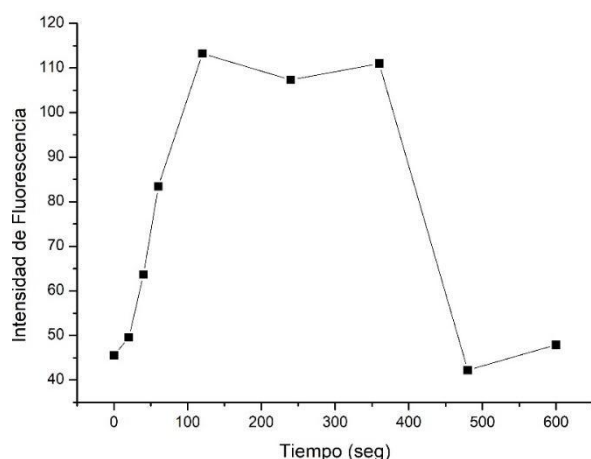


Figura 57. Optimización del tiempo de sonicación.

6.3.3.3 Efecto del solvente de extracción.

Un estudio del solvente de extracción fue realizado en muestras de panificados. Se realizaron ensayos con diferentes proporciones de solvente agua:etanol (3:1, 1:1 y 1:3), aplicando ultrasonido y calentamiento a reflujo a la extracción. Como se observa en la Figura 58 la mayor eficiencia de extracción fue obtenida para la relación 1:3 (agua:etanol) utilizando ultrasonidos. La extracción asistida por ultrasonidos con una relación 3:1 (agua:etanol) presentó elevada turbidez lo cual generó problemas al realizar las mediciones tanto de fluorescencia como de absorbancia. Además, se efectuó un estudio del solvente de extracción en una muestra sin aplicación de energía externa (calor o ultrasonidos).

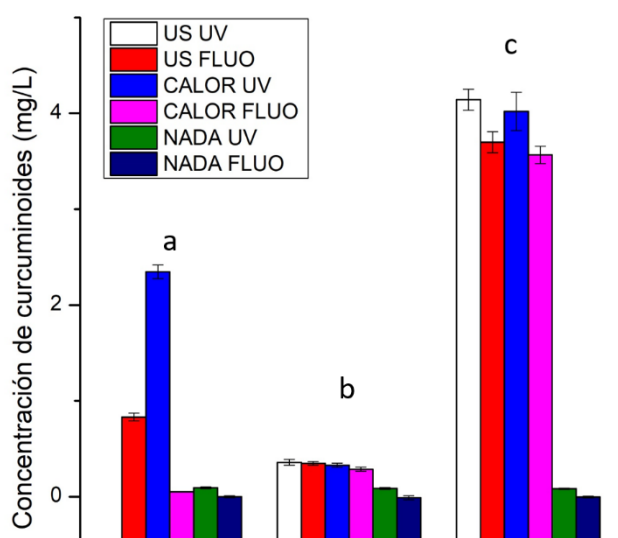


Figura 58. Comparación de métodos para la extracción de curcuminoides para diferentes relaciones agua:etanol. a) 3:1, b) 1:1 y c) 1:3.

[Type here]

6.3.4 Validación del dispositivo

Para la validación del dispositivo se compararon las determinaciones realizadas con el instrumento propuesto y en un espectrofotómetro HACH DR 4000. Los resultados de la misma pueden verse en las Figura 60. Se realizó un test t para comparar los valores medios obtenidos, el valor de $t_{\text{calculado}}$ fue de 0,309 mientras que el t_{tabulado} fue de 2,13 con $\alpha=0,05$, lo cual indica que no existen diferencias significativas entre ambos dispositivos. Aunque, el dispositivo propuesto presenta una desviación estándar levemente superior.

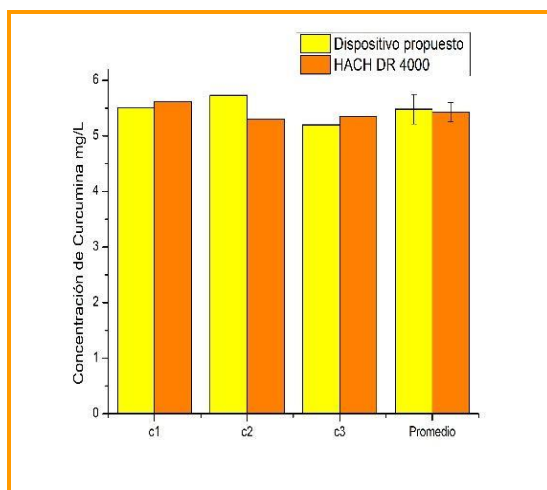


Figura 59. Mediciones realizadas con el dispositivo propuesto y un espectrofotómetro a muestras reales de panificados.

6.3.5 Aplicación a muestras reales.

Se realizaron estudios sobre muestras de panificados, pastas secas y cúrcuma en polvo (condimento).

Se llevó adelante la extracción en 5 muestras de pastas secas de diferentes fabricantes (A–E), dando resultados por debajo del límite de detección en todos los casos. Este estudio se llevó a cabo debido a que el código alimentario argentino[138] indica que las pastas secas deben declarar obligatoriamente la presencia de cúrcuma entre los ingredientes. Además, se analizaron dos muestras de panificados conteniendo cúrcuma (F y G) y una muestra de condimento (H) (Tabla 8).

[Type here]

Tabla 8. Comparación de métodos para la determinación de curcumina.		
Curcumina		
Muestra	Método propuesto	Método de referencia
	Encontrado*(DS)** [mg L ⁻¹]	Encontrado*(DS)** [mg L ⁻¹]
A	ND (--)	ND (--)
B	ND (--)	ND (--)
C	ND (--)	ND (--)
D	ND (--)	ND (--)
E	ND (--)	ND (--)
F	5,08 (0,28)	5,10 (0,14)
G	19,77 (0,51)	18,98 (0,34)
H	5,50 (0,65)	5,83 (0,45)

*: Promedio de tres mediciones
**: Desvío estándar.

6.4 Conclusión.

Se realizó el diseño, calibración y validación de un dispositivo para llevar a cabo determinaciones fluorimétricas y espectrofotométricas basado en detección por imagen con un TI como detector. En los estudios efectuados se pudo demostrar la funcionalidad del dispositivo determinando la concentración de cúrcuminoides en diferentes muestras de alimentos. Al mismo tiempo se optimizó un procedimiento de extracción para la curcumina en muestras de alimentos.

Las potencialidades del instrumento propuesto deben ser evaluadas en un futuro para resolver sistemas complejos. El espectrómetro dual se presentaría como una herramienta accesible, innovadora y práctica para la realización de estudios de fusión de datos.

[Type here]

7 Capítulo 7

Conclusiones

A lo largo de la presente tesis doctoral se desarrollaron una serie de dispositivos portátiles basados en TI, los cuales arrojaron las siguientes conclusiones:

En el primer caso se desarrolló un μ PAD simple, portátil, económico y fácil de usar para la determinación simultánea de fluoruro y nitrito en muestras de agua. Es el primer μ PAD reportado para la determinación de fluoruro. Este nuevo dispositivo combina las ventajas de utilizar materiales biodegradables, así como volúmenes mínimos de muestra y reactivos. Con este sistema el procedimiento analítico se miniaturizó y el pretratamiento de la muestra, como paso previo a la detección, no fue necesario. El dispositivo fue aplicado con éxito para la determinación de ambos analitos en muestras de diferentes orígenes con límites de detección por debajo de los valores recomendados por la Comisión Europea y por el Código Alimentario Argentino, demostrando no solo la aplicabilidad y los beneficios de esta herramienta analítica, sino también su versatilidad en un amplio campo de aplicación.

En el segundo trabajo, el dispositivo diseñado conforma un sistema de detección versátil, económico y portátil. Es una excelente opción para determinaciones nefelométricas y fluorimétricas en muestras reales de una manera rápida y precisa. En comparación con los métodos fluorimétricos y nefelométricos de referencia, que requieren equipos de laboratorio convencionales (voluminosos, pesados y sensibles a movimientos), el dispositivo propuesto proporciona un sistema portátil y económico para las determinaciones *in situ*, especialmente en regiones de recursos limitados. El dispositivo fue desarrollado utilizando tecnología de impresión 3D y empleando la cámara del teléfono inteligente para completar la determinación. La posibilidad de tener diversas fuentes de radiación amplía las posibles aplicaciones de este sistema. El dispositivo descrito puede adaptarse a cualquier modelo de teléfono inteligente. En este trabajo, se determinó la concentración de quinina en bebidas tónicas, así como la concentración de sulfato en muestras de agua potable por debajo de los valores máximos permitidos por la Directiva 98/83/CE del Consejo Europeo.

En el tercero de los trabajos se desarrolló un espectrofotómetro impreso en 3D simple y económico basado en la detección mediante teléfonos inteligentes. La principal ventaja de este enfoque es que cualquier tipo de TI se puede conectar fácilmente debido a su mecanismo simple. El dispositivo descrito funcionó como un espectrofotómetro convencional que

[Type here]

proporciona una herramienta asequible para realizar espectros. La fuente de luz intercambiable permite una fácil calibración del sistema. El dispositivo portátil descrito demostró ser adecuado para realizar estudios cinéticos para la evaluación de soluciones desinfectantes de hipoclorito de sodio recomendadas por la OMS. Se utilizó un software de código abierto para el procesamiento de imagen y una hoja de cálculo para obtener gráficos espectrales. Además, se creó un sensor simple y práctico basado en papel para controlar la concentración correcta de diluciones de lejía. Este dispositivo económico y fácil de usar es importante en términos de desinfección de las superficies en el contexto de la pandemia de COVID-19.

