

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO
AMBIENTE



TESIS

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MICRO-DISPOSITIVO
ANALÍTICO ECOLÓGICO DE pH BASADO EN UNA MATRIZ DE
ANTOCIANINAS DE MASHUA (*Tropaeolum tuberosum*)**

PRESENTADA POR:

ELIZABETH HUANATICO SUAREZ

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

**DOCTORIS SCIENTIAE EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO
AMBIENTE**

PUNO, PERÚ

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE



TESIS

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MICRODISPOSITIVO ANALÍTICO
ECOLÓGICO DE pH BASADO EN UNA MATRIZ DE ANTOCIANINAS DE
MASHUA (*Tropaeolum tuberosum*)

PRESENTADA POR:

ELIZABETH HUANATICO SUAREZ

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTORIS SCIENTIAE EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE

APROBADA POR EL SIGUIENTE JURADO:

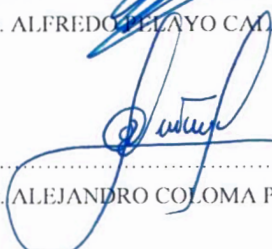
PRESIDENTE


.....
Dra. LIDIA SOFÍA CABALLERO GUTIÉRREZ

PRIMER MIEMBRO


.....
Dr. ALFREDO ELAYO CAMATAYUD MENDOZA

SEGUNDO MIEMBRO


.....
Dr. ALEJANDRO COLOMA PAXI

ASESOR DE TESIS


.....
Ph.D. BERNARDO ROQUE HUANCA

CO-ASESOR DE TESIS


.....
Ph.D. LUIS ALBERTO CONDEZO HOYOS

Puno, 13 de julio de 2018.

ÁREA: Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente

TEMA: Microdispositivo de pH basado en Antocianinas de Mashua

LÍNEA: Tecnología Moderna v Tradicional en el Mundo Andino

DEDICATORIA

A ti mi Dios, por darme fortaleza y acompañarme en mis momentos de alegría e infortunio, por guiarme siempre en la senda de esta vida hacia la luz verdadera y a Roger por ser ahora mi ángel guardián que sé que me acompañas desde lo alto, que fuiste quien me impulso a seguir mis estudios sin presagiar tu partida, tarea cumplida pues este peldaño es tuyo.

A mis niños hermosos Roger Stivenn y Alvaro Sebastián Segura por apoyarme y ser mi razón de vivir y lucha en esta vida, por transmitirme sus actitudes positivas e ímpetu día a día y que con una sonrisa me llenan de vida, gracias por ser el regalo más bello que la vida me dio.

A mi Padre Florencio y mi mamita pacha (+) por estar siempre a mi lado y haberme dado la oportunidad de forjarme, así como a mis hermanos, Michael, Roxana y Pilar.

Con mucho cariño y eterna gratitud.

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional del Altiplano, Escuela de Posgrado, Doctorado por darme la oportunidad de efectuar mis estudios.
- A la plana Docente del Doctorado en Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, por los conocimientos y experiencias vertidas durante los años de estancia en esta Casa Superior de Estudios.
- A mis asesores de Tesis Ph.D. Bernardo Roque Huanca y Ph.D. Luis Alberto Condezo Hoyos, quienes me guiaron en esta investigación, por los aportes y la paciencia a lo largo de todo el proceso.
- A mis jurados de Tesis Dra. Lidia Sofía Caballero Gutiérrez, Dr. Alfredo Pelayo Calatayud Mendoza y Dr. Alejandro Coloma Paxi, por dedicar de su tiempo y transmitir su experiencia y bagaje de conocimientos en la mejora del trabajo.
- A mis compañeros de estudios del Doctorado promoción 2011, por haber compartido gratos momentos y pensar que ayer fue que aun estuvimos en aulas.
- A mis amigos que estuvieron siempre alentándome a fin de culminar con la tesis: Julio, Jhoni, Jesús, Jacob, Severo, Pablo, Mary, Gladys, Fernando, mil disculpas a los que no menciono pues mencionar a todos se me hace muy complicado..... a todos gracias.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I**REVISIÓN DE LITERATURA**

1.1 Mashua	3
1.1.1 Origen y distribución	3
1.1.2 Características botánicas	4
1.1.3 Taxonomía	6
1.1.4 Variedades	7
1.1.5 Composición química	9
1.1.6 Antioxidantes	10
1.2 Biosensores	18
1.2.1 Origen y características	18
1.2.2 Sistemas de manejo de fluidos	20
1.2.3 Clasificación de los biosensores	24
1.3 Antecedentes	26

CAPÍTULO II**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

2.1 Identificación del problema	28
2.2 Enunciados del problema	30
2.3 Justificación	30
2.4 Objetivos	31
2.4.1 Objetivo general	31
2.5 Hipótesis	31

2.5.1	Hipótesis general	31
2.5.2	Hipótesis específicos	31

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	Lugar experimental	33
3.2	Materia prima	33
3.3	Metodología y diseño experimental	36
3.4	Materiales y Métodos	37
3.4.1	Primer objetivo: Determinar la concentración de antocianinas extraídas de los ecotipos de Mashua.	37
3.4.2	Segundo Objetivo: Determinación de los diversos patrones de pH sobre el color de las antocianinas de Mashua.	40
3.4.3	Tercer objetivo: diseño y fabricación de un micro-dispositivo analítico en papel (μ PAD) de pH basado en antocianinas de Mashua (μ PADma)	44
3.4.4	Cuarto objetivo: Validación del μ PADma como multi-sensor de pH ecológico en diferentes productos alimenticios	45

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	De la concentración de antocianinas de Mashua	50
4.2	Efecto de los diversos patrones de pH sobre el color de las antocianinas	52
4.3	Diseño y fabricación del micro-dispositivo analítico en papel (μ PAD) de pH basado en antocianinas de Mashua (μ PADma)	54
4.4	Validar el μ PADma como multi sensor de pH ecológico en diferentes productos alimenticios	56
	CONCLUSIONES	64
	RECOMENDACIONES	65
	BIBLIOGRAFÍA	66
	ANEXOS	72

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
1. Nombres de las variedades más comunes de Mashua	8
2. Contenido nutricional de Mashua por 100 g de muestra fresca	10
3. Sustituyentes de las antocianinas	13
4. Comparación entre técnicas analíticas tradicionales y biosensores	18
5. Buffer a diferentes valores de pH	41
6. Discriminación de Buffer a diferentes valores de pH	43
7. Muestras alimenticias utilizadas	48
8. Cianidina-3-glucosido (mg) presentes en tres ecotipos de Mashua	50
9. ANOVA para mg cianidina-3-glucosido por Mashua	51
10. Pruebas de Múltiples Rangos para mg cianidina-3-glucosido por Mashua	51
11. Valores del análisis de color RGB para μ PADma en diferentes alimentos	57
12. Valores del pH encontradas con el pH metro instrumental en los diferentes alimentos.	58
13. Resultados de RGB, media y desviación estándar a diferente pH para Mashua Santo Cristo A.	73
14. Resultados de RGB, media y desviación estándar a diferente pH para Mashua Yana Añu	73
15. Resultados de RGB, media y desviación estándar a diferente pH para Mashua Santo Cristo B.	73
16. Muestra de Mashua Santo Cristo A.	74
17. Muestra de Mashua Yana añu	80
18. Muestra de Mashua Santo Cristo B	86
19. Resultados de las sondas a pH 2.06 y a distintas diluciones	92
20. Resultados de las sondas a pH 2.06 y a distintas diluciones	93
21. Muestra 2 de pH PADma	97
22. Muestra 3 de pH PADma	101
23. Resultados de la sonda a distintos buffers	105
24. Resultados optimizados de la sonda a distintos buffers	105
25. Resultados RGB disgregados de la sonda a distintos buffers	106
26. Resultados RGB de la sonda con diferentes productos	117
27. Resultados del pH de diferentes productos	117



28. Resultados RGB de la sonda con diferentes productos	118
29. pH estimados	123

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
1. Distribución de Mashua cultivada en Sudamérica	4
2. Mashua de color amarillo y morado	6
3. Partes estructurales de la Mashua (Sección transversal)	6
4. Estructura de la antocianina	13
5. Imagen de extractos de antocianinas acuosas a diferentes valores de pH 1 h después del equilibrio y después de 28 días de almacenamiento a 25 ° C en la oscuridad	17
6. Puntos clave de papel para dispositivos analíticos basados de papel microfluídico (μ PAD)	20
7. Control de flujo en el sensor de microfluidos en papel	22
8. Control de flujo en el sensor de microfluidos en papel en canales de tamaño milimétrico.	24
9. Clasificación de los biosensores	25
10. Mashua Santo Cristo A	34
11. Mashua Santo cristo A corte transversal	34
12. Mashua Yana Añu	34
13. Mashua Yana Añu corte transversal	34
14. Mashua Santo Cristo B	35
15. Mashua Santo Cristo B corte transversal	35
16. Diagrama de flujo para el desarrollo y validación de un dispositivo analítico en papel para la determinación de pH basado en multisensores ecológicos de Mashua.	36
17. Diagrama de flujo para la extracción de antocianinas de Mashua en fase acuosa.	39
18. Imágenes de extractos acuosos evaluados a diferente pH.	42
19. Micro PAD diseñado escala 1:1	45
20. Influencia de pH sobre las antocianinas de Mashua	52
21. Influencia de pH sobre las antocianinas de diferentes ecotipos de Mashua.	53
22. Comparación de μ PADma	54
23. Dimensiones del micro-dispositivo en papel	55
24. Reacción del micro-dispositivo a diferentes pH.	57
25. Influencia del pH sobre el valor R	59

26. Influencia del pH sobre el valor G	59
27. Influencia del pH sobre el valor B	60
28. Influencia del pH sobre el valor DE-RGB	60
29. Influencia del pH sobre el valor DE-RGB	60
30. Relación de pH y la distancia de Euclides	61
31. Análisis de correlación entre el pH estimado y el pH experimental.	62
32. Análisis de Bland-Altman del pH	62
33. Grafica M1-PH2.06	75
34. Grafica M1-PH4	76
35. Grafica M1-PH5.64	77
36. Grafica M1-PH6.87	78
37. Grafica M1-PH7	79
38. Grafica M2-PH2.06	81
39. Grafica M2-PH4	82
40. Grafica M2-PH5.64	83
41. Grafica M2-PH6.87	84
42. Grafica M2-PH7	85
43. Grafica M3-PH2.06	87
44. Grafica M3-PH4	88
45. Grafica M3-PH5.64	89
46. Grafica M3-PH6.87	90
47. Grafica M3-PH7	91
48. Grafica M1-PH2.06-D10.100	94
49. Grafica M1-PH2.06-D10.200	95
50. Grafica M1-PH2.06-D10.300	96
51. Grafica M2-PH2.06-D10.100	98
52. Grafica M2-PH2.06-D10.200	99
53. Grafica M2-PH2.06-D10.300	100
54. Grafica M3-PH2.06-D10.100	102
55. Grafica M3-PH2.06-D10.200	103
56. Grafica M3-PH2.06-D10.300	104
57. Grafica pH1	110
58. Grafica pH2.7	111
59. Grafica pH4	112



60. Grafica pH4.5	113
61. Grafica pH5.6	114
62. Grafica pH6.8	115
63. Grafica pH7	116

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
1. Resultado del extracto de Mashua: RGB, media y desviación estándar a diferente pH.	73
2. pH – PAD	105
3. PAD Alimentos	117
4. Análisis de Regresión R	124
5. Análisis de regresión para G	125
6. Análisis de regresión para B	126
7. Análisis de regresión para DE-RGB	127
8. Análisis de regresión para DE-RG	128
9. Análisis de regresión entre el pH estimado y el pH instrumental	129
10. Análisis de correlación entre el pH estimado y el pH instrumental	130

RESUMEN

Los objetivos del presente estudio fueron determinar la concentración de antocianinas extraídas de ecotipos de Mashua, el efecto de los diversos patrones de pH sobre el color de antocianinas, diseñar y fabricar un micro-dispositivo analítico en papel (μ PAD) de pH basado en antocianinas de Mashua (μ PADma) y validar el μ PADma como multi-sensor de pH ecológico en diferentes productos. Se utilizó tres ecotipos *Santo cristo A*, *Yana aña* y *Santo cristo B*; extrayéndoseles las antocianinas en fase acuosa, las cuales se utilizaron como sonda para la detección del pH en los μ PAD diseñados en papel, validándose por colorimetría, se evaluó los parámetros Rojo (R), Verde (G), Azul (B) mediante análisis por imagen, asimismo, se evaluó la regresión, distancia euclidiana y Bland-Altman; encontrándose valores de antocianinas de 806.24 mg de cianidina-3-glucosido/L en promedio, siendo el ecotipo *Yana aña* el de mayor valor con 811.63 mg de cianidina-3-glucosido/L reaccionando con las muestras establecidas a diferente pH. El μ PADma diseñado con el software Corel Draw X8, fue impreso en papel filtro Wattman No. 1 y adherida a una cinta de doble cara. Se concluye que cuanto más oscuro es un ecotipo, la cantidad de mg de cianidina-3-glucosido se incrementa y es el de mayor estabilidad a los patrones de color, posibilitando su uso como micro-dispositivo y como sensor de pH para su procesamiento, análisis y evaluación de imágenes, ya que el uso de parámetros RGB posibilita el cálculo de pH en alimentos con valores experimentales menores a 7 en tiempo real.

Palabras clave: Antocianinas, color, izaño, Mashua, pH y μ PAD.