En el cuarto trabajo se realizó el diseño, calibración y validación de un dispositivo para la realización de determinaciones fluorimétricas y espectrofotométricas basado en detección por imagen con un TI como detector. En los estudios realizados se pudo demostrar la funcionalidad del dispositivo determinando la concentración de cúrcuma en diferentes muestras de alimentos. Al mismo tiempo se optimizó un procedimiento de extracción para curcuminoides en muestras de panificados. Las potencialidades del instrumento propuesto deben ser evaluadas en un futuro para resolver sistemas complejos. El espectrómetro dual se presentaría como una herramienta accesible, innovadora y práctica para la realización de estudios de fusión de datos.

[Type here]

8 Producción científica

Publicaciones

- “Micropaper-based analytical device (μ PAD) for the simultaneous determination of nitrite and fluoride using a Smartphone”, Ezequiel Vidal, Anabela S. Lorenzetti, Adriana G. Lista, Claudia E. Domini. *Microchemical Journal*, 2018, 147, 467-473. Elsevier. doi:10.1016/j.microc.2018.08.042.

Microchemical Journal 143 (2018) 467–473

Contents lists available at ScienceDirect

Microchemical Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/microc

Micropaper-based analytical device (μ PAD) for the simultaneous determination of nitrite and fluoride using a smartphone

Ezequiel Vidal, Anabela S. Lorenzetti, Adriana G. Lista^a, Claudia E. Domini^a

INQUISUR, Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur (UNS)-CONICET, Av. Alem 1253, 8000 Bahía Blanca, Argentina

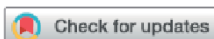
ARTICLE INFO

Keywords
 μ PAD
Nitrite
Fluoride
RGB
Smartphone

ABSTRACT

The design, optimization and evaluation of a micro paper-based analytical device (μ PAD) for the simultaneous determination of fluoride and nitrite in real water samples was developed. In order to create hydrophilic and hydrophobic zones on the laboratory filter paper device, a wax ink printer was used. The μ PAD has four reaction zones for each analyte where the respective colorimetric reactions took place using the SPADNS method and Griess method for fluoride and nitrite respectively. A Smartphone was used to capture the corresponding images which were then converted to the RGB colour space by the software ImageJ using a personal computer. Under the optimal conditions, the linear range was 0.23–2.26 mg L⁻¹ for fluoride with limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of 0.13 mg L⁻¹ and 0.25 mg L⁻¹. The working range for nitrite was 0.05–10.0 mg L⁻¹ with LOD of 0.03 mg L⁻¹ and LOQ 0.13 mg L⁻¹. The μ PAD was used to determine the analytes in water samples obtaining satisfactory results in both cases. The validation of fluoride determination was performed comparing the μ PAD with the reference method and for nitrite determination, a recovery study was carried out. In both cases, the obtained results demonstrated a good agreement.

- “New, inexpensive and simple 3D printable device for nephelometric and fluorimetric determination based on smartphone sensing.” Ezequiel Vidal, Anabela Lorenzetti, Miguel Angel Aguirre, Antonio Canals, Claudia Domini. *RSC Adv.*, 2020, 10, 19713-19719. doi: 10.1039/D0RA02975K



Cite this: *RSC Adv.* 2020, **10**, 19713

New, inexpensive and simple 3D printable device for nephelometric and fluorimetric determination based on smartphone sensing †

Ezequiel Vidal, ^{†*}^a Anabela S. Lorenzetti, ^{†*}^a Miguel Ángel Aguirre, ^b Antonio Canals^b and Claudia E. Domini ^{*a}

A new, inexpensive and easy to use 3D printable device was developed for nephelometric and fluorimetric determination. Its applicability was tested for the quantification of quinine in tonic drinks and sulfate in natural water with good analytical accuracy. In this way, sulfate determination was carried out by nephelometry using a red LED, while quinine was determined using a blue LED by fluorimetry. A smartphone camera was used to take the pictures and afterwards transform them into the RGB color space using the software ImageJ by a personal computer. The linear range was 2.0–50.0 mg L⁻¹ for sulfate with a LOD of 0.13 mg L⁻¹, and the corresponding quantification limit (LOQ) was 0.43 mg L⁻¹. The linear range for quinine was from 0.42 to 3.10 mg L⁻¹. The LOD and LOQ were 0.11 mg L⁻¹ and 0.38 mg L⁻¹, respectively.

Received 2nd April 2020
Accepted 12th May 2020

DOI: 10.1039/d0ra02975k
[rsc.li/rsc-advances](https://doi.org/10.1039/d0ra02975k)

- “Use of Universal 3D-Printed Smartphone Spectrophotometer to Develop a Time-Based Analysis for Hypochlorite”. Ezequiel Vidal, Anabela Lorenzetti, Carlos D. García, Claudia Domini. In Press, Journal Pre-proof. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338249>



Analytica Chimica Acta

Available online 26 January 2021, 338249

In Press, Journal Pre-proof



Use of Universal 3D-Printed Smartphone Spectrophotometer to Develop a Time-Based Analysis for Hypochlorite

Ezequiel Vidal ^a ¹, Anabela S. Lorenzetti ^a, ¹, Carlos D. Garcia ^b, Claudia E. Domini ^a

Presentaciones a congresos

- Exposición oral en el 9° Congreso Argentino de Química Analítica, Rio Cuarto, Córdoba; 07 – 10 Noviembre de 2017; “Desarrollo de un dispositivo microanalítico basado en papel (μ PAD) para la determinación simultánea de fluoruros y nitrito en agua utilizando un teléfono inteligente”. Rio Cuarto, Córdoba. 07 al 10 de Noviembre de 2017.

[Type here]

- Exposición oral en el 10° Congreso Argentino de Química Analítica, Santa Rosa, La Pampa; 17 - 20 Septiembre de 2017; “ Desarrollo de un dispositivo simple, económico y 3D imprimible para determinaciones turbidimétricas y fluorimétricas basadas en teléfonos celulares inteligentes: Determinación de sulfatos y quinina”. Santa Rosa, La Pampa. 17-20 de setiembre de 2019.
- Exposición de trabajo en modalidad de poster en el 10° Congreso Argentino de Química Analítica, Santa Rosa, La Pampa; 17 - 20 Septiembre de 2017; “Desarrollo de un método simple, sensible y totalmente portátil para la determinación de mercurio en aguas subterráneas”. Santa Rosa, La Pampa. 17-20 de setiembre de 2019.
- Exposición de trabajo en modalidad de poster en el 10° Congreso Argentino de Química Analítica, Santa Rosa, La Pampa; 17 - 20 Septiembre de 2017; “Determinación de cloro residual utilizando nanopartículas de carbono en un sistema de detección basado en imágenes”. Santa Rosa, La Pampa. 17-20 de setiembre de 2019.
- Exposición de trabajo en modalidad de poster en el 4° Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología Ambiental, Florencio Varela, Buenos Aires, Argentina. 2 – 5 Diciembre de 2019; “Remediación comparativa de fluoruros en aguas utilizando diferentes polimorfos de TiO_2 ”. Florencio Varela, Buenos Aires, 2-5 de diciembre de 2019.

[Type here]

Bibliografía

- [1] M. Rezazadeh, S. Seidi, M. Lid, S. Pedersen-Bjergaard, and Y. Yamini, "The modern role of smartphones in analytical chemistry," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 118, pp. 548–555, 2019.
- [2] J. H. Choi and H. J. Lee, "Facets of simplicity for the smartphone interface: A structural model," *Int. J. Hum. Comput. Stud.*, vol. 70, no. 2, pp. 129–142, 2012.
- [3] M. A. Hossain, J. Canning, S. Ast, P. J. Rutledge, R. Webster, and A. Jamalipour, "Centralised and portable 'network forensics' using smartphone-based diagnostics: Case study - The mapping of tap water pH across Sydney, Australia," *2014 IEEE Photonics Conf. IPC 2014*, vol. 1, no. d, pp. 564–565, 2014.
- [4] S. Dutta, "Point of care sensing and biosensing using ambient light sensor of smartphone: Critical review," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 110, pp. 393–400, 2019.
- [5] A. S. Tsagkaris *et al.*, "Critical assessment of recent trends related to screening and confirmatory analytical methods for selected food contaminants and allergens," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 121, p. 115688, 2019.
- [6] S. E. Seo *et al.*, "Smartphone with optical, physical, and electrochemical nanobiosensors," *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 77, pp. 1–11, 2019.
- [7] L. D. A. Viana, D. C. Tomaz, R. N. Martins, J. T. F. Rosas, F. F. L. dos Santos, and M. F. Portes, "Optical Sensors for Precision Agriculture: An Outlook," *J. Exp. Agric. Int.*, vol. 35, no. 2, pp. 1–9, 2019.
- [8] E. Carrilho, A. W. Martinez, and G. M. Whitesides, "Understanding wax printing: A simple micropatterning process for paper-based microfluidics," *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 16, pp. 7091–7095, 2009.
- [9] D. Zhang and Q. Liu, "Biosensors and bioelectronics on smartphone for portable biochemical detection," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 75, pp. 273–284, 2016.
- [10] J. Il Hong and B. Y. Chang, "Development of the smartphone-based colorimetry for multi-analyte sensing arrays," *Lab Chip*, vol. 14, no. 10, pp. 1725–1732, 2014.
- [11] M. Granica and Ł. Tymecki, "Analytical aspects of smart (phone) fluorometric measurements," *Talanta*, vol. 197, no. January, pp. 319–325, 2019.
- [12] R. Bogucki *et al.*, "A 3D-Printable Dual Beam Spectrophotometer with Multiplatform Smartphone Adaptor," *J. Chem. Educ.*, vol. 96, pp. 1527–1531, 2019.
- [13] A. Friedrichs, J. A. Busch, H. J. van der Woerd, and O. Zielinski, "SmartFluo: A method and affordable adapter to measure chlorophyll a fluorescence with smartphones," *Sensors (Switzerland)*, vol. 17, no. 4, pp. 1–14, 2017.
- [14] K. E. McCracken and J. Y. Yoon, "Recent approaches for optical smartphone sensing in resource-limited settings: A brief review," *Anal. Methods*, vol. 8, no. 36, pp. 6591–6601, 2016.
- [15] N. Lopez-Ruiz *et al.*, "Smartphone-based simultaneous pH and nitrite colorimetric determination for paper microfluidic devices," *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 19, pp.

[Type here]

- 9554–9562, 2014.
- [16] H. N. Chan *et al.*, “Simple, Cost-Effective 3D Printed Microfluidic Components for Disposable, Point-of-Care Colorimetric Analysis,” *ACS Sensors*, vol. 1, no. 3, pp. 227–234, 2016.
- [17] T. Guo, R. Patnaik, K. Kuhlmann, A. J. Rai, and S. K. Sia, “Smartphone dongle for simultaneous measurement of hemoglobin concentration and detection of HIV antibodies,” *Lab Chip*, vol. 15, no. 17, pp. 3514–3520, 2015.
- [18] V. Oncescu, M. Mancuso, and D. Erickson, “Cholesterol testing on a smartphone,” *Lab Chip*, vol. 14, no. 4, pp. 759–763, 2014.
- [19] M. Pohanka, “Photography by cameras integrated in smartphones as a tool for analytical chemistry represented by an butyrylcholinesterase activity assay,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 15, no. 6, pp. 13752–13762, 2015.
- [20] T. San Park, C. Baynes, S. I. Cho, and J. Y. Yoon, “Paper microfluidics for red wine tasting,” *RSC Adv.*, vol. 4, no. 46, pp. 24356–24362, 2014.
- [21] A. Bayram, N. Horzum, A. U. Metin, V. Kilic, and M. E. Solmaz, “Colorimetric bisphenol-a detection with a portable smartphone-based spectrometer,” *IEEE Sens. J.*, vol. 18, no. 14, pp. 5948–5955, 2018.
- [22] A. Rico-Yuste, V. González-Vallejo, E. Benito-Peña, T. De Las Casas Engel, G. Orellana, and M. C. Moreno-Bondi, “Furfural Determination with Disposable Polymer Films and Smartphone-Based Colorimetry for Beer Freshness Assessment,” *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 7, pp. 3959–3966, 2016.
- [23] M. Ra, M. S. Muhammad, C. Lim, S. Han, C. Jung, and W. Y. Kim, “Smartphone-Based Point-of-Care Urinalysis under Variable Illumination,” *IEEE J. Transl. Eng. Heal. Med.*, vol. 6, no. September 2017, 2018.
- [24] L. Shen, J. A. Hagen, and I. Papautsky, “Point-of-care colorimetric detection with a smartphone,” *Lab Chip*, vol. 12, no. 21, pp. 4240–4243, 2012.
- [25] M. Y. Jia, Q. S. Wu, H. Li, Y. Zhang, Y. F. Guan, and L. Feng, “The calibration of cellphone camera-based colorimetric sensor array and its application in the determination of glucose in urine,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 74, pp. 1029–1037, 2015.
- [26] A. K. Yetisen, J. L. Martinez-Hurtado, A. Garcia-Melendrez, F. Da Cruz Vasconcellos, and C. R. Lowe, “A smartphone algorithm with inter-phone repeatability for the analysis of colorimetric tests,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 196, pp. 156–160, 2014.
- [27] L. F. Capitán-Vallvey, N. López-Ruiz, A. Martínez-Olmos, M. M. Erenas, and A. J. Palma, “Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 899, pp. 23–56, 2015.
- [28] D. Quesada-González and A. Merkoçi, “Mobile phone-based biosensing: An emerging ‘diagnostic and communication’ technology,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 92, pp. 549–562, 2017.
- [29] H. Zhu *et al.*, “Cost-effective and rapid blood analysis on a cell-phone,” *Lab Chip*, vol. 13, no. 7, pp. 1282–1288, 2013.
- [30] A. Amirjani and D. H. Fatmehsari, “Colorimetric detection of ammonia using

[Type here]

- smartphones based on localized surface plasmon resonance of silver nanoparticles," *Talanta*, vol. 176, no. August 2017, pp. 242–246, 2018.
- [31] R. Álvarez-Díduk, J. Orozco, and A. Merkoçi, "Paper strip-embedded graphene quantum dots: A screening device with a smartphone readout," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–9, 2017.
- [32] K. Yang, H. Peretz-Soroka, Y. Liu, and F. Lin, "Novel developments in mobile sensing based on the integration of microfluidic devices and smartphones," *Lab Chip*, vol. 16, no. 6, pp. 943–958, 2016.
- [33] N. Alizadeh, A. Salimi, and R. Hallaj, "Mimicking peroxidase activity of Co₂(OH)2CO₃-CeO₂ nanocomposite for smartphone based detection of tumor marker using paper-based microfluidic immunodevice," *Talanta*, vol. 189, no. January, pp. 100–110, 2018.
- [34] H. Guner *et al.*, "A smartphone based surface plasmon resonance imaging (SPRi) platform for on-site biodetection," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 239, pp. 571–577, 2017.
- [35] S. Y. Kahu, R. B. Raut, and K. M. Bhurchandi, "Review and evaluation of color spaces for image/video compression," *Color Res. Appl.*, vol. 44, no. 1, pp. 8–33, 2019.
- [36] W D Wright, "A re-determination of the trichromatic coefficients of the spectral colours," *Trans. Opt. Soc.*, vol. 141, 1929.
- [37] E. Kehoe and R. L. Penn, "Introducing colorimetric analysis with camera phones and digital cameras: An activity for high school or general chemistry," *J. Chem. Educ.*, vol. 90, no. 9, pp. 1191–1195, 2013.
- [38] S. Šafranko, P. Živković, A. Stanković, M. Medvidović-Kosanović, A. Széchenyi, and S. Jokić, "Designing ColorX, Image Processing Software for Colorimetric Determination of Concentration, to Facilitate Students' Investigation of Analytical Chemistry Concepts Using Digital Imaging Technology," *J. Chem. Educ.*, 2018.
- [39] E. K. Grasse, M. H. Torcasio, and A. W. Smith, "Teaching UV-Vis Spectroscopy with a 3D-Printable Smartphone Spectrophotometer," *J. Chem. Educ.*, vol. 93, no. 1, pp. 146–151, 2016.
- [40] A. Roda, E. Michelini, M. Zangheri, M. Di Fusco, D. Calabria, and P. Simoni, "Smartphone-based biosensors: A critical review and perspectives," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 79, pp. 317–325, 2016.
- [41] T. Alawsi and Z. Al-Bawi, "A review of smartphone point-of-care adapter design," *Eng. Reports*, vol. 1, no. 2, pp. 1–30, 2019.
- [42] D. A. Skoog, D. M. West, J. Holler, and S. R. Crouch, *Fundamentos de Química Analítica*. 2015.
- [43] S. R. C. Douglas A. Skoog, F James Holler, *Principles of Instrumental Analysis*, vol. 2017-October. 2018.
- [44] E. H. Kim and B. K. Kim, "Diffraction grating in noncrosslinked polymers," *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. 42, no. 4, pp. 613–620, 2004.
- [45] L. J. Wang *et al.*, "Smartphone Optosensing Platform Using a DVD Grating to Detect

[Type here]