ABSTRACT

The aims of the present study were to determine the concentration of anthocyanins extracted from Mashua ecotypes, the effect of the various pH patterns on the color of anthocyanins, and to design and manufacture an analytical micro-device on paper (μ PAD) of pH based on anthocyanins from Mashua (μ PADma) and validate the μ PADma as multi-sensor of ecological pH in different products. Three ecotypes were used: Saint Christ A, Yana Añu and Saint Christ B; extracting them anthocyanins in aqueous phase, which were used as a probe for the detection of pH in paper designed PAD, validated by colorimetry, parameters were evaluated Red (R), Green (G), Blue (B) by analysis by image, likewise, regression, Euclidean distance and Bland-Altman were evaluated; finding values of anthocyanins of 806.24 mg of cyanidin-3-glucoside / L on average, the Yana añu ecotype being the highest value with 811.63 mg of cyanidin-3-glucoside / L reacting with the samples established at different pH. The μ PADma designed with the Corel Draw X8 software was printed on Wattman filter paper No. 1 and adhered to a double-sided tape. In conclusion, the darker an ecotype is, the greater the amount of mg of cyanidin-3-glucoside increases and the greater stability to the color patterns, allowing its use as a micro-device and as a pH sensor for its processing, analysis and evaluation of images, since the use of RGB parameters allows the calculation of pH in foods with experimental values lower than 7 in real time.

Keywords: Anthocyanins, color, izaño, Mashua, pH and μ PAD.

INTRODUCCIÓN

El pH es un parámetro fisicoquímico de interés en muchas áreas del conocimiento, tales como la ciencia de los alimentos, biomedicina y ciencias ambientales. A nivel de laboratorio, el pH es rutinariamente medido empleando potenciómetros, su uso en el control de procesos y evaluaciones *in situ* como los estudios ambientales, y biomedicina, donde se dispone de pequeñas cantidades de muestras biológicas y por tanto, se requiere de técnicas que empleen pequeños volúmenes de reactivo así como miniaturizar y automatizar los métodos, por lo que una alternativa sería el uso de micro-dispositivos analíticos. Los micro-dispositivos analíticos de papel de bajo costo son una alternativa o solución al uso de pH metros en la medición de pH, los cuales gozan de enorme aceptación por su versatilidad y portabilidad. Aunque en sus inicios, estos micro-dispositivos analíticos se desarrollaron empleando sensores de naturaleza sintética, en la actualidad, en el contexto de la química analítica sostenible, existe mucho interés en el desarrollo de sensores empleando antocianinas obtenidos de fuentes naturales (sensores ecológicos) para reducir el impacto ambiental derivado del uso de estos dispositivos y el riesgo sobre el personal que trabaja con estos sensores.

Las antocianinas presentes en la Mashua (*Tropaeolum tuberosum*) varían entre 45.5 a 131.9 mg equivalentes de 3-glucósido de cianidina/100 g de peso fresco (Chirinos *et al.*, 2006), a diferencia de la oca de color oscura (*Oxalis tuberosa*), donde se hallaron ocho compuestos diferentes, cuyos principales picos fueron glucósidos de malvidina (malvidina 3-O-glucósido y 3,5-O-diglucósido), el resto fue 3,5-O-diglucósidos de petunidina y peonidina, y 3-O-glucósidos de delfinidina, petunidina y peonidina y la malvidina encontrada fue la 3-O-acetilglucósido-5-O-glucósido como una antocianina acilada (Alcalde-Eon *et al.*, 2004).

La Mashua o izaño, tubérculo oriundo de la sierra central del Perú, tiene usos nutricionales, antiafrodisiacos y medicinales en los países de la región andina. Dentro de sus usos medicinales se emplea para tratar problemas renales, úlceras en la piel, cálculos renales, dolencias genitourinarias y anemia, además se le atribuye propiedades antimicrobianas, fúngicas, bactericidas, nematocidas y alelopáticas (Brabban y Edwards, 1995; Johns *et al.*, 1982 citados por Ortega *et al.* 2006). Estudios realizados refieren que *Tropaeolum tuberosum* contiene altas cantidades de glucosinolatos y es rica en isotiocianatos; estos últimos poseen la capacidad de inhibir la proliferación de células

cancerosas de la próstata, colon y piel en humanos (Noratto *et al.*, 2004; Goodman y Gilman, 2007); por ejemplo, 100 g de los tubérculos secos puede contener de 14 a 16 g de proteína, casi 80 g de carbohidratos y aproximadamente 77,5 mg de vitamina C (Vaughn y Geissler, 1997). Los fenoles están asociados al color y a las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), cuya característica antioxidante se debe a la reactividad del grupo fenol presente (Robbins, 2003; Kähkönen *et al.*, 2001).

Asimismo la Mashua es una fuente importante de antocianinas presentes tanto en la cascara como en la parte comestible del recurso. La diversidad química de las antocianinas de la Mashua derivada de su biodiversidad, despierta el interés como fuente de sensores ecológicos de pH para el desarrollo de micro-dispositivos. Además, desde el contexto de la revalorización de los productos alimenticios olvidados como es el caso de la Mashua, el desarrollo de sensores en base a antocianinas de Mashua es una alternativa económica atractiva dado el precio de los mismos y el creciente interés en la reducción de contaminantes y el impacto ambiental que las actividades del hombre pueden generar.

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Mashua

1.1.1 Origen y distribución

La Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón), fue descrita en forma detallada e ilustrada cada especie por Ruíz y Pavón en 1802 en su obra *Peruviana y Chilensis* (Grau, Ortega, Nieto y Hermann, 2003) es también conocida con el nombre de Mashua en Perú y Ecuador; ãñu, izaño, apilla en el sur del Perú y Bolivia y cubio, navios, navo en Colombia (Tapia y Fries, 2007; National Research Council, 1989), siendo su mayor distribución desde Venezuela hasta Argentina (Grau y otros 2003; Tapia y Fries, 2007), *tropaeolum* es el género más grande de la familia *tropaeolaceae* que incluye 86 especies distribuidas en toda Sudamérica pero en general, se cree que Perú es el mayor productor de este tubérculo andino (Grau, Ortega, Nieto y Hermann, 2003).

Su cultivo se concentra a partir de los 1 500 hasta los 4 200 msnm soportando temperaturas agrestes (Tapia y Fries, 2007), pero se cree que tiene una mayor adaptación entre 3 500 y 3 800 msnm (National Research Council, 1989), siendo tolerante a heladas sin afectar por temperaturas debajo de 4°C, debido a que se considera una planta C-3 adaptándose a lugares que presentan mayor humedad y menor temperatura (Cruz y Valladolid, citado por Gómez, 1998).

La primera evidencia arqueológica de Mashua data del año 650-1350 d.c. (Pearsall, 1992) en los sedimentos de la cueva Huachumachay, ubicado en el valle de Jauja, Perú, la que se visualiza en la Figura 1. El alcance económico reducido

de los Mashua en el pasado, así como su aparición relativamente tardía en el registro arqueológico, sugieren que su domesticación pudo haber tenido lugar relativamente tarde (Grau, Ortega, Nieto y Hermann, 2003). Cárdenas (1989) y Hawkes (1989) suponen que la domesticación ocurrió en la región que abarca Ecuador a Bolivia.

La Mashua, junto con otras especies como la papa, olluco y oca, forman parte de los tubérculos andinos comestibles, que constituyen un sistema de alimentación local importante a pesar que se cultiva en pequeña escala, y con frecuencia, en localidades aisladas con una rápida penetración de cultivos comerciales (Hermann y Heller, 1997).

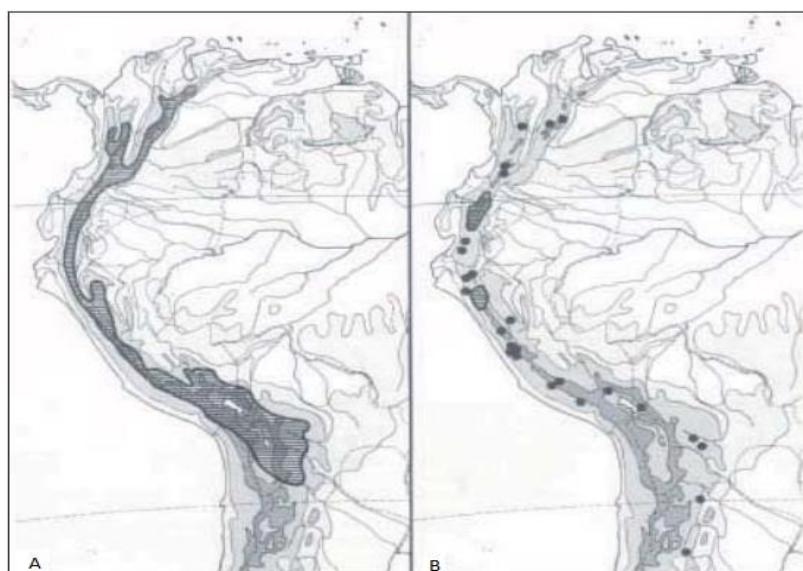


Figura 1. Distribución de Mashua cultivada en Sudamérica
Fuente: Sparre y Andersson (1991)

Nota:

A=Mashua cultivada (*Tropaeolum tuberosum* ssp. *Tuberosum*)

B= Mashua silvestre (*T. tuberosum* ssp. *Silvestre*)

1.1.2 Características botánicas

La Mashua es una planta anual, herbácea, glabra en todas sus partes, de crecimiento inicialmente erecto que luego varía semi-postrado y trepadora, ocasionalmente mediante los pecíolos táctiles (Tapia y Fries 2007; Arbizu y Tapia, 1992), la forma de la hoja es ovalada; la cara superior es verde mate y la cara inferior de un verde claro, puede ser de tres, cuatro o cinco lóbulos. Las flores de

Mashua son solitarias, zigomorfas que nacen en las axilas de la hojas (Tapia y Fries, 2007).

El fruto es un esquizocarpo, formado de tres mericarpos uniseminados indehiscentes. La semilla botánica es viable (Barrera *et al.*, 2003). Los tubérculos tienen yemas alargadas y profundas, son de forma cónica o elipsoidal. La Mashua, a diferencia de la oca y del olluco, tiende a formar gran cantidad de semillas viables (Tapia y Fries, 2007).

La Mashua, según menciona Grau *et al.* (2003) presenta una marcada diversidad en morfología y color, que varía de crema a morado oscuro, es así que Tapia y Fries (2007), indica que su coloración se puede clasificar en: Tubérculos de color uniforme generalmente blanco, amarillo o anaranjado (Figura 2); tubérculos con pigmentos de antocianina ubicados sólo en las yemas; tubérculos muy coloreados en las yemas con antocianinas; tubérculos con yemas pigmentadas y con franjas longitudinales rojas o moradas. Los tubérculos de Mashua son comúnmente amarillos, pero también existen variedades con una coloración púrpura intensa que rodea la piel y se dispersan por todo el tubérculo (Figura 2) y las partes estructurales según Villagomez y Rodriguez (2006) son, la epidermis, zona cortical, medula y anillo vascular (Figura 3).

Grau *et al.* (2003), en un reciente estudio demostraron que los tubérculos de Mashua de color púrpura presentaban de ocho a diez veces más actividad antioxidante que los tubérculos de Mashua de color amarillo, ellos sospecharon que esta mayor actividad antioxidante se correlacionaba con el alto contenido de antocianinas. Por su parte Chirinos *et al.* (2008), encontraron que las antocianinas de la Mashua fueron las principales contribuyentes de la actividad antioxidante total de solo uno de los tres tubérculos purpuras de Mashua, lo que sugiere que otros fenólicos presentes juegan un papel importante en el poder antioxidante de los tubérculos de Mashua, siendo la delfinidina di y tri-glucósidos acilados con ácido acético como las principales antocianinas, mientras que las cianidinas y las pelargonidinas se encontraron en menores cantidades.



Figura 2. Mashua de color amarillo y morado
(a) Mashua de piel y pulpa amarilla (b) Mashua de piel y pulpa morada

Fuente: (a) Tapia y Fries (2007) y (b) Inostroza *et al.* (2015)



Figura 3. Partes estructurales de la Mashua (Sección transversal)
Fuente: Villagomez y Rodriguez (2006)

1.1.3 Taxonomía

Linnaeus (1735), citado por Grau *et al.* (2003) introdujo el nombre *Trophaeum* (= trofeo), debido a las flores que se asemejan al casco de un guerrero y a las hojas que parecen escudos; más tarde cambió el nombre a *Tropaeolum*, usando la palabra griega original *trópaion*, que tiene el mismo significado.

Según Tapia y Fries (2007), describen dos variaciones dentro de la misma especie de Mashua: *Tropaeolum Tuberosum* variedad *Pilifer*, de tubérculos blancos, delgados, de ápice violáceo y ojos o yemas provistos de pelos delgados, procedentes de Colombia, y *Tropaeolum tuberosum* variedad *Lineomaculata* de tubérculos profusamente manchados de líneas coloreadas, cultivados sobre todo en Perú y Bolivia. Por su parte Bukason (1930), propuso el nombre de *Tropaeolum cubio* para las formas de Mashua encontradas en Colombia, que él consideraba taxonómicamente distintas de las cultivadas en Ecuador, Perú y Bolivia, pero Sparre y Andersson (1991), desestimaron esta propuesta, indicando que las

características señaladas por Bukason son de poco valor taxonómico (Grau *et al.*, 2003).

Sparre y Andersson (1991), basándose en caracteres morfológicos, reconocieron tres géneros: *Magallana* Cav., *Tropaeolum* L. y *Trophaeastrum* Sparre; posteriormente Andersson y Andersson (2000), basándose en caracteres moleculares, concluyeron que se trata de un solo género con dos secciones *Tropaeolum* L. sección *Tropaeolum* y *Tropaeolum* sección *Chilensia*.

Por su parte, el Sistema de Información Taxonómica integrado ITIS (2018), posiciona taxonómicamente a la Mashua de la siguiente manera:

Reino: *Plantae* (Plantas, vegetales)

División: *Tracheophyta* (plantas vasculares)

Clase: *Magnoliopsida (dicotyledonea)*

Orden: *Brassicales*

Familia: *Tropaeolaceae – capuchinas*

Género: *Tropaeolum* L. *capuchina*

Especie: *Tropaeolum tuberosum*

Sub especie: *Tuberosum*

Sinónimo: *Chymocarpus tuberosus* (Ruiz & Pav.) Heynh,
Tropaeolum cubio Bukasov,
Troaeolum mucronatum Meyen,
Trophaeum tuberosum (Ruiz & Pav.) Kuntze

1.1.4 Variedades

Tapia y Fries (2007), menciona que son siete variedades cultivadas en la región Puno: amarilla, zapallo, chiara, thayacha y Negra, a diferencia de Cajamarca que cultiva cuatro: amarilla con ojos morados, amarilla misia, amarilla con ojos rojos, y amarilla jaspeada. Grau *et al.* (2003), indica que los tubérculos de Mashua muestran una notable amplia gama de colores y características en los nombres de las variedades que a menudo se refieren a ellos. En la Tabla 1 se presenta una lista de los nombres más frecuentes.