- Neurotoxins," *ACS Sensors*, vol. 1, no. 4, pp. 366–373, 2016.
- [46] K. D. Long, H. Yu, and B. T. Cunningham, "Smartphone instrument for portable enzyme-linked immunosorbent assays," *Biomed. Opt. Express*, vol. 5, no. 11, p. 3792, 2014.
- [47] Z. J. Smith *et al.*, "Cell-phone-based platform for biomedical device development and education applications," *PLoS One*, vol. 6, no. 3, 2011.
- [48] M. A. Hossain, J. Canning, K. Cook, and A. Jamalipour, "Optical fiber smartphone spectrometer," *Opt. Lett.*, vol. 41, no. 10, p. 2237, 2016.
- [49] E. H. M. R., A. A. L., and O. R. B. E., "A Homemade Cost Effective Raman Spectrometer with High Performance," *J. Lab. Chem. Educ.*, vol. 3, no. 4, pp. 67–75, 2015.
- [50] Y. Woo and Y. G. Ju, "Fabrication of a high-resolution smartphone spectrometer for education using a 3D printer," *Phys. Educ.*, vol. 54, no. 1, 2019.
- [51] M. D. Abràmoff, P. J. Magalhães, and S. J. Ram, "Image processing with imageJ," *Biophotonics Int.*, vol. 11, no. 7, pp. 36–41, 2004.
- [52] J. R. Lakowicz, "Principles of fluorescence spectroscopy," *Princ. Fluoresc. Spectrosc.*, no. June, pp. 1–954, 2006.
- [53] H. Yu, Y. Tan, and B. T. Cunningham, "Smartphone fluorescence spectroscopy," *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 17, pp. 8805–8813, 2014.
- [54] A. Rasooly and K. E. Herold, "Mobile health technologies: Methods and protocols," *Mob. Heal. Technol. Methods Protoc.*, vol. 1256, pp. 1–496, 2015.
- [55] B. Valeur, *Related Titles from WILEY-VCH Analytical Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas Handbook of Analytical Techniques Single-Molecule Detection in Solution. Methods and Applications*, vol. 8. 2001.
- [56] M. L. Scala-Benuzzi *et al.*, "Ethinylestradiol quantification in drinking water sources using a fluorescent paper based immunosensor," *Microchem. J.*, vol. 141, no. 2017, pp. 287–293, 2018.
- [57] T. H. Ulep and J. Y. Yoon, "Challenges in paper-based fluorogenic optical sensing with smartphones," *Nano Converg.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–11, 2018.
- [58] E. Petryayeva and W. R. Algar, "Multiplexed homogeneous assays of proteolytic activity using a smartphone and quantum dots," *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 6, pp. 3195–3202, 2014.
- [59] N. A. Meredith, C. Quinn, D. M. Cate, T. H. Reilly, J. Volckens, and C. S. Henry, "Paper-based analytical devices for environmental analysis," *Analyst*, vol. 141, no. 6, pp. 1874–1887, 2016.
- [60] Y. Zhu and Q. Fang, "Analytical detection techniques for droplet microfluidics-A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 787, pp. 24–35, 2013.
- [61] H. Zhu, U. Sikora, and A. Ozcan, "Quantum dot enabled detection of Escherichia coli using a cell-phone," *Analyst*, vol. 137, no. 11, pp. 2541–2544, 2012.
- [62] G. Rateni, P. Dario, and F. Cavallo, "Smartphone-based food diagnostic technologies: A

[Type here]

- review," *Sensors (Switzerland)*, vol. 17, no. 6, 2017.
- [63] J. A. A. Pascua, A. J. A. Prado, B. R. B. Solis, A. P. Cid-Andres, and C. J. B. Cambiador, "Trends in fabrication, data gathering, validation, and application of molecular fluorometer and spectrofluorometer," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 220, p. 116837, 2019.
- [64] J. Canning, A. Lau, M. Naqshbandi, I. Petermann, and M. J. Crossley, "Measurement of fluorescence in a rhodamine-123 doped self-assembled 'giant' mesostructured silica sphere using a smartphone as optical hardware," *Sensors*, vol. 11, no. 7, pp. 7055–7062, 2011.
- [65] J. Canning, M. Naqshbandi, and M. J. Crossley, "Measurement of Rhodamine B absorption in self-assembled silica microwires using a Tablet as the optical source," *Third Asia Pacific Opt. Sensors Conf.*, vol. 8351, p. 83512E, 2012.
- [66] M. Granica and Ł. Tymecki, "Analytical aspects of smart (phone) fluorometric measurements," *Talanta*, vol. 197, pp. 319–325, 2019.
- [67] F. Li, Y. Bao, D. Wang, W. Wang, and L. Niu, "Smartphones for sensing," *Sci. Bull.*, vol. 61, no. 3, pp. 190–201, 2016.
- [68] R. J. Xie, N. Hirotsuki, K. Sakuma, and N. Kimura, "White light-emitting diodes (LEDs) using (oxy)nitride phosphors," *J. Phys. D: Appl. Phys.*, vol. 41, no. 14, 2008.
- [69] Y. Wang *et al.*, "Smartphone spectrometer for colorimetric biosensing," *Analyst*, vol. 141, no. 11, pp. 3233–3238, 2016.
- [70] M. Arafat Hossain, J. Canning, S. Ast, K. Cook, P. J. Rutledge, and A. Jamalipour, "Combined 'dual' absorption and fluorescence smartphone spectrometers," *Opt. Lett.*, vol. 40, no. 8, p. 1737, 2015.
- [71] K. D. Long, H. Yu, and B. T. Cunningham, "Smartphone spectroscopy: three unique modalities for point-of-care testing," *Next-Generation Spectrosc. Technol. VIII*, vol. 9482, p. 94820J, 2015.
- [72] C. L. Manzanares Palenzuela and M. Pumera, "(Bio)Analytical chemistry enabled by 3D printing: Sensors and biosensors," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 103, pp. 110–118, 2018.
- [73] H. N. Chan, M. J. A. Tan, and H. Wu, "Point-of-care testing: Applications of 3D printing," *Lab Chip*, vol. 17, no. 16, pp. 2713–2739, 2017.
- [74] A. J. Capel, R. P. Rimington, M. P. Lewis, and S. D. R. Christie, "3D printing for chemical, pharmaceutical and biological applications," *Nat. Rev. Chem.*, vol. 2, no. 12, pp. 422–436, 2018.
- [75] B. Gross, S. Y. Lockwood, and D. M. Spence, "Recent advances in analytical chemistry by 3D printing," *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 1, pp. 57–70, 2017.
- [76] M. He, Z. Li, Y. Ge, and Z. Liu, "Portable Upconversion Nanoparticles-Based Paper Device for Field Testing of Drug Abuse," *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 3, pp. 1530–1534, 2016.
- [77] R. H. Tang *et al.*, "Advances in paper-based sample pretreatment for point-of-care testing," *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 37, no. 4, pp. 411–428, 2017.

[Type here]

- [78] C. Liu *et al.*, "A high-efficiency superhydrophobic plasma separator," *Lab Chip*, vol. 16, no. 3, pp. 553–560, 2016.
- [79] M. Rafeie, J. Zhang, M. Asadnia, W. Li, and M. E. Warkiani, "Multiplexing slanted spiral microchannels for ultra-fast blood plasma separation," *Lab Chip*, vol. 16, no. 15, pp. 2791–2802, 2016.
- [80] and A. F. Anthony K. Au*, Nirveek Bhattacharjee, Lisa F. Horowitz, Tim C. Chang, "3D-Printed Microfluidic Automation," *Lab Chip*, vol. 15, no. 207890, pp. 4491–4498, 2013.
- [81] b and R. F. I. Stefano Begolo, a† Dmitriy V. Zhukov, a† David A. Selck, a Liang Li, "The pumping lid: Investigating multi-material 3D printing for equipment-free , programmable generation of positive and negative pressures for microfluidic applications Lab on a Chip Table of contents figure : The pumping-lid method enables equipment-free," 2014.
- [82] K. C. Bhargava, B. Thompson, and N. Malmstadt, "Discrete elements for 3D microfluidics," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 42, pp. 15013–15018, 2014.
- [83] C. I. Rogers, K. Qaderi, A. T. Woolley, and G. P. Nordin, "3D printed microfluidic devices with integrated valves," *Biomicrofluidics*, vol. 9, no. 1, 2015.
- [84] H. Singh, M. Shimojima, T. Shiratori, L. Van An, M. Sugamata, and M. Yang, "Application of 3D printing technology in increasing the diagnostic performance of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for infectious diseases," *Sensors (Switzerland)*, vol. 15, no. 7, pp. 16503–16515, 2015.
- [85] R. M. Dirkzwager, S. Liang, and J. A. Tanner, "Development of Aptamer-Based Point-of-Care Diagnostic Devices for Malaria Using Three-Dimensional Printing Rapid Prototyping," *ACS Sensors*, vol. 1, no. 4, pp. 420–426, 2016.
- [86] W. Il Lee, S. Shrivastava, L. T. Duy, B. Yeong Kim, Y. M. Son, and N. E. Lee, "A smartphone imaging-based label-free and dual-wavelength fluorescent biosensor with high sensitivity and accuracy," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 94, pp. 643–650, 2017.
- [87] K. Ming *et al.*, "Integrated quantum dot barcode smartphone optical device for wireless multiplexed diagnosis of infected patients," *ACS Nano*, vol. 9, no. 3, pp. 3060–3074, 2015.
- [88] M. J. Cho, H. Ryu, H. J. Lee, and S. K. Chang, "Selective fluorescence signaling of hypochlorite in tap water by oxidative hydrolysis of sulfonylhydrazide," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 241, pp. 285–291, 2017.
- [89] C. Carrell *et al.*, "Beyond the lateral flow assay: A review of paper-based microfluidics," *Microelectron. Eng.*, vol. 206, no. January, pp. 45–54, 2019.
- [90] J. R. Choi *et al.*, "Advances and challenges of fully integrated paper-based point-of-care nucleic acid testing," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 93, pp. 37–50, 2017.
- [91] Z. Li, H. Liu, X. He, F. Xu, and F. Li, "Pen-on-paper strategies for point-of-care testing of human health," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 108, pp. 50–64, 2018.
- [92] P. Teengam, W. Siangproh, A. Tuantranont, T. Vilaivan, O. Chailapakul, and C. S. Henry, "Electrochemical impedance-based DNA sensor using pyrrolidiny peptide nucleic acids

[Type here]