Tabla 1
Nombres de las variedades más comunes de Mashua

Nombre	Atributos del Tubérculo
Occe-año	Plomizo
Yana-año	Negro
Checche-año	Gris
Ckello-año, K'ello-año	Amarillo
Muru-año	Morado
Phutilla año	Rojo
Puca-año	Rojo
Yana-año	Negro
Yurac-año	Blanco
Zanahoria-año	Similar a una zanahoria
Zapallo-año	Similar a una calabaza
Quillu-mashua	Amarillo
Putsu-mashua	Fondo amarillo con rayas rojas
Sucusu-mashua	Fondo amarillo con rayas rosadas
Mashua yana-saco	Negra
Mashua-chaucha	Maduración temprana
Mashua-shira	Amarilla con punto morados
Mashua-zapallo	Amarilla y roja
Mashua-zapallo	Amarilla
Sangre de Cristo (Christ's blood)	Fondo amarillo con rayas rojas
Yawar waqac (weeping tears of blood)	Fondo Amarillo con rayas rojas
Huaka hasta o Huagra hasta	Curvada y larga
K'ella año	Olor fétido
Take-año o taqui-año	Buena para el almacenamiento
Kita-año Mashua	Silvestre
Año-año Mashua	Silvestre

Fuente: Grau *et al.* (2003)

1.1.5 Composición química

El contenido nutricional de mashua (Tabla 2) Moquegua (2012) es elevado respecto a otros cultivos básicos de raíces y tubérculos que se comen en todo el mundo, aunque tienen un alto contenido nutricional, no es tan apetecible como otros tubérculos y tiende a abandonarse más fácilmente cuando las personas tienen acceso a otros alimentos (National Research Council, 1989).

Los tubérculos secos pueden contener 14-16 por ciento de proteína, casi 80 por ciento de carbohidratos, aproximadamente 9 mg / 100 g de betacaroteno y casi 480 mg de vitamina C/100 g además contienen todos los aminoácidos esenciales y poseen altos niveles de ácido ascórbico, asimismo contiene isotiocianatos, los cuales son usados en etnomedicina, compuestos fenólicos, antioxidantes como la vitamina C, β - caroteno, flavonoides y antocianinas (Travis, 1999).

Según la National Research Council (1989), la Mashua tiene un alto contenido de carbohidratos (11 % en base fresca), alto contenido de ácido ascórbico (67 mg por 100 g en base fresca). El contenido de proteína puede variar de 6,9 % a 15,9 % en base seca.

La Mashua contiene la mayor cantidad de vitamina C (77,37 mg en 100 g de materia fresca) entre todos los tubérculos. El contenido de provitamina A, expresados como equivalentes de retinol (RE), identificados como caroteno más ricos en especies de tubérculos, con un nivel promedio de 73,56 mgRE/100 g de materia fresca (Barrera *et al.*, 2004).

La Mashua presenta el mayor contenido de antocianinas, carotenoides y compuestos fenólicos, además de capacidad antioxidante, en comparación con otros cultivos, como las papas, olluco y oca, de acuerdo a estudios realizados por Campos *et al.* (2006). En investigaciones llevadas a cabo por Chirinos *et al.* (2008), para caracterizar compuestos fenólicos y no antocianinas en tres genotipos de Mashua de diferentes colores, encontraron antocianinas, principalmente en Mashua de color púrpura, como el ácido hidroxicinámico y derivados del ácido hidroxibenzoico para el genotipo de color amarillo. Asimismo, se destaca la presencia de componentes como las proantocianidinas, que normalmente se encuentran en semillas y la piel de las uvas.

Tabla 2
Contenido nutricional de Mashua por 100 g de muestra fresca

Componente	Unidad	Mashua
Carbohidratos	(g)	11.6
Proteína	(g)	1.6
grasa	(g)	0.6
Humedad	(%)	86
Calcio	(g)	0.7
Ceniza	(g)	0.8
Fibra	(g)	0.8
Fosforo	(g)	42
Hierro	(g)	1.3
Tiamina	(g)	0.06
Ac. Ascórbico	(mg)	67
Riboflavina	(g)	0.08
Niacina	(mg)	0.6
Energía	Kcal	52

Fuente: Moquegua (2012)

1.1.6 Antioxidantes

Los antioxidantes naturales son apreciados porque pueden ser usados en el diseño de alimentos benéficos para la salud (funcionales o nutraceuticos). La importancia de los antioxidantes es crucial para la salud, debido a su capacidad de neutralizar radicales libres, que contienen uno o más electrones desapareados (Thomas, 2000), el antioxidante al colisionar con el Radical Libre (RL) le cede un electrón, oxidándose a su vez y transformándose en un RL débil no tóxico (Peron *et al.*, 2001).

Entre los compuestos que pueden actuar como antioxidantes se encuentran vitaminas C y E, carotenoides, antocianinas, flavonoides y otros compuestos fenólicos (Contreras *et al.* 2010).

La capacidad antioxidante de un alimento depende de la naturaleza y concentración de los compuestos antioxidantes, la cual varía dentro de un mismo

grupo como el de las frutas y hortalizas. Este hecho explica que los diferentes alimentos difieran en su capacidad para prevenir las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) asociadas al estrés oxidativo. (Morillas y Delgado, 2012).

a. Compuestos fenólicos

Desde el punto de vista químico, los compuestos fenólicos son caracterizados por un núcleo benzénico que lleva uno o varios grupos hidroxilos y una cadena lateral funcional (Peña-Neira, 2006).

Los compuestos fenólicos comprenden una amplia variedad de formas químicas: fenoles simples, fenil-propanoides, derivados de ácido benzoico, flavonoides, estilbenos, taninos, lignanos y ligninas (Sahidi y Naczki, 2004).

Los polifenoles son un grupo de compuestos aromáticos con sustituyentes hidroxilos, que se clasifican de acuerdo con el número de átomos de carbono de su esqueleto base: fenoles simples (C6), ácidos fenólicos (C6-C1), acetofenonas (C6-C2), cumarinas (C6-C3), estilbenos (C6-C2-C6), flavonoides (C6-C3-C6), biflavonoides (C6-C3-C6)₂, lignanos (C6-C3)₂, ligninas (C6-C3)_n y taninos condensados (C6-C3-C6)_n e hidrolizables (ésteres de ácidos fenólicos y glucosa) (Andersen y Markham, 2006; Mann, 1994).

Los compuestos fenólicos se pueden agrupar en diferentes clases dependiendo de su estructura química básica, describiéndose a continuación aquellas con mayor interés nutricional (Martínez *et al.*, 2007; Muñoz, 2007).

a.1 Fenoles, ácidos fenólicos y fenil acéticos

Dentro de este grupo se encuentran el fenol, cresol, timol y resorcinol distribuidos en todas las especies vegetales. Igualmente los ácidos fenólicos tales como el gálico, vainílico, p-hidroxibenzoico, y los aldehídos como la vainillina, también son abundantes en plantas superiores y helechos (Avello y Suwalsky, 2006).

a.2 Ácidos cinámicos, cumarinas, isocumarinas y cromonoles

Los ácidos cinámicos (caféico, ferúlico, p-cumárico y sináptico) se encuentran raramente libres, ya que por regla general se hallan presentes en forma

de derivados. Las cumarinas e isocumarinas se encuentran generalmente en forma de glicósidos, mientras que los cromonoles son menos conocidos, y se forman a partir de las antocianidinas ante incrementos del pH medio (Mesa, 2006).

a.3 Lignanos y neolignanos

Son metabolitos de bajo peso molecular formados por el acoplamiento oxidativo de unidades de p-hidroxifenilpropano, las cuales se unen mediante puentes de hidrógeno. Son monómeros y dímeros del ácido hidroxicinámico y también del alcohol cinámico, propenilbenceno y alilbenceno. El término lignano se aplica cuando el compuesto está formado a partir de aniones entre el ácido y/o el alcohol, mientras que cuando se unen las moléculas de propenilbenceno y/o alilbenceno la molécula resultante se denomina neolignano (Puertas *et al.*, 2009).

a.4 Taninos

Son compuestos fenólicos hidrosolubles que contienen un gran número de grupos hidroxilo, capaces de unirse a proteínas y a otras moléculas (Puertas *et al.*, 2009).

a.5 Flavonoides

Constituyen el grupo más importante dentro de esta clasificación dividiéndose en varias subclases con más de 5,000 compuestos, siendo los polifenoles más distribuidos en las plantas. Son sustancias polifenólicas de bajo peso molecular que comparten el esqueleto común de difenilpiranos; dos anillos bencenos unidos a través de un anillo pirona o piran heterocíclico. Esta estructura básica presenta o permite una multitud de sustituciones y variaciones en el anillo pirona dando lugar a flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanololes, isoflavonoides, catequinas, chalconas, dihidrochalconas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas o taninos condensados. (Murillo *et al.*, 2007).

b. Antocianinas

Las antocianinas son uno de los grupos más importantes de pigmentos, que pertenecen a la clase de los compuestos fenólicos llamados flavonoides, son probablemente los colorantes naturales más conocidos y que presentan una gama de colores más amplia presentándose en la mayoría de frutas y vegetales. Son los

colorantes responsables en plantas de colores: naranja brillante, rosa, rojo, violeta y el azul de los pétalos de las flores y de frutas (Saldana, 2004).

El término antocianina es derivado de los vocablos griegos *anthos* (flor) y *kyaneos* (azul), estos compuestos son los responsables de los colores azul, púrpura y rojo en plantas comestibles, principalmente cereales y frutas (Bailón *et al.*, 2004).

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas conformadas por dos anillos aromáticos, A y B, unidos por una cadena de tres átomos de carbono (Figura 4). Variaciones estructurales del anillo B producen las seis antocianidinas conocidas (Tabla 3) (Garzón, 2008).

Tabla 3
Sustituyentes de las antocianinas

Aglicona	Sustituyentes		$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) Espectro visible
	R1	R2	
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH3	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH3	OH	508 (azul-rojo)
Malvinidina	OCH3	OCH3	510 (azul-rojo)

Fuente: Garzón (2008)

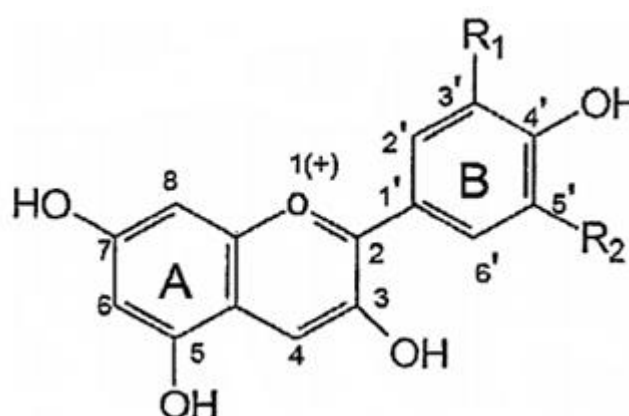


Figura 4. Estructura de la antocianina
Fuente: Durst y Wrolstad (2001)

Estos compuestos pertenecen a la familia de los flavonoides. Son glucósidos de antocianidinas, es decir, que están constituidos por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace glucosídico. La estructura química básica de estas agliconas es el ion flavilio, también llamado 2-fenil-benzopirilio, que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilo (A) y un anillo fenólico (B); ambos unidos por una cadena de tres átomos de carbono (Aguilera *et al.*, 2011).

Las antocianinas pueden encontrarse en forma acilada debido a la acilación de los residuos de azúcares con derivados de ácidos orgánicos alifáticos. Las formas no aciladas son menos estables que las antocianinas que presentan uno o más grupos acilo (De Pascual-Teresa *et al.*, 2002).

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Un incremento en la hidroxilación produce desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que un incremento en las metoxilaciones produce coloraciones rojas (Garzon, 2008; Remes *et al.*, 2006).

Las antocianinas son compuestos fenólicos flavonoides que poseen algunos efectos terapéuticos positivos, principalmente asociados con su capacidad antioxidante. Son un grupo de pigmentos hidrosolubles de origen natural que imparten la coloración rojo, púrpura y azul a muchos vegetales y frutos como cerezas, ciruelas, fresas, frambuesas y moras, entre otras (Castañeda *et al.*, 2009). Pero el interés en los pigmentos de antocianina también se ha incrementado por su color, ya que se podrían utilizar como colorantes naturales (Bridgers *et al.*, 2010).

El color de las antocianinas depende del número y posición de los grupos sustituyentes en la molécula. Un aumento en la cantidad de grupos hidroxilo produce pigmentos de tonos azules, y por el contrario, con predominancia de grupos metoxilo se presenta una tonalidad roja (Stintzing *et al.*, 2002). Se han descrito de 12 a 17 antocianidinas diferentes, pero solo seis de ellas se encuentran comúnmente en frutas, vegetales y cereales como el maíz (Kong *et al.*, 2003; De Pascual-Teresa y Sánchez-Ballesta, 2008).

c. Propiedades de las antocianinas

La propiedad de las antocianinas de ser solubles en agua facilita su incorporación en numerosos sistemas acuosos alimenticios, cualidad que hace que las antocianinas sean colorantes naturales atractivos (Longo y Vasapollo, 2006). Sin embargo, las antocianinas aisladas son altamente inestables y muy susceptibles a la degradación durante el almacenamiento y el procesamiento. Su estabilidad se ve afectada por varios factores tales como pH, temperatura de almacenamiento, estructura química, concentración, luz, oxígeno, solventes, presencia de enzimas, flavonoides, proteínas e iones metálicos; de esta forma su inestabilidad es una limitante para su aplicación como colorante comercial en la industria de alimentos (Olaya *et al.*, 2009).