- for tuberculosis detection," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1044, pp. 102–109, 2018.
- [93] Y. Yang, E. Noviana, M. P. Nguyen, B. J. Geiss, D. S. Dandy, and C. S. Henry, "Paper-Based Microfluidic Devices: Emerging Themes and Applications," *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 1, pp. 71–91, 2017.
- [94] R. J. Yang, C. C. Tseng, W. J. Ju, H. L. Wang, and L. M. Fu, "A rapid paper-based detection system for determination of human serum albumin concentration," *Chem. Eng. J.*, vol. 352, pp. 241–246, 2018.
- [95] L. M. Fu, C. C. Tseng, W. J. Ju, and R. J. Yang, "Rapid paper-based system for human serum creatinine detection," *Inventions*, vol. 3, no. 2, pp. 1–9, 2018.
- [96] C. C. Liu, Y. N. Wang, L. M. Fu, and D. Y. Yang, "Rapid integrated microfluidic paper-based system for sulfur dioxide detection," *Chem. Eng. J.*, vol. 316, pp. 790–796, 2017.
- [97] C. C. Liu, Y. N. Wang, L. M. Fu, and K. L. Chen, "Microfluidic paper-based chip platform for benzoic acid detection in food," *Food Chem.*, vol. 249, no. January, pp. 162–167, 2018.
- [98] G. G. Morbioli, T. Mazzu-Nascimento, A. M. Stockton, and E. Carrilho, "Technical aspects and challenges of colorimetric detection with microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs) - A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 970, pp. 1–22, 2017.
- [99] L. Ma, A. Nilghaz, J. R. Choi, X. Liu, and X. Lu, "Rapid detection of clenbuterol in milk using microfluidic paper-based ELISA," *Food Chem.*, vol. 246, no. December, pp. 437–441, 2018.
- [100] L. M. Fu and Y. N. Wang, "Detection methods and applications of microfluidic paper-based analytical devices," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 107, pp. 196–211, 2018.
- [101] L. M. Fu, C. C. Liu, C. E. Yang, Y. N. Wang, and C. H. Ko, "A PET/paper chip platform for high resolution sulphur dioxide detection in foods," *Food Chem.*, vol. 286, no. January, pp. 316–321, 2019.
- [102] A. W. Martinez, S. T. Phillips, E. Carrilho, S. W. Thomas, H. Sindi, and G. M. Whitesides, "Simple telemedicine for developing regions: Camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis," *Analytical Chemistry*, vol. 80, no. 10, pp. 3699–3707, 2008.
- [103] 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.
- [104] B. Wang, Z. Lin, and M. Wang, "Fabrication of a paper-based microfluidic device to readily determine nitrite ion concentration by simple colorimetric assay," *J. Chem. Educ.*, vol. 92, no. 4, pp. 733–736, 2015.
- [105] C. H. Wang, J. J. Wu, and G. Bin Lee, "Screening of highly-specific aptamers and their applications in paper-based microfluidic chips for rapid diagnosis of multiple bacteria," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 284, pp. 395–402, 2019.
- [106] F. A. Kappi, G. Z. Tsogas, A. M. Routsis, D. C. Christodouleas, and D. L. Giokas, "Paper-based devices for biothiols sensing using the photochemical reduction of silver halides," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1036, pp. 89–96, 2018.

[Type here]

- [107] J. Hu *et al.*, "Advances in paper-based point-of-care diagnostics," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 54, pp. 585–597, 2014.
- [108] J. Mettakoonpitak *et al.*, "Electrochemistry on Paper-based Analytical Devices: A Review," *Electroanalysis*, vol. 28, no. 7, pp. 1420–1436, 2016.
- [109] B. Deka, R. Kalita, D. Bhatia, and A. Mishra, "Applications of paper as a support material in biomedical sciences: A decadal review," *Sensors Int.*, vol. 1, no. January, p. 100004, 2020.
- [110] D. R. Ballerini, X. Li, and W. Shen, "Patterned paper and alternative materials as substrates for low-cost microfluidic diagnostics," *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 13, no. 5, pp. 769–787, 2012.
- [111] L. Guadarrama-Fernández, M. Novell, P. Blondeau, and F. J. Andrade, "A disposable, simple, fast and low-cost paper-based biosensor and its application to the determination of glucose in commercial orange juices," *Food Chem.*, vol. 265, pp. 64–69, 2018.
- [112] F. Zeng *et al.*, "Paper-based SERS analysis with smartphones as Raman spectral analyzers," *Analyst*, vol. 144, no. 1, pp. 137–142, 2019.
- [113] J. Park and J. K. Park, "Pressed region integrated 3D paper-based microfluidic device that enables vertical flow multistep assays for the detection of C-reactive protein based on programmed reagent loading," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 246, pp. 1049–1055, 2017.
- [114] X. Sun *et al.*, "Rotational paper-based electrochemiluminescence immunodevices for sensitive and multiplexed detection of cancer biomarkers," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1007, pp. 33–39, 2018.
- [115] G. Sriram *et al.*, "Paper-based microfluidic analytical devices for colorimetric detection of toxic ions: A review," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 93, pp. 212–227, 2017.
- [116] A. T. Singh, D. Lantigua, A. Meka, S. Taing, M. Pandher, and G. Camci-Unal, "Paper-based sensors: Emerging themes and applications," *Sensors (Switzerland)*, vol. 18, no. 9, pp. 1–22, 2018.
- [117] J. P. Rojas, D. Conchouso, A. Arevalo, D. Singh, I. G. Foulds, and M. M. Hussain, "Paper-based origami flexible and foldable thermoelectric nanogenerator," *Nano Energy*, vol. 31, pp. 296–301, 2017.
- [118] S. A. Nogueira *et al.*, "Redox titration on foldable paper-based analytical devices for the visual determination of alcohol content in whiskey samples," *Talanta*, vol. 194, pp. 363–369, 2019.
- [119] M. I. G. S. Almeida, B. M. Jayawardane, S. D. Kolev, and I. D. McKelvie, "Developments of microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs) for water analysis: A review," *Talanta*, vol. 177, no. August 2017, pp. 176–190, 2018.
- [120] R. S. Aparna, J. S. Anjali Devi, P. Sachidanandan, and S. George, "Polyethylene imine capped copper nanoclusters- fluorescent and colorimetric onsite sensor for the trace level detection of TNT," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 254, pp. 811–819, 2018.
- [121] J. Qi *et al.*, "Three-dimensional paper-based microfluidic chip device for multiplexed

[Type here]

- fluorescence detection of Cu²⁺ and Hg²⁺ ions based on ion imprinting technology," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 251, pp. 224–233, 2017.
- [122] S. Ge, J. Zhao, S. Wang, F. Lan, M. Yan, and J. Yu, "Ultrasensitive electrochemiluminescence assay of tumor cells and evaluation of H₂O₂ on a paper-based closed-bipolar electrode by in-situ hybridization chain reaction amplification," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 102, pp. 411–417, 2018.
- [123] K. J. Chu *et al.*, "Integration of paper-based microarray and time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) for parallel detection and quantification of molecules in multiple samples automatically," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1005, no. 2018, pp. 61–69, 2018.
- [124] Y. Xu *et al.*, "Synthesis of the 3D AgNF/AgNP arrays for the paper-based surface enhancement Raman scattering application," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 265, pp. 302–309, 2018.
- [125] C. Te Kung, C. Y. Hou, Y. N. Wang, and L. M. Fu, "Microfluidic paper-based analytical devices for environmental analysis of soil, air, ecology and river water," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 301, no. April, p. 126855, 2019.
- [126] M. Z. Hua, S. Li, S. Wang, and X. Lu, "Detecting chemical hazards in foods using microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs): The real-world application," *Micromachines*, vol. 9, no. 1, 2018.
- [127] G. Comina, A. Suska, and D. Filippini, "Towards autonomous lab-on-a-chip devices for cell phone biosensing," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 77, pp. 1153–1167, 2016.
- [128] R. Maguire, O. Duggan, and K. Kavanagh, "Evaluation of *Galleria mellonella* larvae as an in vivo model for assessing the relative toxicity of food preservative agents," *Cell Biol. Toxicol.*, vol. 32, no. 3, pp. 209–216, 2016.
- [129] M. H. Ward *et al.*, "Workgroup report: Drinking-water nitrate and health - Recent findings and research needs," *Environ. Health Perspect.*, vol. 113, no. 11, pp. 1607–1614, 2005.
- [130] K. Gopi, "Isolation Purification and Screening of Biodegradable Polymer PHB Producing Cyanobacteria from Marine and Fresh Water Resources," *Iran. J. Energy Environ.*, no. May, 2014.
- [131] Comisión Europea, "1882/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de septiembre de 2003 Reglamento (CE) n," *D. Of. la Unión Eur.*, pp. 1–36, 2009.
- [132] M. Beltrán Ávila and M. Beltrán Ávila, "Capítulo XII," *Sucesos la Guerr. la Indep. del año 1810 / Capítulos la Hist. Colon. Oru.*, pp. 301–318, 2016.
- [133] P. Stephen and A. Niyi, "Water Fluoridation: A Critical Review of the Physiological Effects of Ingested Fluoride as a Public Health Intervention," *Sci. World J.*, vol. 2014, no. 6, pp. 1–10, 2014.
- [134] O. Barbier, L. Arreola-Mendoza, and L. M. Del Razo, "Molecular mechanisms of fluoride toxicity," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 188, no. 2, pp. 319–333, 2010.
- [135] S. Ayoob and A. K. Gupta, *Fluoride in drinking water: A review on the status and stress effects*, vol. 36, no. 6. 2006.
- [136] A. Ghosh, K. Mukherjee, S. K. Ghosh, and B. Saha, "Sources and toxicity of fluoride in