Las antocianinas se caracterizan por tener una deficiencia de electrones debido a su particular estructura química, que las hace muy reactivas frente a los radicales libres presentes en el cuerpo, por consiguiente, pueden ser potentes antioxidantes naturales (Bridgers *et al.*, 2010).

d. Determinación

Generalmente, la identificación y cuantificación de estas sustancias en los alimentos se realiza mediante técnicas analíticas como HPLC junto con diferentes sistemas de detección, cromatografía de gases, cromatografía capilar electrocinética micelar, electroforesis capilar, espectrofotometría UV-visible, potenciometría, *in vitro* e *in vivo* de análisis (André *et al.*, 2010; Cavar *et al.*, 2012; Melnyk *et al.*, 2011).

e. Capacidad antioxidante

Los consumidores de hoy, están preocupados por su salud, llevar una vida saludable mostrando interés en los alimentos que contienen ingredientes funcionales o bioactivos (especialmente los naturales) que aumentan el valor nutricional de los alimentos y el estado de salud (Hygreeva *et al.*, 2014).

Se denomina antioxidante a “cualquier sustancia que retarda, previene o elimina el daño oxidativo hacia una molécula” o bien, “a la capacidad que tienen determinados compuestos para neutralizar los radicales libres” (López-Alarcón y Denicola, 2013). En este sentido, se ha observado que los arándanos, comparados con otras frutas y vegetales, tienen una alta capacidad antioxidante (Kalt *et al.*,

2000) debido particularmente a sus altas concentraciones de antocianinas y compuestos fenólicos (Jin *et al.*, 2011).

Los antioxidantes son moléculas que neutralizan los radicales libres y previenen los daños causados por ellos. Estas sustancias pueden reducir el daño oxidativo por reaccionar con los radicales libres antes de que alcancen los objetivos biológicos, evitando reacciones en cadena o prevenir la activación de oxígeno más formas reactivas (Ratnam *et al.*, 2006).

f. Producción y extracción de antioxidantes fenólicos

Los compuestos fenólicos son comúnmente extraídos por disolventes orgánicos (líquido-líquido/sólido-Líquido) a partir de materiales vegetales empleando varios métodos de extracción convencionales como la maceración, extracción Soxhlet, extracción por fluidos supercríticos, alta presión hidrostática extracción (HHP) ultrasonido, y extracción asistida por microondas, etc. (Ignat, Volf, y Popa, 2011). Sin embargo, la mayoría de los compuestos fenólicos no puede extraerse fácilmente utilizando solo estos métodos convencionales de extracción ya que existen principalmente un enlace insoluble conjugado con los componentes de la pared celular a través de los esteres, éter o ácidos glicosídicos. La liberación completa de los fenólicos, sin embargo es posible haciendo uso de un ácido o la base de la hidrólisis (Robbins, 2003); un ejemplo claro es que se muestra en la (Figura 5) (Reyes y Cisneros-Zevallos 2007).

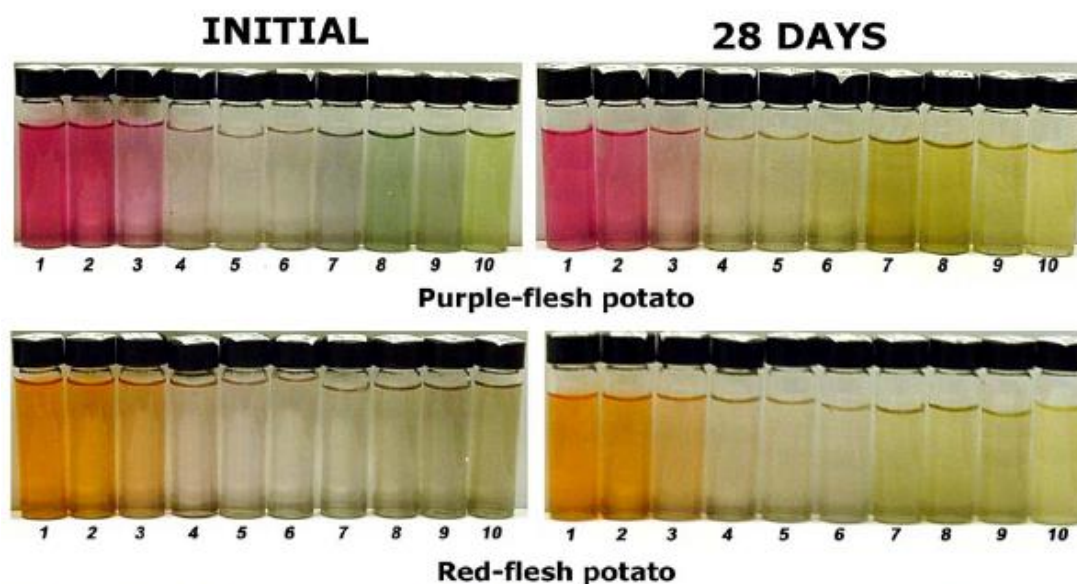


Figura 5. Imagen de extractos de antocianinas acuosas a diferentes valores de pH 1 h después del equilibrio y después de 28 días de almacenamiento a 25 ° C en la oscuridad

Fuente: Reyes y Cisneros-Zevallos (2007)

g. Fuente de antioxidantes

Hay varias fuentes de antioxidantes: aquellos que podemos obtener de los alimentos y suplementos alimenticios, por ejemplo, vitaminas E, D y β caroteno y aquellos que se producen dentro de nuestros propios cuerpos, son menos conocidos, pero de vital importancia. El segundo tipo incluye moléculas como glutatión y ácido úrico que puede compactar radicales directamente; y enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa que pueden liberar radical en productos no tóxicos. También hay melatonina, que viene como un nuevo miembro en sistemas antioxidantes además de macro-moléculas como caeruloplasmin y transferrina y una matriz de pequeñas moléculas como metionina (Tomas-Barberan y Robins, 1997).

Además de extractos de plantas, numerosos compuestos naturales son útiles como antioxidante, desde alfa tocoferol y beta caroteno, tales como los compuestos fenólicos (taninos, flavonoides, antocianinas, xantonas, etc.), terpenos (sesquiterpenos y diterpenos), alcaloides y compuestos de azufre orgánico (Marzouk *et al.*, 2006).

1.2 Biosensores

1.2.1 Origen y características

Santoro y Ricciardi (2016), indica que la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), define al biosensor como un dispositivo que usa reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas aisladas, inmunosistemas, tejidos, orgánulos o células completas para detectar compuestos químicos generalmente por señal eléctrica, térmica u óptica.

Los biosensores se consideran herramientas poderosas para el análisis de interacciones biomoleculares en análisis clínicos, bioquímicos y ambientales. Las aplicaciones de los biosensores se desarrollan principalmente para el monitoreo ambiental y de bioprocesos, control de calidad de alimentos, agricultura, antibioterrorismo y sistemas médicos (Santoro y Ricciardi 2016). El uso de biosensores ofrece mayores ventajas que los tradicionales (Tabla 4), los dispositivos innovadores representan una alternativa válida a los métodos convencionales utilizados en la industria alimentaria para la detección de contaminantes peligrosos como micotoxinas, metales pesados, pesticidas, residuos de antibióticos y microorganismos patógenos.

Tabla 4

Comparación entre técnicas analíticas tradicionales y biosensores

Técnicas analíticas tradicionales	Biosensores
Costoso	Económico
Pérdida de tiempo	Detección en tiempo real
Personal bien capacitado	Uso simple
Manipulación de muestras pesadas	Preparación limitada de muestras
Equipo de alta tecnología	Dispositivos simples y portátiles

Fuente: Santoro y Ricciardi (2016).

Snober (2016), menciona que el uso de papel de celulosa en los métodos de análisis, se conoció desde el siglo XVII con el uso de papel de tornasol, la primera obra publicada fue reportado por Hugo Schiff en 1866 que describe la detección colorimétrica de ácido úrico por una reducción de los iones de plata en un papel

de filtro impregnado con carbonato de plata; los siguientes años fueron testigos de algunas otras aplicaciones, incluyendo la detección de cadmio (Bayley, 1878), y la detección de azúcar en la orina (Oliver, 1883). En 1937, Yagoda reportó el primer patrón hidrofóbico de papel de filtro usando estampado en relieve de parafina para confinar la zona de detección (Yagoda, 1937). El concepto fue utilizado más tarde por Muller y Clegg para diseñar canales de fluidos (Müller y Clegg, 1949). En su informe fundamental, Yagoda explica la motivación inicial de lo que conocemos hoy como la microfluídica de papel.

El primer ensayo basado en papel, como la primera fabricación de un canal fluídico en papel fue por Müller y Clegg en 1949. La introducción real de la microfluídica en papel al mundo científico se atribuyó al Grupo Whitesides de la Universidad de Harvard, cuyo primer dispositivo fue un ensayo de proteína y glucosa creado por un método de litografía en papel (Martinez *et al.*, 2007), desde entonces, se ha desarrollado una gran variedad de técnicas de fabricación, entre los métodos fundamentales para fabricación se tiene: cortado, foto-litografiado, polidimetil-siloxano (impresión PDMS), inyección de tinta, inmersión en cera, impresión flexográfica, impresión en cera, estampado, tratamiento de plasma, impresión por inyección de tinta, deposición en fase de vapor, grabado en húmedo, tratamiento de corona manual (Figura 6) (Akyazi, Basabe-Desmonts y Benito-Lopez, 2018).

Toley *et al.* (2015), han informado del desarrollo de un dispositivo para microfluidos de papel con accionamiento de la válvula de control de fluido que puede operar por tiras de papel móviles y fluido activado de un elemento (esponja). El papel se considera un material de sustrato atractivo y prometedor para aplicaciones microfluídicas, no solo debido a su costo extremadamente bajo y su ubicuidad, sino también debido a sus propiedades mecánicas que incluyen flexibilidad, ligereza y bajo grosor.

El papel se produce a partir de una suspensión acuosa diluida de fibras de celulosa que se escurren a través de un tamiz, se prensa y se seca, para producir una lámina formada por una red de fibras entrelazadas al azar.

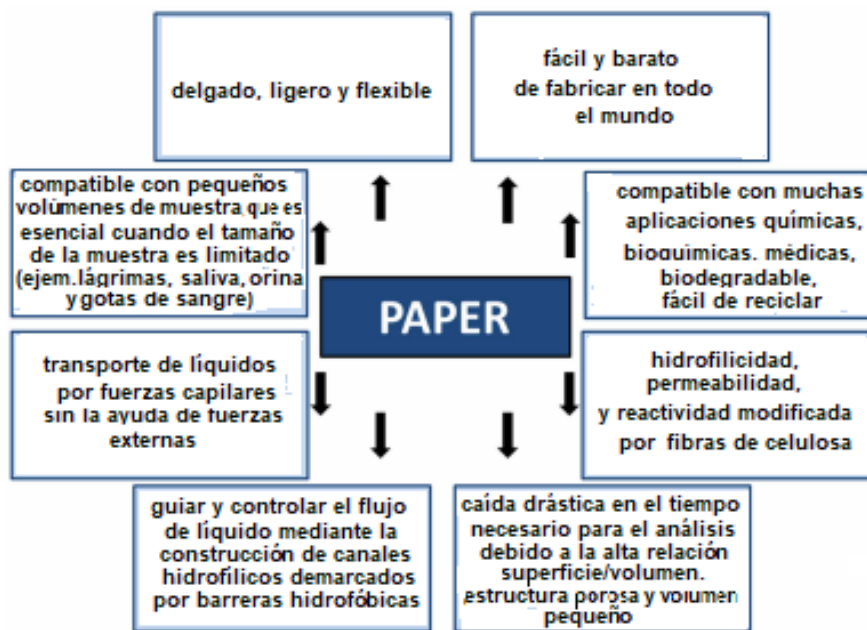


Figura 6. Puntos clave de papel para dispositivos analíticos basados de papel microfluídico (μ PAD)

Fuente: Akyazi *et al.* (2018)

1.2.2 Sistemas de manejo de fluidos

a. Patrón de micro-canales

Para dirigir el flujo de líquido en los dispositivos de papel, el papel tiene que ser modelado en los canales hidrofílicos separados por paredes hidrófobas. Los patrones se utilizan para evitar la difusión de líquido en las zonas no deseadas, concentrar las reacciones químicas en las zonas de detección específicos, y permitir paralelización de múltiples reacciones en una sola tira de papel. Uno de los primeros métodos utilizados para la fabricación de micro-canales de biosensores basados en papel es la fotolitografía. La fotolitografía es una técnica de fabricación convencional en la microtecnología basado en la exposición UV de una resina fotosensible a través de una máscara transparente que contiene los patrones deseados (Davaji y Lee, 2014, Gu *et al.*, 2014 y Hu *et al.*, 2014).

b. Fabricación

Las técnicas de fabricación y los patrones se pueden extender a sistemas de microfluidos 3D más complejos. El uso de dispositivos de microfluidos en papel

3D ofrece una amplia gama de capacidades de más de flujo lateral en los sistemas de 2D. Las ventajas incluyen la capacidad de (i) llevar a cabo un gran número de ensayos en un dispositivo miniaturizado, (ii) distribuir rápidamente la muestra a través de la dirección z , x , y , lateralmente a través de la x , y del plano Y , y (iii) realizar múltiples etapas de ensayo en paralelo mediante el aprovechamiento de capilaridad a través de capas de papel (Ma *et al.*, 2015; Martínez *et al.*, 2008; Mosadegh *et al.* 2015 y Yetişen *et al.*, 2013).

c. Sistemas de caudal de control

Los sistemas de tratamiento de líquidos requieren la capacidad de detener, redirigir o controlar la velocidad del flujo de fluido, así como para administrar las mezclas de muestras separadas.