[Type here]

- the environment," *Res. Chem. Intermed.*, vol. 39, no. 7, pp. 2881–2915, 2013.
- [137] J. D. Paoloni, C. E. Fiorentino, and M. E. Sequeira, "Fluoride contamination of aquifers in the southeast subhumid pampa, Argentina," *Environ. Toxicol.*, vol. 18, no. 5, pp. 317–320, 2003.
- [138] ANMAT, "Código Alimentario Argentino," 2019.
- [139] P. Nagaraja, N. G. S. Al-Tayar, A. Shivakumar, A. K. Shrestha, and A. K. Gowda, "A simple and sensitive spectrophotometric method for the determination of trace amounts of nitrite in environmental and biological samples using 4-amino-5-hydroxynaphthalene-2,7-disulphonic acid monosodium salt," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 75, no. 5, pp. 1411–1416, 2010.
- [140] Z. Moldovan, "Kinetic spectrophotometric determination of nitrite with tropaeolin 00-bromate system," *Anal. Lett.*, vol. 43, no. 7, pp. 1344–1354, 2010.
- [141] M. Yaqoob, B. Folgado Biot, A. Nabi, and P. J. Worsfold, "Determination of nitrate and nitrite in freshwaters using flow-injection with luminol chemiluminescence detection," *Luminescence*, vol. 27, no. 5, pp. 419–425, 2012.
- [142] H. Zhang, L. Zhang, C. Lu, L. Zhao, and Z. Zheng, "CdTe nanocrystals-enhanced chemiluminescence from peroxy-nitrous acid-carbonate and its application to the direct determination of nitrite," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 85, no. 1, pp. 217–222, 2012.
- [143] L. He, K. Zhang, C. Wang, X. Luo, and S. Zhang, "Effective indirect enrichment and determination of nitrite ion in water and biological samples using ionic liquid-dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 23, pp. 3595–3600, 2011.
- [144] R. Georgescu-State, J. (Koos) F. van Staden, and L. R. Popescu-Mandoc, "Fluorimetric determination of nitrite in water using a novel fluorescent dye," *Microchem. J.*, vol. 137, pp. 418–421, 2018.
- [145] L. Lu, C. Chen, D. Zhao, F. Yang, and X. Yang, "A simple and sensitive assay for the determination of nitrite using folic acid as the fluorescent probe," *Anal. Methods*, vol. 7, no. 4, pp. 1543–1548, 2015.
- [146] X. Yao, P. Yan, K. Zhang, and J. Li, "Preparation of water-soluble CdSe quantum dots and its application for nitrite detection in the anodic electrochemiluminescence," *Luminescence*, vol. 28, no. 4, pp. 551–556, 2013.
- [147] Y. Zhang *et al.*, "Electrochemical detection of nitrite ions using Ag/Cu/MWNT nanoclusters electrodeposited on a glassy carbon electrode," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 258, pp. 1107–1116, 2018.
- [148] O. Koyun and Y. Sahin, "Voltammetric determination of nitrite with gold nanoparticles/poly(methylene blue)-modified pencil graphite electrode: application in food and water samples," *Ionics (Kiel)*, vol. 24, no. 10, pp. 3187–3197, 2018.
- [149] Y. Kadioglu, M. Gulaboglu, M. Ozturk, and N. Dogan, "Determination of fluoride by using Ion Selective Electrode (ISE) method in urine of healthy volunteer and patients before-after sevoflurane anesthesia," *Lat. Am. J. Pharm.*, vol. 34, no. 8, pp. 1658–1663,

[Type here]

2015.

- [150] H. Yiping and W. Caiyun, "Ion chromatography for rapid and sensitive determination of fluoride in milk after headspace single-drop microextraction with in situ generation of volatile hydrogen fluoride," *Anal. Chim. Acta*, vol. 661, no. 2, pp. 161–166, 2010.
- [151] J. Hu, M. R. Whittaker, T. P. Davis, and J. F. Quinn, "Application of heterocyclic polymers in the ratiometric spectrophotometric determination of fluoride," *ACS Macro Lett.*, vol. 4, no. 2, pp. 236–241, 2015.
- [152] M. Garrido, A. G. Lista, M. Palomeque, and B. S. Fernández Band, "Fluorimetric determination of fluoride in a flow assembly integrated on-line to an open/closed FIA system to remove interference by solid phase extraction," *Talanta*, vol. 58, no. 5, pp. 849–853, 2002.
- [153] D. T. R. Vidal, M. A. Augelli, G. M. Hotta, F. S. Lopes, and C. L. Do Lago, "Determination of fluoroacetate and fluoride in blood serum by capillary zone electrophoresis using capacitively coupled contactless conductivity detection," *Electrophoresis*, vol. 32, no. 8, pp. 896–899, 2011.
- [154] P. Jain, J. D. Sharma, D. Sohu, and P. Sharma, "Chemical analysis of drinking water of villages of Sanganer Tehsil, Jaipur District," *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, vol. 2, no. 4, pp. 373–379, 2006.
- [155] H. Asano and Y. Shiraishi, "Development of paper-based microfluidic analytical device for iron assay using photomask printed with 3D printer for fabrication of hydrophilic and hydrophobic zones on paper by photolithography," *Anal. Chim. Acta*, vol. 883, pp. 55–60, 2015.
- [156] Y. Sameenoi, P. Na Nongkai, S. Nouanthavong, C. S. Henry, and D. Nacaprich, "One-step polymer screen-printing for microfluidic paper-based analytical device ($\frac{1}{4}$ PAD) fabrication," *Analyst*, vol. 139, no. 24, pp. 6580–6588, 2014.
- [157] W. Y. Li *et al.*, "Efficient in situ growth of enzyme-inorganic hybrids on paper strips for the visual detection of glucose," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 99, pp. 603–611, 2018.
- [158] K. Abe, K. Suzuki, and D. Citterio, "Inkjet-printed microfluidic multianalyte chemical sensing paper," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 18, pp. 6928–6934, 2008.
- [159] P. Preechakasedkit, W. Siangproh, N. Khongchareonporn, N. Ngamrojanavanich, and O. Chailapakul, "Development of an automated wax-printed paper-based lateral flow device for alpha-fetoprotein enzyme-linked immunosorbent assay," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 102, no. November 2017, pp. 27–32, 2018.
- [160] C. E. Anderson, K. G. Shah, and P. Yager, *Sensitive Protein Detection and Quantification in Paper-Based Microfluidics for the Point of Care*, 1st ed., vol. 589. Elsevier Inc., 2017.
- [161] J. Narang, N. Malhotra, C. Singhal, A. Mathur, A. K. PN, and C. S. Pundir, "Detection of alprazolam with a lab on paper economical device integrated with urchin like Ag@ Pd shell nano-hybrids," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 80, pp. 728–735, 2017.
- [162] A. Apilux, W. Siangproh, N. Praphairaksit, and O. Chailapakul, "Simple and rapid colorimetric detection of Hg(II) by a paper-based device using silver nanoplates," *Talanta*, vol. 97, pp. 388–394, 2012.

[Type here]

- [163] N. Ratnarathorn, O. Chailapakul, C. S. Henry, and W. Dungchai, "Simple silver nanoparticle colorimetric sensing for copper by paper-based devices," *Talanta*, vol. 99, pp. 552–557, 2012.
- [164] T. Satarpai, J. Shiowatana, and A. Siripinyanond, "Paper-based analytical device for sampling, on-site preconcentration and detection of ppb lead in water," *Talanta*, vol. 154, pp. 504–510, 2016.
- [165] T. M. G. Cardoso, P. T. Garcia, and W. K. T. Coltro, "Colorimetric determination of nitrite in clinical, food and environmental samples using microfluidic devices stamped in paper platforms," *Anal. Methods*, vol. 7, no. 17, pp. 7311–7317, 2015.
- [166] D. Başı, "Sensitive and reliable paper-based glucose sensing mechanisms with smartphone readout using the: $L * a * b * \text{color space}$," *Anal. Methods*, vol. 9, no. 47, pp. 6698–6704, 2017.
- [167] R. Meelapsom, P. Jarujamrus, M. Amatatongchai, S. Chairam, C. Kulsing, and W. Shen, "Chromatic analysis by monitoring unmodified silver nanoparticles reduction on double layer microfluidic paper-based analytical devices for selective and sensitive determination of mercury(II)," *Talanta*, vol. 155, pp. 193–201, 2016.
- [168] P. T. Anastas and M. M. Kirchhoff, "Origins, current status, and future challenges of green chemistry," *Acc. Chem. Res.*, vol. 35, no. 9, pp. 686–694, 2002.
- [169] B. M. Jayawardane, S. Wei, I. D. McKelvie, and S. D. Kolev, "Microfluidic paper-based analytical device for the determination of nitrite and nitrate," *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 15, pp. 7274–7279, 2014.
- [170] S. A. Klasner, A. K. Price, K. W. Hoeman, R. S. Wilson, K. J. Bell, and C. T. Culbertson, "Paper-based microfluidic devices for analysis of clinically relevant analytes present in urine and saliva," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 397, no. 5, pp. 1821–1829, 2010.
- [171] F. W. Gilcreas, "Standard methods for the examination of water and waste water," *Am. J. Public Health Nations. Health*, vol. 56, no. 3, pp. 387–388, 1966.
- [172] E. R. Ziegel *et al.*, "Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part B," *Technometrics*, vol. 42, no. 2, p. 218, 2000.
- [173] APHA:4500-E, "Standard Method for Sulfate," *Am. Public Heal. Assoc.*, vol. 552, 2005.
- [174] I. Ortiz-Gomez *et al.*, "Tetrazine-based chemistry for nitrite determination in a paper microfluidic device," *Talanta*, vol. 160, pp. 721–728, 2016.
- [175] Y. Jiang, Z. Hao, Q. He, and H. Chen, "A simple method for fabrication of microfluidic paper-based analytical devices and on-device fluid control with a portable corona generator," *RSC Adv.*, vol. 6, no. 4, pp. 2888–2894, 2016.
- [176] A. Nilghaz, D. R. Ballerini, X. Y. Fang, and W. Shen, "Semiquantitative analysis on microfluidic thread-based analytical devices by ruler," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 191, pp. 586–594, 2014.
- [177] K. E. McCracken, T. Tat, V. Paz, and J. Y. Yoon, "Smartphone-based fluorescence detection of bisphenol A from water samples," *RSC Adv.*, vol. 7, no. 15, pp. 9237–9243, 2017.
- [178] S. Dutta, K. Saikia, and P. Nath, "Smartphone based LSPR sensing platform for