A diferencia de los dispositivos de microfluidos convencionales basados en el flujo impulsado por presión que utilizan bombas, válvulas automatizadas o sistemas de control neumáticos (Au *et al.*, 2011 y Desai *et al.*, 2012), la microfluídica en papel proporcionan un flujo no de succión alternativa mediante la generación de fluido por transporte de capilaridad (Kumar *et al.*, 2015 y Zhang *et al.*, 2015); dependiendo de las aplicaciones funcionales prácticas, tales como el transporte, mezcla y detección, se han desarrollado varios métodos para controlar el flujo de fluido en los biosensores basados en papel.

Martínez *et al.* (2010) efectúan una propuesta para el control del flujo en un sensor de microfluidos en papel (Figura 7): (A) control del tiempo en la red de papel 2D suministrada por un fluido. Cada líquido de color puede llegar a la "zona de detección" en un tiempo diferente (Lutz *et al.*, 2013); (B) El control de flujo y difusión en un dispositivo basado en papel en forma de una estructura Y 3D. Alternando la longitud de entrada (L) induce la tasa de flujo de fluido modificado (Q) y nos da los resultados en una relación de fluido variable (W_2/W_1) en el flujo descendente (Osborn y otros 2010). (C) Distribución del flujo de fluido sin mezclar utilizado tanto vertical como lateralmente (i) capilaridad en dispositivos analíticos de papel microfluídico 3D (Martínez *et al.*, 2008) y (ii) El protector 'sobre' la cinta permite que el fluido se evapore de un canal a otro verticalmente en el canal microfluídico (Martínez *et al.*, 2010).

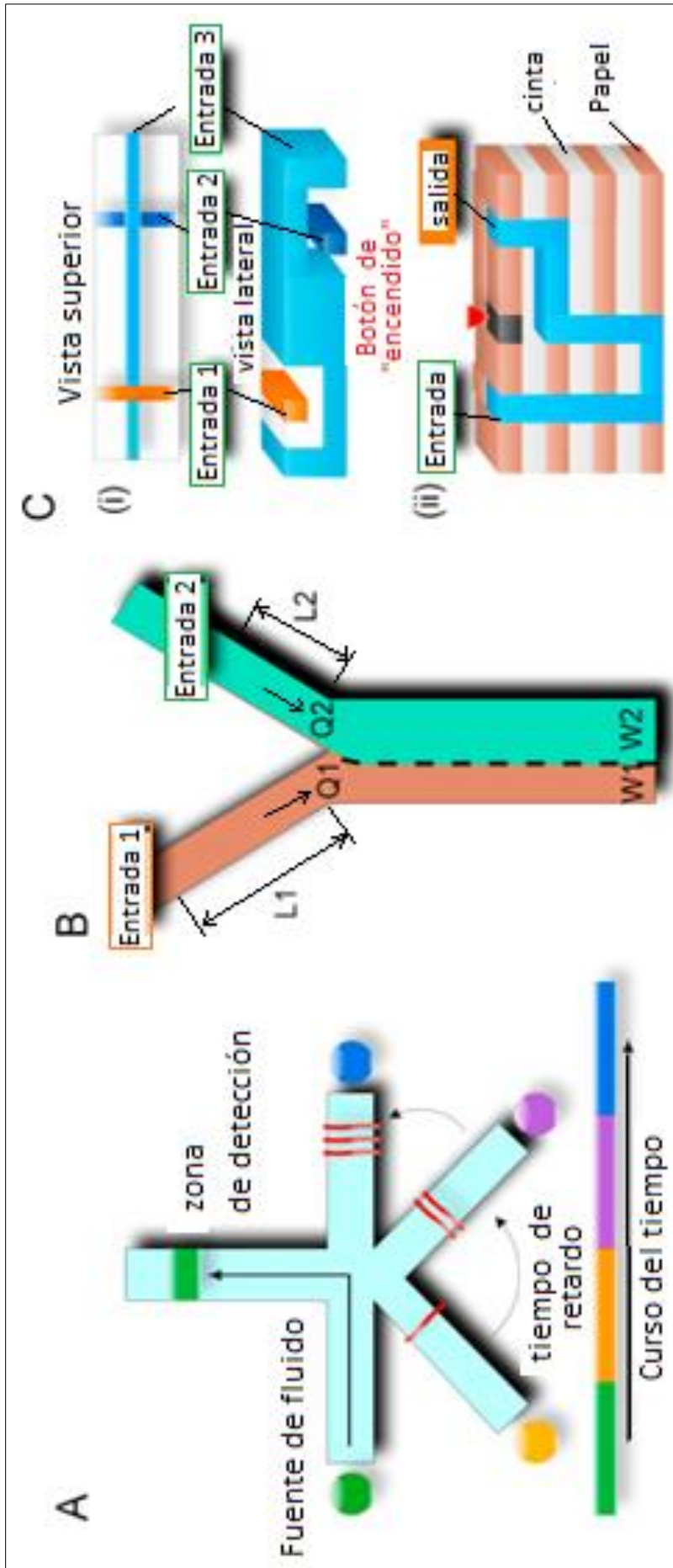


Figura 7. Control de flujo en el sensor de microfluidos en papel
Fuente: Martínez *et al.* (2008)

d. Sondas de detección de pH basado en antocianinas

Los sensores ópticos para determinar el pH son obtenidos por inmovilización de los indicadores de pH en una base sólida, se pueden clasificar en tres grupos. El primero implica colorantes inmovilizados por absorción física sobre un soporte sólido como un intercambiador de iones (Moreno *et al.*, 1990), el segundo comprende colorantes covalentemente unidos a un soporte hidrófilo, como celulosa o vidrio (Safavi y Bagheri, 2003), y el tercero implica colorantes físicamente atrapados en matrices poliméricas (Sotomayor *et al.*, 2001).

Abolghasemi, Sobhi y Piryaei (2016), desarrollaron un sensor óptico de pH ecológico, utilizando antocianinas de uva Siah Sardasht, en un acoplamiento optimizado, pH de 10 y una concentración de colorante de 100 mg L⁻¹, dicho sensor responde a los cambios de pH en un rango de 1 a 10 con un tiempo de respuesta de 3 minutos y reproducibilidad menor que 0.3%.

Chen y Gu (2013) utilizó pigmento de repollo morado, en un amplio intervalo de pH de 2 a 11 y tiempo de 1 a 2 minutos y reproducibilidad menor a 0.3 %. En cambio, Ma y Wang (2016), utilizó extractos de piel de uva que fueron incorporados en la goma de tara, para preparar un film sensor de pH colorimétrico con un rango de pH de 1 a 10. Asimismo, Pourreza y Golmohammadi (2015), desarrollo un nuevo dispositivo en papel para determinar pH usando nanopartículas de cúrcuma empleando el método de la cera, el color del sensor cambia de amarillo a anaranjado y de rojo a marrón en el rango de pH 7 a 13 y varió entre 1.5 a 2.3% cuando se midió el pH en muestras de agua. Mientras que Martínez *et al.* (2007), modeló la fotorresistencia SU-8 incrustado en papel, haciendo uso de la fotolitografía, que a continuación se muestra.

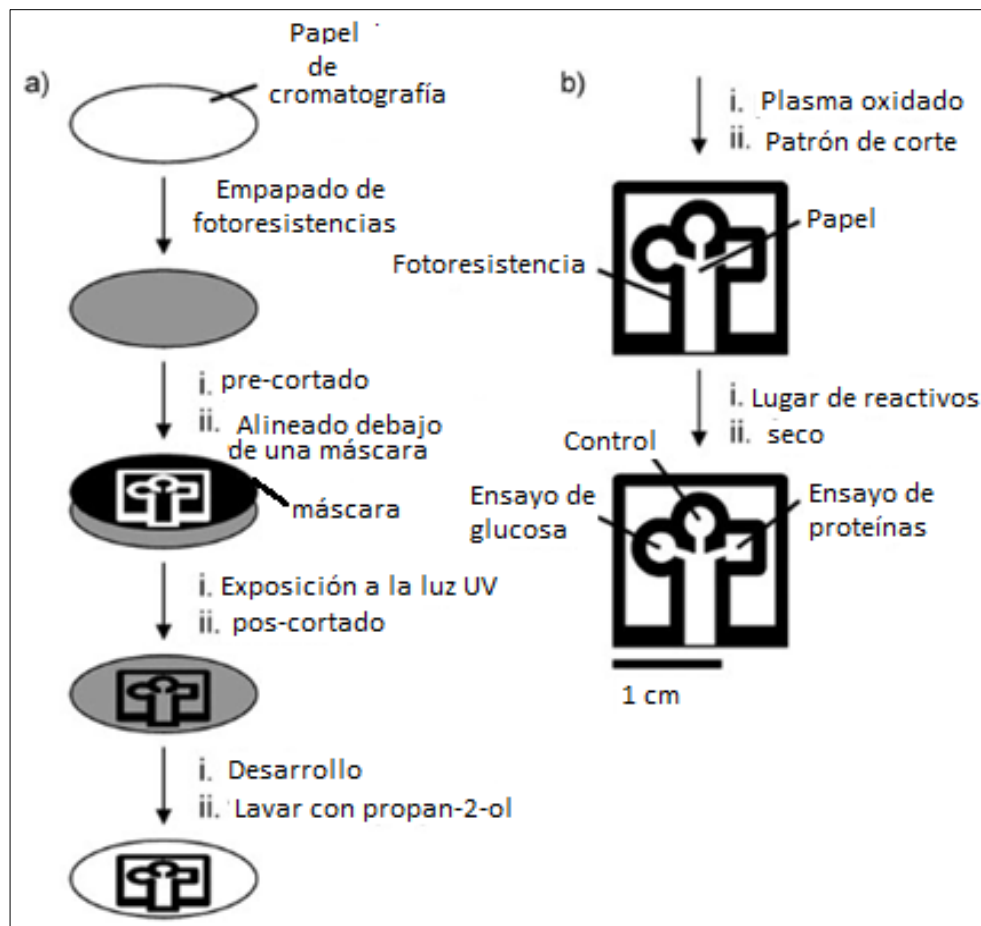


Figura 8. Control de flujo en el sensor de microfluidos en papel en canales de tamaño milimétrico.

Fuente: Martínez *et al.* (2007)

Nota:

a) Fotolitografía para modelar la fotoresistencia SU-8 incrustada en papel

b) Papel modelado modificado para bioensayos

1.2.3 Clasificación de los biosensores

Los biosensores, están compuestos de tres componentes principales: el elemento de reconocimiento biológico, el transductor y el sistema de lectura de señal. Una vez que la sonda interactúa con el bioreceptor, el transductor traduce el evento de reconocimiento en una señal medible que luego se convierte en un resultado apropiado (Figura 9) (Santoro y Ricciardi, 2016; Ramon 2017).

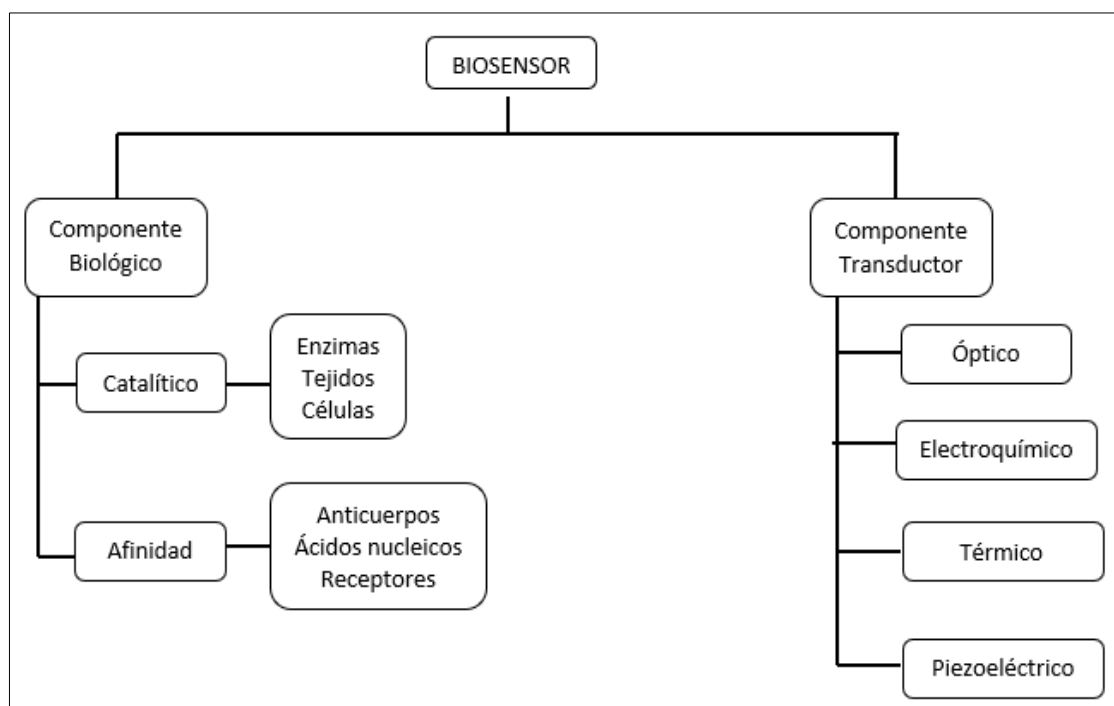


Figura 9. Clasificación de los biosensores

Fuente: Ramón (2017)

a. Clasificación en función al componente biológico

Los biosensores catalíticos, en cuanto al mecanismo de reconocimiento este se basan en la unión y posterior reacción de catálisis del sustrato específico de cada componente biológico. El seguimiento de la reacción se puede realizar mediante la detección de la formación de uno de los productos o de la desaparición de uno de los reactivos de partida. Dentro de esta categoría se encuentran los biosensores enzimáticos, los celulares y los tisulares, siendo las enzimas el componente biológico más ampliamente utilizado para el desarrollo de biosensores catalíticos (Santoro y Ricciardi, 2016).

b. Clasificación en función del componente trasductor

Los ópticos, se basan en la medida de la interacción entre la radiación electromagnética y la materia, la cual puede originar variaciones en intensidad, amplitud, polarización, frecuencia, velocidad de la radiación, etc.; lo que implica que estos biosensores pueden medir por ejemplo cambios de absorbancia, luminiscencia difracción o refracción de la radiación. A causa de esta gran variedad de propiedades medibles por los biosensores ópticos, son muy numerosas y diversas las aplicaciones desarrolladas para este tipo de biosensores, destacando

la monitorización clínica, el análisis de contaminantes y la determinación de compuestos de interés alimentario.

1.3 Antecedentes

Snober Ahmed *et al.* (2016) efectuaron un estudio denominado “Sensores químicos y biológicos basados en papel: aspectos de ingeniería” concluyendo en lo siguiente; notables esfuerzos se han dedicado a sensores químicos y biosensores basados en el papel en los últimos años, impulsado principalmente por la promesa de alcanzar el mejor equilibrio entre rendimiento, accesibilidad y simplicidad. Es así que, debido al bajo costo y rapidez en las pruebas de prototipos de estos sensores, la investigación reciente se ha centrado en proporcionar dispositivos de diagnóstico asequibles para el mundo en desarrollo. El reciente progreso en la sensibilidad, la multifuncionalidad y la integración de los dispositivos analíticos basados en papel de microfluidos (μ PADs), cada vez sugiere que esta tecnología no sólo es atractivo en entornos con recursos limitados, sino que también representa un serio desafío a los biosensores basados en el uso de silicio, vidrio y polimerización, esta revisión describe los aspectos desarrollados en los últimos años con un enfoque de diseño, ingeniería y química.

Qu *et al.* (2014), desarrollaron un sensor de multi-indicadores inmovilizados para detección de pH en el rango de 0-14 basado en redes neuronales para medir el pH de muestras de agua, por su parte Capel-Cuevas *et al.* (2010), desarrollaron y validaron un indicador de fluorescencia, misma que fue desarrollado y validado para medir el pH de agua de océano usando como fuente de luz un sistema led de iluminación de baja potencia, similarmente Clarke *et al.* (2015) desarrollaron un nano sensor fluorimétrico de pH basado en nano partículas de sílice modificado con quitosano e isotiocianato con un rango lineal de pH = 5.5 a 8.0, que demostró aplicabilidad en muestras de agua.

Pourreza y Golmohammadi (2015) describen el diseño y fabricación de un nuevo dispositivo de laboratorio en papel para la detección de pH usando nano partículas de curcumina (CURNs); utilizaron el método de la cera de inmersión, misma que consistió en que el color del papel cargado con CURNs cambió de amarillo a naranja y de rojo a marrón en el rango de pH de 7-13, las imágenes tomadas en laboratorio fueron comparadas con el cambio en la intensidad de color medido con un pHmetro la que fue utilizada como una señal analítica para la detección cuantitativa de pH. Los parámetros que afectan el sensor de pH fueron optimizados a fin de mejorar la selectividad y la

sensibilidad del método, en condiciones óptimas, la intensidad media de color fue linealmente proporcional al pH en el intervalo de 8-13 y las desviaciones estándar relativas de 10 mediciones replicadas de pH 9 y pH 12 fueron de 2,3% y 1,5%, respectivamente. El sensor desarrollado se aplicó con éxito a la determinación de pH en diferentes muestras de agua con resultados satisfactorios.

Abolghasemi *et al.* (2016) desarrollaron un nuevo sensor óptico de pH ecológico para un amplio rango de valores de pH en base a la inmovilización de extracto de uva en un biopolímero de agarosa ópticamente transparente; para ello las antocianinas de uva *Siahe Sardasht* se extrajeron y se utilizaron como un colorante adecuado para la preparación de un sensor óptico de pH, por su inmovilización sobre una película de agarosa transparente. En un acoplamiento optimizado, pH de 10 y una concentración de colorante de 100 mg L⁻¹, se obtuvo un sensor sensible con estabilidad a largo plazo. El sensor responde rápidamente a los cambios de pH en un rango de 1 a 10 con un tiempo de respuesta de 3,0 min y reproducibilidad menor que 0,3% (RSD). El sensor fue montado en celdas de cuarzo y aplicado exitosamente para el monitoreo del pH. Ninguna prueba de lixiviación del colorante o cualquier flujo de señal fue observada.

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 Identificación del problema

La contaminación por el uso de reactivos en diferentes laboratorios del país, es muy común misma que forma parte de la sobrecarga de las aguas residuales industriales en la actualidad, la que se convierte en un foco de contaminación afectando al ecosistema, asimismo el uso de estos reactivos se viene dando en forma indiscriminada y sin el debido control que se requiere; las que deben de ser sustituidas por derivados que no dañen al medio ambiente, que bien pueden ser extraídos de productos que cuentan con ciertas bondades y que podrían reemplazar a los reactivos químicos que se encuentran actualmente en el mercado y ser una alternativa de solución en la gama de la química verde, las cuales son poco estudiados a la fecha y más aun no se cuenta con la aplicación en el mercado, esto debido al desconocimiento y a la poca información y difusión existente.

Compuestos que podrían sustituir a la cantidad de reactivos existentes en el mercado y que tienen la misma funcionalidad que los compuestos químicos, vale decir que es posible extraer compuestos con características bioactivas tales como la gran gama de antioxidantes a partir de los tubérculos andinos con que cuenta nuestra Región, en especial la Mashua que es rica en compuestos funcionales y con una gran cantidad de antocianinas variable de acuerdo al ecotipo que tiene relación con la coloración de los mismos, que hasta la fecha se ha estudiado en el campo de la industria alimentaria para su aplicación como antioxidante, la cual solo llega a niveles de aplicación en reemplazo de los antioxidantes a nivel de laboratorio, pese a que se conoce las enormes bondades de este tubérculo andino su uso es casi nulo en el campo industrial, se sabe además que los

componentes con que cuenta la Mashua serían anti carcinogénicos, a su vez las antocianinas presentes en este tubérculo andino pueden ser utilizados como patrones en reemplazo de diferentes reactivos químicos, tal es el caso de su funcionalidad como sonda a fin de poder medir el pH de diferentes productos, pero para ello se hace necesario la validación de los extractos de antocianina en diferentes productos, para su posterior utilización en reemplazo de los compuestos químicos que hoy en día se vienen utilizando. Vale señalar que bajo la metodología del uso de los μ PADma se utilizaría pequeñas cantidades de muestra y sonda (a niveles de microlitros), la cual también contribuiría al uso de una nueva tecnología, de bajo costo y con resultados confiables.

Se hace necesario señalar que el pH es un parámetro fisicoquímico de interés en muchas áreas de conocimiento, tales como la ciencia de los alimentos, biomedicina y ciencias ambientales. A nivel de laboratorio, el pH es rutinariamente medido empleando pH metros, su uso en el control de procesos y evaluaciones in situ tales como, en estudios ambientales, es menos habitual y que mencionar en biomedicina, donde se dispone de pequeñas cantidades de muestras biológicas y por tanto, se requiere de micro-dispositivos analíticos.

Los micro-dispositivos analíticos de papel de bajo costo son una alternativa o solución al uso de pH metros en la medición de pH, los cuales gozan de enorme aceptación por su versatilidad y portabilidad. Aunque en sus inicios, estos micro-dispositivos analíticos se desarrollaron empleando sensores de naturaleza sintética, en la actualidad, en el contexto de la química analítica sostenible, existe mucho interés en el desarrollo de sensores empleando antocianinas obtenidos de fuentes naturales (sensores ecológicos) para reducir el impacto ambiental derivado del uso de estos dispositivos y el riesgo sobre el personal que trabaja con estos sensores.

La Mashua (*Tropaeolum tuberosum*) es un tubérculo cultivado en las regiones del sur del país y es una fuente importante de antocianinas presentes tanto en la cascara como en la parte comestible del recurso. La diversidad química de las antocianinas de la Mashua derivada de su biodiversidad (existen diferentes ecotipos de Mashua desde la amarilla clara hasta el morado), podría ser de interés como fuente de sensores ecológicos de pH para el desarrollo de micro-dispositivos que merecen ser estudiado. Además, desde el contexto de la revalorización de los productos alimenticios olvidados como es el caso de la Mashua, el desarrollo de sensores en base a antocianinas de Mashua es una alternativa

económica atractiva dado el precio de los mismos y el creciente interés en la reducción de contaminantes y el impacto ambiental que las actividades del hombre pueden generar.

2.2 Enunciados del problema

A partir del problema planteado, se plantea las siguientes interrogantes:

- ¿La concentración de antocianinas extraídas son influenciadas por los ecotipos de Mashua?
- ¿Los diversos patrones de pH afectaran en el color de las antocianinas de Mashua?
- ¿Las antocianinas de Mashua serán un referente para el diseño y fabricación de un micro-dispositivo analítico en papel (μ PAD) de pH?
- ¿Se podrá validar el μ PADma como multi-sensor de pH ecológico en diferentes productos alimenticios?

2.3 Justificación

El pH es un parámetro fisicoquímico muy utilizado en muchas áreas del conocimiento, cuya medida se efectúa empleando pH metros para lo cual se requiere de muestras no menores a 10 ml las cuales en la actualidad vendrían a ser tamaños de muestra relativamente grandes, a su vez que los equipos si son trasladados de un lugar a otro se descalibran con facilidad y las medidas obtenidas muchas veces son erróneas y los reactivos o sondas que se requieren son de naturaleza química mismas que dañan al medio ambiente, y que hoy en día se viene dando una nueva corriente basada en la química verde misma que viene propiciando el estudio de nuevas alternativas de solución, es decir el uso de pequeñas cantidades de muestra y sonda y que a su vez sean amigables con el medio ambiente, por lo tanto, se requiere de micro-dispositivos analíticos que pueden ser muy bien utilizados, las que requieren de microlitros de muestra y sonda para la detección de diferentes compuestos.

Los micro-dispositivos analíticos de papel de bajo costo son una alternativa al uso de pH metros, los cuales gozan de enorme aceptación por su versatilidad y portabilidad, es por ello que, existe un creciente interés por el desarrollo de sensores empleando antocianinas obtenidos de fuentes naturales (sensores ecológicos) para reducir el impacto ambiental

derivado del uso de estos dispositivos y el riesgo sobre el personal que trabaja con estos sensores. El desarrollo de sensores en base a antocianinas de Mashua es una alternativa económica atractiva dado el precio de los mismos, a más de revalorar el uso de este tubérculo andino.

2.4 Objetivos

2.4.1 Objetivo general

Desarrollar y validar un micro-dispositivo analítico en papel para la determinación de pH basado antocianinas de Mashua.

1.1.1 Objetivos específicos

- Determinar la concentración de antocianinas extraídas de los ecotipos de Mashua.
- Determinar el efecto de los diversos patrones de pH sobre el color de las antocianinas de Mashua.
- Diseñar y fabricar un micro-dispositivo analítico en papel (μ PAD) de pH basado en antocianinas de Mashua (μ PADma).
- Validar el μ PADma como multi-sensor de pH ecológico en diferentes productos alimenticios.

2.5 Hipótesis

2.5.1 Hipótesis general

Las antocianinas de los extractos de tres ecotipos de Mashua cambian de color de manera diferencial frente al pH y por lo tanto puede ser empleada en el desarrollo de sensores analíticos de pH.

2.5.2 Hipótesis específicos

- Cuanto mayor es la coloración de la Mashua, la concentración de antocianinas extraídas será mayor.
- Los diversos patrones de pH cambian al ser aplicados en las antocianinas de Mashua.

- El micro-dispositivo analítico diseñado y fabricado en papel (μ PAD) de pH basado en antocianinas de Mashua (μ PADma) resultan adecuados para la medición de pH.
- Con los diferentes productos alimenticios se valida el μ PADma como multi-sensor de pH ecológico.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar experimental

El presente trabajo de investigación se desarrolló en las instalaciones de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, en los Laboratorios de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y de la Facultad de Ciencias Agrarias y en los Laboratorios de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional de Moquegua.

3.2 Materia prima

Se utilizó tres ecotipos de Mashua: *Santo cristo A* (Figura 10 y Figura 11), *Yana Añu* (Figura 12 y 13) y *Santo Cristo B* (Figura 14 y Figura 15), provenientes de la zona circunlacustre de la Provincia de Yunguyo – Puno.



Figura 10. Mashua Santo Cristo A

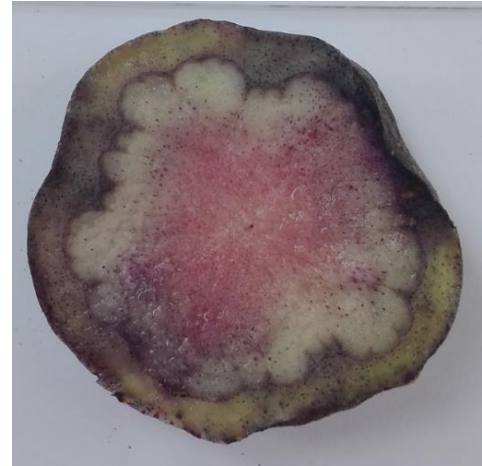


Figura 11. Mashua Santo cristo A corte transversal



Figura 12. Mashua Yana Añu



Figura 13. Mashua Yana Añu corte transversal



Figura 14. Mashua Santo Cristo B



Figura 15. Mashua Santo Cristo B corte transversal

3.3 Metodología y diseño experimental

En la figura 16 se muestra el diagrama general a seguir para el desarrollo de la presente investigación.