[Type here]

- bio-conjugation detection and quantification," *RSC Adv.*, vol. 6, no. 26, pp. 21871–21880, 2016.
- [179] Y. Wen, D. Kuang, J. Huang, and Y. Zhang, "Microaxicave colour analysis system for fluoride concentration using a smartphone," *RSC Adv.*, vol. 7, no. 67, pp. 42339–42344, 2017.
- [180] A. Motalebizadeh, H. Bagheri, S. Asiaei, N. Fekrat, and A. Afkhami, "New portable smartphone-based PDMS microfluidic kit for the simultaneous colorimetric detection of arsenic and mercury," *RSC Adv.*, vol. 8, no. 48, pp. 27091–27100, 2018.
- [181] P. Kassal, E. Horak, M. Sigurnjak, M. D. Steinberg, and I. M. Steinberg, "Wireless and mobile optical chemical sensors and biosensors," *Rev. Anal. Chem.*, vol. 37, no. 4, pp. 1–27, 2018.
- [182] E. Vidal, A. S. Lorenzetti, A. G. Lista, and C. E. Domini, "Micropaper-based analytical device (μ PAD) for the simultaneous determination of nitrite and fluoride using a smartphone," *Microchem. J.*, vol. 143, pp. 467–473, 2018.
- [183] S. Kanchi, M. I. Sabela, P. S. Mdluli, Inamuddin, and K. Bisetty, "Smartphone based bioanalytical and diagnosis applications: A review," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 102, no. August 2017, pp. 136–149, 2018.
- [184] A. Ayala, L. O. Leal, L. Ferrer, and V. Cerdà, "Multiparametric automated system for sulfate, nitrite and nitrate monitoring in drinking water and wastewater based on sequential injection analysis," *Microchem. J.*, vol. 100, no. 1, pp. 55–60, 2012.
- [185] S. V. Lomako *et al.*, "Sulfate-selective electrode and its application for sulfate determination in aqueous solutions," *Anal. Chim. Acta*, vol. 562, no. 2, pp. 216–222, 2006.
- [186] J. G. Ortiz-Tena, B. Rühmann, and V. Sieber, "Colorimetric Determination of Sulfate via an Enzyme Cascade for High-Throughput Detection of Sulfatase Activity," *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 4, pp. 2526–2533, 2018.
- [187] W. R. J. Taylor and N. J. White, "Antimalarial Drug Toxicity: A Review," *Drug Saf.*, vol. 27, no. 1, pp. 25–61, 2004.
- [188] V. F. Samanidou, E. N. Evaggelopoulou, and I. N. Papadoyannis, "Simultaneous determination of quinine and chloroquine anti-malarial agents in pharmaceuticals and biological fluids by HPLC and fluorescence detection," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 38, no. 1, pp. 21–28, 2005.
- [189] W. Zhao, Y. Li, Y. Zhang, H. Zhang, H. Yu, and A. Chen, "Determination of Cinchona Alkaloids by Capillary Electrophoresis with Novel Complex Formation," *Anal. Lett.*, vol. 49, no. 8, pp. 1176–1183, 2016.
- [190] S. Pandey *et al.*, "Comparison of analytical methods: Direct emission versus first-derivative fluorometric methods for quinine determination in tonic waters," *J. Chem. Educ.*, vol. 76, no. 1, pp. 85–87, 1999.
- [191] B. Li, Z. Zhang, and M. Wu, "Flow-injection chemiluminescence determination of quinine using on-line electrogenerated cobalt(III) as oxidant," *Talanta*, vol. 51, no. 3, pp. 515–521, 2000.

[Type here]

- [192] M. C. Yebra and R. M. Cespón, "Automatic determination of quinine by atomic absorption spectrometry," *Microchem. J.*, vol. 65, no. 1, pp. 81–86, 2000.
- [193] E. M. Hodel *et al.*, "A single LC-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 14 antimalarial drugs and their metabolites in human plasma," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 877, no. 10, pp. 867–886, 2009.
- [194] M. Buleandra, A. A. Rabinca, M. C. Cheregi, and A. A. Ciucu, "Rapid voltammetric method for quinine determination in soft drinks," *Food Chem.*, vol. 253, no. September 2017, pp. 1–4, 2018.
- [195] J. E. O'Reilly, "Fluorescence experiments with quinine," *J. Chem. Educ.*, vol. 52, no. 9, pp. 610–612, 1975.
- [196] M. F. Thomas, N. Azema, and O. Thomas, "Physical and Aggregate Properties," *UV-Visible Spectrophotometry of Water and Wastewater*, pp. 201–224, 2017.
- [197] N. E. Llamas, M. Garrido, M. S. Di Nezio, and B. S. F. Band, "Second order advantage in the determination of amaranth, sunset yellow FCF and tartrazine by UV-vis and multivariate curve resolution-alternating least squares," *Anal. Chim. Acta*, vol. 655, no. 1–2, pp. 38–42, 2009.
- [198] A. M. C. T. Briefs, "The correlation between regression coefficients: combined significance testing for calibration and quantitation of bias," *Anal. Methods*, vol. 11, no. 14, pp. 1845–1848, 2019.
- [199] Z. Liu *et al.*, "A 3D printed smartphone optosensing platform for point-of-need food safety inspection," *Anal. Chim. Acta*, vol. 966, pp. 81–89, 2017.
- [200] K. Danchana, P. Phansi, C. T. de Souza, S. L.C. Ferreira, and V. Cerdà, "Spectrophotometric system based on a device created by 3D printing for the accommodation of a webcam chamber as a detection system," *Talanta*, vol. 206, no. May 2019, p. 120250, 2020.
- [201] A. Bayram, E. Yalcin, S. Demic, O. Gunduz, and M. E. Solmaz, "Development and application of a low-cost smartphone-based turbidimeter using scattered light," *Appl. Opt.*, vol. 57, no. 21, p. 5935, 2018.
- [202] I. Hussain, K. Ahamad, and P. Nath, "Water turbidity sensing using a smartphone," *RSC Adv.*, vol. 6, no. 27, pp. 22374–22382, 2016.
- [203] D. L. Neill, Y. C. Chang, W. Chen, L. Li, and M. Xian, "A smartphone based device for the detection of sulfane sulfurs in biological systems," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 292, no. January, pp. 263–269, 2019.
- [204] Y. Xing, Q. Zhu, X. Zhou, and P. Qi, "A dual-functional smartphone-based sensor for colorimetric and chemiluminescent detection: A case study for fluoride concentration mapping," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 319, no. May, p. 128254, 2020.
- [205] V. Kılıç, N. Horzum, and M. Ertugrul Solmaz, "From Sophisticated Analysis to Colorimetric Determination: Smartphone Spectrometers and Colorimetry," *Color Detect.*, pp. 1–19, 2020.
- [206] L. Cevenini, M. M. Calabretta, G. Tarantino, E. Micheli, and A. Roda, "Smartphone-interfaced 3D printed toxicity biosensor integrating bioluminescent

[Type here]