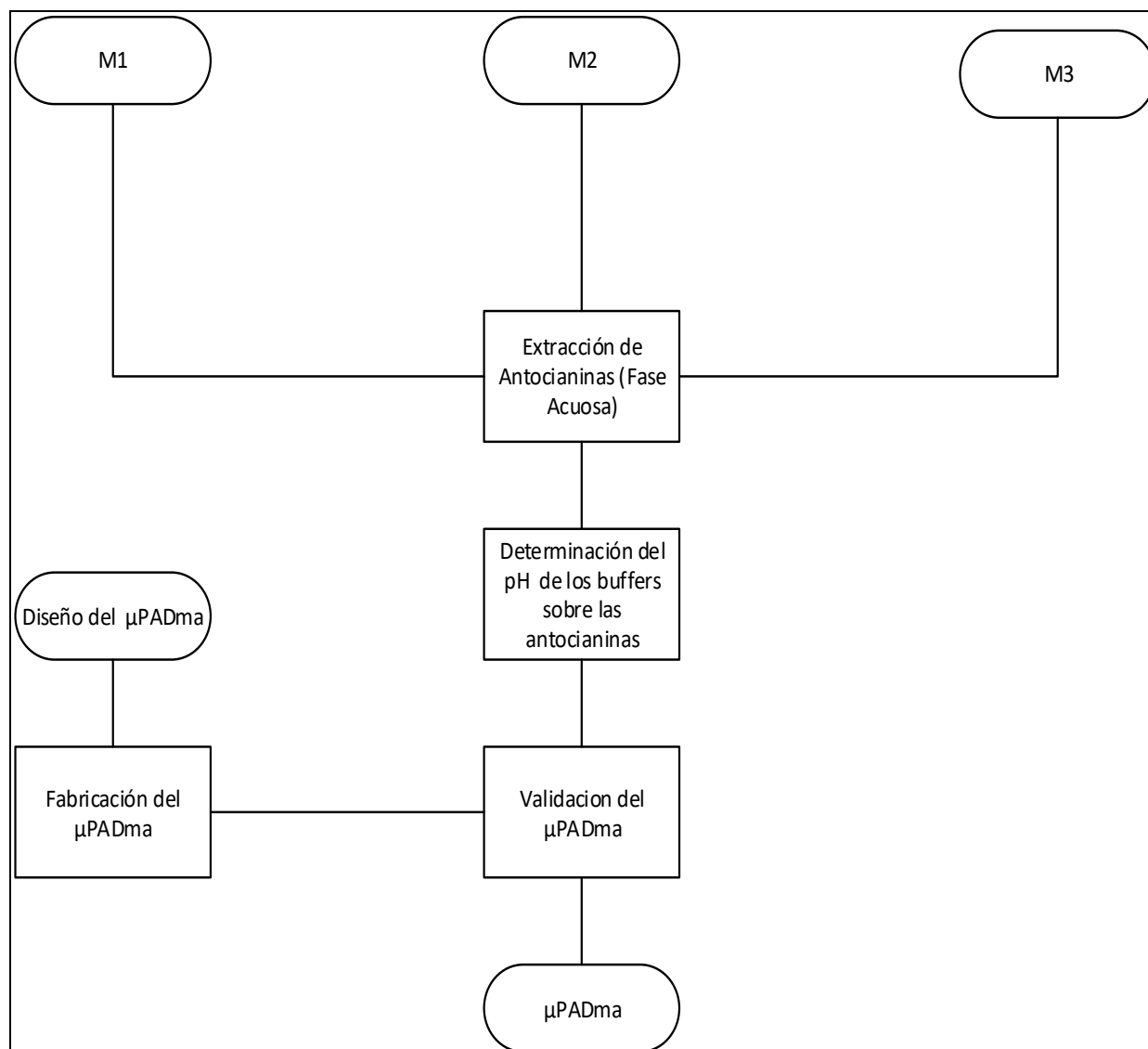


Figura 16. Diagrama de flujo para el desarrollo y validación de un dispositivo analítico en papel para la determinación de pH basado en multisensores ecológicos de Mashua.

M1, M2, M3: Muestras de tres ecotipos de Mashua, μPAD: Micro dispositivos analíticos basados en papel, μPAD: microPAD, μPADma: microPAD de Mashua

3.4 Materiales y Métodos

3.4.1 Primer objetivo: Determinar la concentración de antocianinas extraídas de los ecotipos de Mashua.

a. Materiales y equipos de laboratorio

Materiales

- Cuchillos
- Vaso de precipitación
- Recipientes
- Tubos de ensayo con tapa rosca

Equipos

- Extractora marca OSTER motor de 300 watts
- Centrifugadora de 4000 rpm de velocidad
- Balanza sartorius (modelo TE 4101)
- Cámara fotográfica Huawei PSIMCARD modelo ALE-L21, versión EMUI 4.00, versión de Android 6.00 CPU 8 núcleos, 1.2 GHz, RAM 2 GB
- Espectrofotómetro UV/Vis; Marca: Perkin-Elmer, USA, modelo LAMBDA Génesis 5/Milton Roy, Fabricación: U.S.A., Material: Vidrio de 10mm de paso óptico, puerto: RS-232C, monocromador: 1200 líneas/mm, 220 voltios.
- Refrigeradora; Marca: Electrolux, Fabricación: U.S.A., color: Plomo.

b. Extracción de antocianinas de Mashua en fase acuosa

La extracción de las antocianinas presentes en los tres ecotipos de Mashua se efectuó en medio acuoso, para cuya preparación de estos extractos acuosos; las muestras fueron lavadas y pesadas y luego ser extractadas con la ayuda de una extractora, posteriormente esta es centrifugada en una centrifuga a 4000 rpm por

un tiempo de 5 minutos y el sobrenadante claro se recogió en unos tubos con rosca, y nuevamente se centrifugo a 3500 rpm por un tiempo de 5 minutos, y el sobrenadante se recogió en unos tubos con roca, muestras que fueron refrigeradas y se dejó reposar en estas condiciones por 24 horas y almacenadas en estas condiciones para su posterior tratamiento.

En la Figura 17, se muestra en un diagrama de flujo las operaciones a seguir para la extracción de las antocianinas de los tres ecotipos de Mashua en fase acuosa.

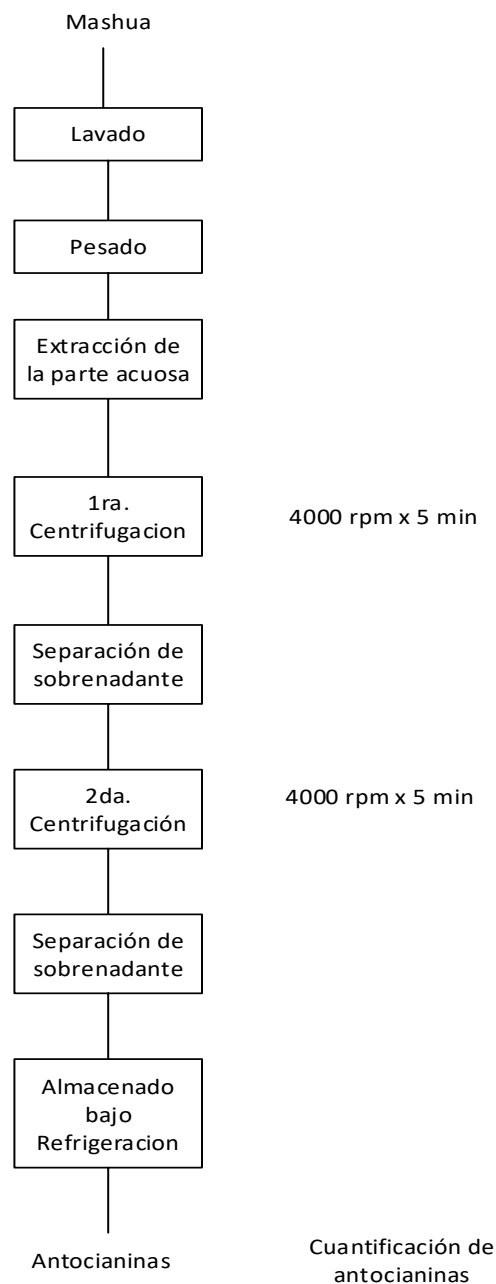


Figura 17. Diagrama de flujo para la extracción de antocianinas de Mashua en fase acuosa.

c. Variables

Variables Independientes o de estudio

- Variedades de Mashua:

Ecotipo 1: M1

Ecotipo 2: M2

Ecotipo 3: M3

Variables dependientes o de respuesta

- Cantidad de antocianinas

d. Determinación de antocianinas totales

Las antocianinas totales se determinó por la metodología recomendada por Lee *et al.* (2005), para lo cual se efectuó las lecturas de la absorbancia a 520 y 700nm y el factor de dilución utilizado fue de 40. Cuya fórmula es la siguiente:

$$\begin{aligned} & \text{Antocianinas totales (mg cianidina - 3 - glucosido)/L} \\ &= \frac{(A1 - A2) \times 449.2 \times FD \times 100}{26900} \end{aligned}$$

e. Diseño estadístico

El experimento fue conducido bajo un Diseño Completo al azar con tres replicas, teniendo un total de tres tratamientos y nueve unidades experimentales, cuyo modelo matemático es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

μ_{ij} : Es el efecto medio

τ_{ij} : Es el efecto del i-esimo tratamiento (ecotipos de Mashua)

ε_{ij} : Error experimental

3.4.2 Segundo Objetivo: Determinación de los diversos patrones de pH sobre el color de las antocianinas de Mashua.

a. Materiales y equipos de laboratorio

Materiales

- Fiolas
- Pipetas
- Bombilla

Equipos

- Cámara fotográfica Huawei PSIMCARD modelo ALE-L21, versión EMUI 4.00, versión de Android 6.00 CPU 8 núcleos, 1.2 GHz, RAM 2 GB
- Refrigeradora; Marca: Electrolux, Fabricación:U.S.A., color: Plomo.
- pH-metro; SI Analytics. HandyLab 100 Order Nr 285202370
- Micropipeta 0.5 a 10 μ L Finnpipette, thermo Labsystems Y52949
- Micropipeta 10 a 100 μ L BOECO, Germany, serie 10131832
- Micropipeta 100 a 1000 μ L BOECO, Germany, serie 11119391

Reactivos

- Buffers pH:
Grupo 1: 2.06; 4.00; 5.64; 6.87; 7.00
Grupo 2: 1; 1.41; 3.92; 4.5; 5.15; 6.77; 7
- 0.2 M KCl (Cloruro de potasio)
- 0.1 M KHP (Hidrogenoftalato de potasio o ftalato ácido de potasio)

- 0.1 M KH_2PO_4 (Fosfato de Potasio monobásico o Fosfato monopotásico o dihidrogenofosfato de potasio)
- 0.2 M HCl (Ácido clorhídrico)
- 0.1 M NaOH (Hidróxido de sodio)
- Agua destilada
- Solución buffer a pH 1
- Solución buffer a pH 4
- Solución buffer a pH 7

b. Metodología para la determinación del efecto del pH de los buffer sobre el color de las antocianinas de Mashua

Se efectuó la determinación de pH con cada buffer preparado (se muestra en la Tabla 5) sobre cada uno de los extractos de antocianinas de Mashua evaluándose el efecto del pH sobre el color de las antocianinas, realizando para ello la dilución de 10 μL de muestra de antocianina en 600 μL de buffer, se adquirió las imágenes respectivas con una cámara de fotos a fin de detectar los cambios de coloración en cada dilución efectuada por triplicado (Figura 18).

Tabla 5
Buffer a diferentes valores de pH

Nro.	Buffers pH	M1	M2	M3
1	2.06	10 μL :600 μL	10 μL :600 μL	10 μL :600 μL
2	4.00	10 μL :600 μL	10 μL :600 μL	10 μL :600 μL
3	5.64	10 μL :600 μL	10 μL :600 μL	10 μL :600 μL
4	6.87	10 μL :600 μL	10 μL :600 μL	10 μL :600 μL
5	7.00	10 μL :600 μL	10 μL :600 μL	10 μL :600 μL

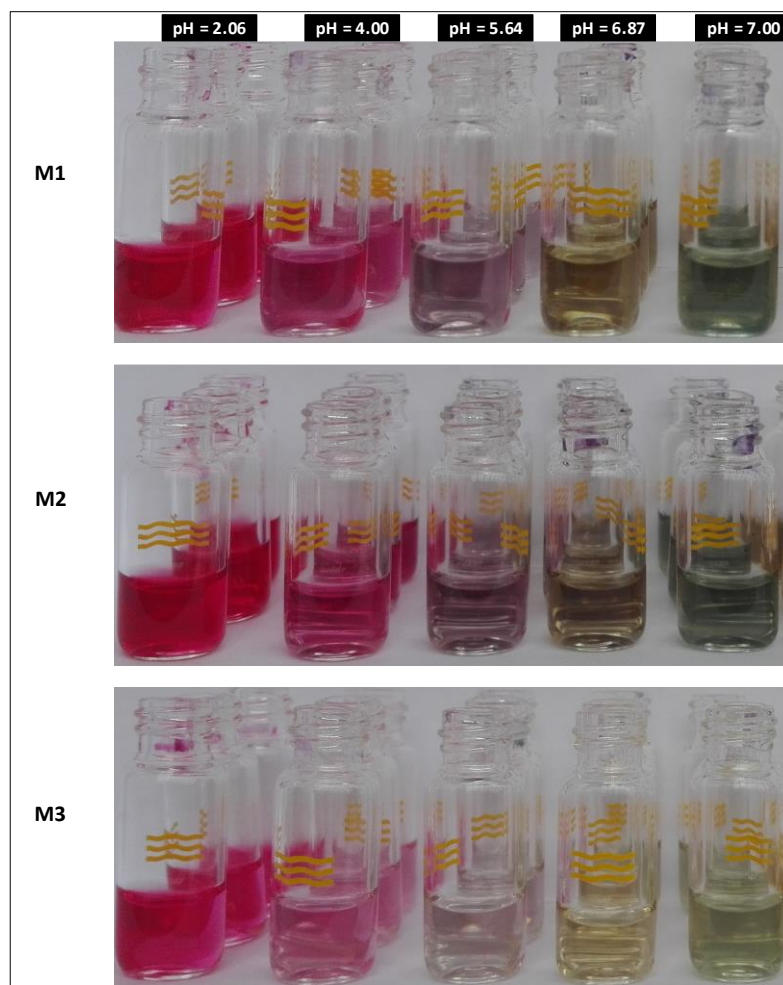


Figura 18. Imágenes de extractos acuosos evaluados a diferente pH.