- 'sentinel cells,'" *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 225, pp. 249–257, 2016.
- [207] V. A. O. P. da Silva *et al.*, "Microfluidic paper-based device integrated with smartphone for point-of-use colorimetric monitoring of water quality index," *Meas. J. Int. Meas. Confed.*, vol. 164, p. 108085, 2020.
- [208] M. Schäfer, V. Bräuler, and R. Ulber, "Bio-sensing of metal ions by a novel 3D-printable smartphone spectrometer," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 255, pp. 1902–1910, 2018.
- [209] M. Sargazi and M. Kaykhahi, "Application of a smartphone based spectrophotometer for rapid in-field determination of nitrite and chlorine in environmental water samples," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 227, p. 117672, 2020.
- [210] K. Laganovska *et al.*, "Portable low-cost open-source wireless spectrophotometer for fast and reliable measurements," *HardwareX*, vol. 7, p. e00108, 2020.
- [211] E. C. Navarre, "Extensible Interface for a Compact Spectrophotometer for Teaching Molecular Absorption in the Undergraduate Laboratory," *J. Chem. Educ.*, vol. 97, no. 5, pp. 1500–1503, 2020.
- [212] S. Gupta, H. C. Liaw, P. Vadakkepat, and C. F. Starmer, "Smartphone spectrophotometer for point-of-care diagnostics in low-resource settings," *IEEE Reg. 10 Humanit. Technol. Conf. R10-HTC 2015 - co-located with 8th Int. Conf. Humanoid, Nanotechnology, Inf. Technol. Commun. Control. Environ. Manag. HNICEM 2015*, 2016.
- [213] H. J. S. de Oliveira *et al.*, "A handheld smartphone-controlled spectrophotometer based on hue to wavelength conversion for molecular absorption and emission measurements," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 238, pp. 1084–1091, 2017.
- [214] M. J. Silva, D. G. De Oliveira, O. O. Marcillo, K. H. Neppelenbroek, V. S. Lara, and V. C. Porto, "Effect of denture-coating composite on *Candida albicans* biofilm and surface degradation after disinfection protocol," *Int. Dent. J.*, vol. 66, no. 2, pp. 86–92, 2016.
- [215] G. Faria *et al.*, "Penetration of sodium hypochlorite into root canal dentine: effect of surfactants, gel form and passive ultrasonic irrigation," *Int. Endod. J.*, vol. 52, no. 3, pp. 385–392, 2019.
- [216] WHO, "Cleaning and Disinfection of Environmental Surfaces in the context of COVID-19: Interim guidance," no. May, p. 7, 2020.
- [217] M. A. Nicoletti, E. L. Siqueira, A. C. Bombana, and G. G. de Oliveira, "Shelf-life of a 2.5% sodium hypochlorite solution as determined by arrhenius equation," *Braz. Dent. J.*, vol. 20, no. 1, pp. 27–31, 2009.
- [218] International Telecommunication Union Radiocommunication Sector (ITU-R), "Studio encoding parameters of digital television for standard 4:3 and wide screen 16:9 aspect ratios," *Recomm. ITU-R BT.601-7*, vol. 7, pp. 2–8, 2011.
- [219] M. C. Kuga, É. Gouveia-Jorge, M. Tanomaru-Filho, J. M. Guerreiro-Tanomaru, I. Bonetti-Filho, and G. Faria, "Penetration into dentin of sodium hypochlorite associated with acid solutions," *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Endodontology*, vol. 112, no. 6, pp. e155–e159, 2011.
- [220] T. M. Pizzolato, E. Carissimi, E. L. Machado, and I. A. H. Schneider, "Colour removal with NaClO of dye wastewater from an agate-processing plant in Rio Grande do Sul, Brazil,"

[Type here]

- Int. J. Miner. Process.*, vol. 65, no. 3–4, pp. 203–211, 2002.
- [221] F. A. Alshamsi, A. S. Albadwawi, M. M. Alnuaimi, M. A. Rauf, and S. S. Ashraf, "Comparative efficiencies of the degradation of Crystal Violet using UV/hydrogen peroxide and Fenton's reagent," *Dye. Pigment.*, vol. 74, no. 2, pp. 283–287, 2007.
- [222] V. K. Sharma, "Oxidative transformations of environmental pharmaceuticals by Cl₂, ClO₂, O₃, and Fe(VI): Kinetics assessment," *Chemosphere*, vol. 73, no. 9, pp. 1379–1386, 2008.
- [223] B. S. Hosker, "Demonstrating Principles of Spectrophotometry by Constructing a Simple, Low-Cost, Functional Spectrophotometer Utilizing the Light Sensor on a Smartphone," *J. Chem. Educ.*, vol. 95, no. 1, pp. 178–181, 2018.
- [224] S. Dutta, D. Sarma, and P. Nath, "Ground and river water quality monitoring using a smartphone-based pH sensor," *AIP Adv.*, vol. 5, no. 5, pp. 0–9, 2015.
- [225] J. Ballesta Claver, M. C. Valencia Mirón, and L. F. Capitán-Vallvey, "Determination of hypochlorite in water using a chemiluminescent test strip," *Anal. Chim. Acta*, vol. 522, no. 2, pp. 267–273, 2004.
- [226] I. N. Dahmke, S. P. Boettcher, M. Groh, and U. Mahlknecht, "Cooking enhances curcumin anti-carcinogenic activity through pyrolytic formation of 'deketene curcumin,'" *Food Chem.*, vol. 151, pp. 514–519, 2014.
- [227] J. Mahale, R. Singh, L. M. Howells, R. G. Britton, S. M. Khan, and K. Brown, "Detection of Plasma Curcuminoids from Dietary Intake of Turmeric-Containing Food in Human Volunteers," *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 62, no. 16, pp. 1–23, 2018.
- [228] G. K. Jayaprakasha, L. J. M. Rao, and K. K. Sakariah, "Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 13, pp. 3668–3672, 2002.
- [229] S. N. Garg, R. P. Bansal, M. M. Gupta, and S. Kumar, "Variation in the rhizome essential oil and curcumin contents and oil quality in the land races of turmeric *Curcuma longa* of North Indian plains," *Flavour Fragr. J.*, vol. 14, no. 5, pp. 315–318, 1999.
- [230] S. C. Gupta, G. Kismali, and B. B. Aggarwal, "Curcumin, a component of turmeric: From farm to pharmacy," *BioFactors*, vol. 39, no. 1, pp. 2–13, 2013.
- [231] Z. Rafiee, M. Nejatian, M. Daeihamed, and S. M. Jafari, "Application of curcumin-loaded nanocarriers for food, drug and cosmetic purposes," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 88, no. December 2018, pp. 445–458, 2019.
- [232] A. Rohman, "Analysis of curcuminoids in food and pharmaceutical products," *Int. Food Res. J.*, vol. 19, no. 1, pp. 19–27, 2012.
- [233] T. Tsuda, "Curcumin as a functional food-derived factor: Degradation products, metabolites, bioactivity, and future perspectives," *Food Funct.*, vol. 9, no. 2, pp. 705–714, 2018.
- [234] F. Jasim and F. Ali, "A novel method for the spectrophotometric determination of curcumin and its application to curcumin spices," *Microchem. J.*, vol. 38, no. 1, pp. 106–110, 1988.
- [235] Y. Liu, J. Li, R. Fu, L. Zhang, D. Wang, and S. Wang, "Enhanced extraction of natural

[Type here]

- pigments from *Curcuma longa* L. using natural deep eutectic solvents," *Ind. Crops Prod.*, vol. 140, no. December 2018, p. 111620, 2019.
- [236] H. K. Syed, K. Bin Liew, G. O. K. Loh, and K. K. Peh, "Stability indicating HPLC-UV method for detection of curcumin in *Curcuma longa* extract and emulsion formulation," *Food Chem.*, vol. 170, pp. 321–326, 2015.
- [237] D. Herebian, J. H. Choi, A. M. Abd El-Aty, J. H. Shim, and M. Spiteller, "Metabolite analysis in *Curcuma domestica* using various GC-MS and LC-MS separation and detection techniques," *Biomed. Chromatogr.*, vol. 23, no. 9, pp. 951–965, 2009.
- [238] X. Sun, C. Gao, W. Cao, X. Yang, and E. Wang, "Capillary electrophoresis with amperometric detection of curcumin in Chinese herbal medicine pretreated by solid-phase extraction," *J. Chromatogr. A*, vol. 962, no. 1–2, pp. 117–125, 2002.
- [239] S. Anubala, R. Sekar, and K. Nagaiah, "Determination of Curcuminoids and Their Degradation Products in Turmeric (*Curcuma longa*) Rhizome Herbal Products by Non-aqueous Capillary Electrophoresis with Photodiode Array Detection," *Food Anal. Methods*, vol. 9, no. 9, pp. 2567–2578, 2016.
- [240] L. C. Chen *et al.*, "Improving the reproducibility, accuracy, and stability of an electrochemical biosensor platform for point-of-care use," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 155, no. September 2019, p. 112111, 2020.
- [241] J. Qin, J. S. Park, D. G. Jo, M. Cho, and Y. Lee, "Curcumin-based electrochemical sensor of amyloid- β oligomer for the early detection of Alzheimer's disease," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 273, pp. 1593–1599, 2018.
- [242] Z. Stanić, "Curcumin, a Compound from Natural Sources, a True Scientific Challenge – A Review," *Plant Foods Hum. Nutr.*, vol. 72, no. 1, 2017.
- [243] M. L. A. D. Lestari and G. Indrayanto, *Curcumin*, vol. 39. 2014.
- [244] T. Han, S. Kundu, A. Nag, and Y. Xu, "3D printed sensors for biomedical applications: A review," *Sensors (Switzerland)*, vol. 19, no. 7, 2019.
- [245] A. J. S. McGonigle *et al.*, "Smartphone spectrometers," *Sensors (Switzerland)*, vol. 18, no. 1, pp. 1–15, 2018.
- [246] B. G. Lee and W. Y. Chung, "A smartphone-based driver safety monitoring system using data fusion," *Sensors (Switzerland)*, vol. 12, no. 12, pp. 17536–17552, 2012.
- [247] R. Typek, A. L. Dawidowicz, D. Wianowska, K. Bernacik, M. Stankevič, and M. Gil, "Formation of aqueous and alcoholic adducts of curcumin during its extraction," *Food Chem.*, vol. 276, pp. 101–109, 2019.