Se efectuó la discriminación de pH con los buffer preparados (Tabla 6) sobre cada uno de los extractos de antocianinas de Mashua evaluándose el efecto del pH sobre el color de las antocianinas, utilizándose para ello los μ PAD, tomando las imágenes respectivas a fin de detectar los cambios de coloración en cada dilución efectuada, utilizando para ello tres diluciones 10 μ L:100 μ L, 10 μ L:200 μ L 10 μ L:300 μ L, de las cuales se discrimino una de ellas por la intensidad de coloración mostrada, para lo cual se procedió de la siguiente manera:

Adquisición y análisis de imágenes; se siguió el procedimiento recomendado por Abderrahim *et al.* (2016), para ello de las fotografías se selecciona una zona de la imagen adquirida, la cual se pasa a visio profesional, misma que se guarda en formato TIFF, la cuantificación se realizó siguiendo los siguientes pasos: i) en esta imagen adquirida se selecciona un área del 80% y se analiza programa Image J la media de los valores Rojo (R), Verde (G) y Azul (B), haciendo uso del plugin

RGB Measure. Se implementó una macro específica en el lenguaje de macro Image J para el cálculo automático de los valores RGB en cada micro tubo, ii) la relación lineal entre las concentraciones de cianidina-3-glucosido y la intensidad efectiva para R, G y B (absorbancia resuelta RGB) o distancia euclídea se evaluaron mediante análisis de regresión.

Tabla 6

Discriminación de Buffer a diferentes valores de pH

Nro.	Buffer pH	M1	M2	M3
1	2.06	10µL:100µL	10µL:100µL	10µL:100µL
		10µL:200µL	10µL:200µL	10µL:200µL
		10µL:300µL	10µL:300µL	10µL:300µL
7	9.23	10µL:100µL	10µL:100µL	10µL:100µL
		10µL:200µL	10µL:200µL	10µL:200µL
		10µL:300µL	10µL:300µL	10µL:300µL

c. Variables

Variables independientes o de estudio

- Ecotipos de Mashua: M1, M2 y M3
- pH:
 - Grupo 1: 2.06; 4.00; 5.64; 6.87; 7.00
 - Grupo 2: 1; 1.41; 3.92; 4.5; 5.15; 6.77; 7
- Dilución de antocianinas: 10:100; 10:200 y 10:300

Variables dependientes o de respuesta

- Color (por RGB)

d. Determinación del color

Se efectuó mediante análisis de color por RGB, con la ayuda de una cámara fotográfica. La intensidad de cambio de color se emplea como indicador de la sensibilidad de las antocianinas de Mashua como sensor de pH. La que se valoró mediante análisis de imagen usando ImageJ (Jurmanovi y otros 2010 y Abderrahim y otros 2016).

3.4.3 Tercer objetivo: diseño y fabricación de un micro-dispositivo analítico en papel (μ PAD) de pH basado en antocianinas de Mashua (μ PADma)

a. Materiales y equipos de laboratorio

Materiales

- Papel de filtro
- Cinta de montaje adhesivo de doble cara de mayor resistencia de 5m*19mm
- Bisturí

Equipos

- Computador Hp
- Impresora
- Sistema LED para la iluminación

b. Diseño y fabricación del μ PADma

El μ PADma de bajo costo fue fabricado en papel de filtro Wattman como zona hidrofílica y una cinta de doble cara para definir la zona hidrofóbica. El PAD fue diseñado con el software Corel Draw X8 a escala 1:1 luego fue impreso en papel filtro, posteriormente se cortó manualmente con la ayuda de un bisturí, esta fue adherida luego a la cinta de doble cara para proporcionarle estabilidad. El diámetro de las zonas de detección y separación del μ PADma se optimizaron para

reducir el tiempo de análisis y el volumen de muestra y del sensor ecológico la misma que se muestra a continuación:



Figura 19. Micro PAD diseñado escala 1:1

c. Determinación de funcionalidad de los micro-canales mediante el color

Para comprobar si los PAD diseñados son los adecuados, se efectuó pruebas con las muestras preparadas en el Acápite 3.4.2 para lo cual se efectuaron diversas pruebas con la sonda (extracto puro de antocianina) a fin de definir los tiempos y cantidades de muestra (buffer) a utilizar, hasta que tanto la muestra como la sonda se dispersen homogéneamente en los microcanales de los PAD, una vez estandarizado se procede a la evaluación correspondiente de las muestras, efectuando los diversos análisis de color por RGB, siguiendo el procedimiento explicado en el acápite 3.4.2 (Jurmanovi *et al.*, 2010 y Abderrahim *et al.*, 2016).

3.4.4 Cuarto objetivo: Validación del μ PADma como multi-sensor de pH ecológico en diferentes productos alimenticios

a. Materiales y equipos de laboratorio

Materiales

- Vinagre blanco Bells; producido y envasado por Multifoods S.A.C.
- Red Bul Sugar Free. Taurina. Producida por Bodega Farmaceutica S.A.
- Cerveza Estrella Galicia 0.0 Producido Hijos de Rivera S.A.U.
- Indian Tonic Water. Bebida refrescante carbonatada y aromatizada con azúcar y edulcorante, marca Brituic.

- Jugo de fruta, Aquarius, Frugos de manzana. Producido por Coca Cola S.A.
- Electrolight, bebida rehidratante sabor granadilla. Producido por Medifarma S.A.
- Electrolight cero, bebida rehidratante sabor granadilla. Producido por Medifarma S.A.

Equipos

- pH metro
- μ PADma

Reactivos

- Agua destilada
- Buffer pH: 1; 1.41; 3.92; 4.5; 5.15; 6.77; 7

b. Procedimiento utilizado para los ensayos colorímetros

Los ensayos colorimétricos se realizaron considerando el método descrito por Pourreza y Golmohammadi (2015) con algunas modificaciones, los pasos que se siguieron fueron los siguientes:

- i) 2 μ L de volumen de solución de extracto de antocianina se colocaron en el centro de las zonas de prueba hidrofílicas sobre los PAD de papel y se secaron por 2 minutos a temperatura ambiente.
- ii) A continuación se añadieron 6 μ L de volumen de diferentes soluciones de pH (2.7; 4.0; 5.6; 6.8; 7.0) a cada zona de ensayo por duplicado cada una compuesta por tres posillos; luego se dejó secar por 2 minutos.
- iii) Inmediatamente de cada zona se efectuó la captura de imagen con una cámara digital.

Las imágenes obtenidas primero se ordenaron en Visio Professional 2013-TechNet y se analizó con el programa Image J-win32; luego los datos se ingresaron al programa GraphPadPrism 6 para el análisis de color (RGB)

correspondiente a cada fase de estudio; (sigla en inglés de *red*, *green*, *blue*, en español «rojo, verde y azul»), es la composición del color en términos de la intensidad de los colores primarios de la luz. RGB es un modelo de color basado en la síntesis aditiva, con el que es posible representar un color mediante la mezcla por adición de los tres colores de luz primarios. El modelo de color RGB no define por sí mismo lo que significa exactamente rojo, verde o azul, por lo que los mismos valores RGB pueden mostrar colores notablemente diferentes en distintos dispositivos que usen este modelo de color. Aunque utilicen un mismo modelo de color, sus espacios de color pueden variar considerablemente.

c. Validación del μ PADma

Para validar el μ PADma se utilizó la metodología recomendada por Abderrahim, Arribas y Condezo-Hoyos (2016) la cual se basa en el análisis de imágenes (Imagen-F-C) la que trata de la aplicación de un ensayo novedoso de Folin-Ciocalteau de rendimiento elevado, la metodología seguida se describe a continuación:

- i) Se utilizó muestras alimenticias comerciales translucidas cuyas características se detallan en la Tabla 7, mismas que fueron adquiridas en un centro comercial, a las cuales primeramente se les efectuó la lectura del pH con un pHmetro digital por triplicado.
- ii) Inmediatamente se procede a la evaluación en los μ PADma, para ello se toma 2 μ L de volumen de solución de antocianina las que van al centro de las zonas de prueba hidrofílicas sobre los PAD de papel y secados por 2 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 6 μ L de volumen de las diferentes muestras alimenticias descritas en la Tabla 5, cada zona de ensayo por duplicado y cada uno compuesto por tres posillos; luego se dejó secar por 2 minutos. Inmediatamente de cada zona se efectuó la captura de imagen con una cámara digital.
- iii) Las imágenes obtenidas primero se ordenaron en Visio Professional 2013-TechNet y se analizó con el programa Image J-win32; luego los datos se ingresaron al programa GraphPadPrism 6 para el análisis de color (RGB), en los datos obtenidos se analizaron la linealidad y la precisión del ensayo,

- i) así como la distancia euclidiana, mediante el ploteo de Bland-Altman y el análisis de correlación en GraphPad 6.

Tabla 7
Muestras alimenticias utilizadas

Nro.	Producto		Características
1	Vinagre blanco Bells	R	producido y envasado por Multifoods S.A.C.
2	Red Bul Sugar Free. Taurina.	R	Producida por Bodega Farmaceutica S.A.
3	Cerveza Estrella Galicia 0.0	R	Producido Hijos de Rivera S.A.U.
4	Indian Tonic Water. Bebida refrescante carbonatada y aromatizada con azúcar y edulcorante	R	Marca Brituic
5	Jugo de fruta, Aquarius, Frugos de manzana.	R	Producido por Coca Cola S.A.
6	Electrolight, bebida rehidratante sabor granadilla.	R	Producido por Medifarma S.A.
7	Electrolight cero, bebida rehidratante sabor granadilla.	R	Producido por Medifarma S.A.

d. Variable

Variables independientes o de estudio

- Muestras de alimentos: A1, A2, A3, A4, A5, A6, y A7.

Variables dependientes o de respuesta

- Color (por RGB)
- pH (referencia)

e. Determinación del color

Se efectuó mediante análisis de color por RGB, con la ayuda de una cámara fotográfica. La intensidad de cambio de color se emplea como indicador de la sensibilidad de las antocianinas de Mashua como sensor de pH. La que se valoró

mediante análisis de imagen usando ImageJ (Jurmanovi *et al.*, 2010 y Abderrahim *et al.*, 2016).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 De la concentración de antocianinas de Mashua

En la tabla 8, se muestra los resultados en promedio de mg de cianidina-3-glucosido/L en los diferentes ecotipos de muestra M1 (*Santo cristo A*), M2 (*Yana añu*) y M3 (*Santo cristo B*).

Tabla 8
Cianidina-3-glucosido (mg) presentes en tres ecotipos de Mashua

Ecotipo	mg cianidina-3-glucosido
M1 <i>Santo cristo A</i>	796.34
M2 <i>Yana añu</i>	811.63
M3 <i>Santo cristo B</i>	810.76

De lo visualizado en promedio se obtuvo 806.04 mg de cianidina-3-glucosido, de las cuales en comparación con lo encontrado por Campos *et al.*, (2006) citado por Cuya (2009), las evaluadas en el presente trabajo de investigación son superiores a las antocianinas totales del genotipo de la Mashua pigmentadas quien encontró rangos de 0,5 a 2,05 mg g⁻¹ la mayor cantidad de antocianinas totales se encontró en el genotipo DP-02-24. Asimismo, los valores hallados difieren de tres genotipos puros de Mashua estudiados por Chirinos *et al.* (2006) que encontró entre 45.5 a 131.9 mg de equivalentes de 3-glucósido de cianidina/ 100 g de peso fresco. De lo encontrado se deduce que el ecotipo yana añu es la que mayores concentraciones de antocianinas presenta, sin embargo cabe resaltar que los resultados no difieren en demasía, ello debido a que los tres ecotipos utilizados tienen la tendencia de la coloración oscura, concordando a lo

encontrado por Chirinos *et al.*, (2007), mencionan que las variedades de Mashua de color púrpura alcanza la mayor capacidad antioxidante durante el desarrollo del tubérculo obtuvieron entre 271- 446 μ mol Trolox equiv g^{-1} y la cinética de acumulación o la desaparición de los compuestos bioactivos durante la maduración depende tanto de los cultivares, mientras que para las antocianinas, hubo un marcado aumento durante la maduración en todos los cultivares de color púrpura. En general, la correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos bioactivos variaron considerablemente entre los cultivares; encontraron rangos de 14.4-18.7 mg equivalentes de ácido gálico Mashua/g de materia seca (MS) y 221-359 μ mol de Mashua equivalentes Trolox/g MS. Sin embargo se podría deducir que la M2 en la presente investigación es la muestra con mayor contenido de antocianinas.

Tabla 9
ANOVA para mg cianidina-3-glucosido por Mashua

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	442.477	2	221.239	2212387	0
Intra grupos	0.0006	6	0.0001		
Total (Corr.)	442.478	8			

De la Tabla 9, se deduce que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de mg cianidina-3-glucosido entre los ecotipos de Mashua, con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar las diferencias existentes entre las medias, se efectuó las Pruebas de Múltiples Rangos.

Tabla 10
Pruebas de Múltiples Rangos para mg cianidina-3-glucosido por Mashua

Contraste	Diferencia	+/- Límites	Sig.
1 – 2	-15.29	0.019979	*
1 – 3	-14.42	0.019979	*
2 – 3	0.87	0.019979	*

* indica una diferencia significativa.

En la Tabla, se aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que entre estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

4.2 Efecto de los diversos patrones de pH sobre el color de las antocianinas

Se evaluó el efecto de los buffers a diferentes pH sobre el color de las antocianinas, utilizando para ello la dilución de 10 μ L de muestra de antocianina (sonda) en 600 μ L de buffer (muestra), cuyas imágenes se muestran en la figura 20, detectándose los cambios de coloración en cada dilución mismas que se efectuaron por triplicado, cuyos valores de RGB se muestran en el anexo 1 así como las gráficas respectivas y las comparaciones entre las sondas se visualizan en las figuras 21.

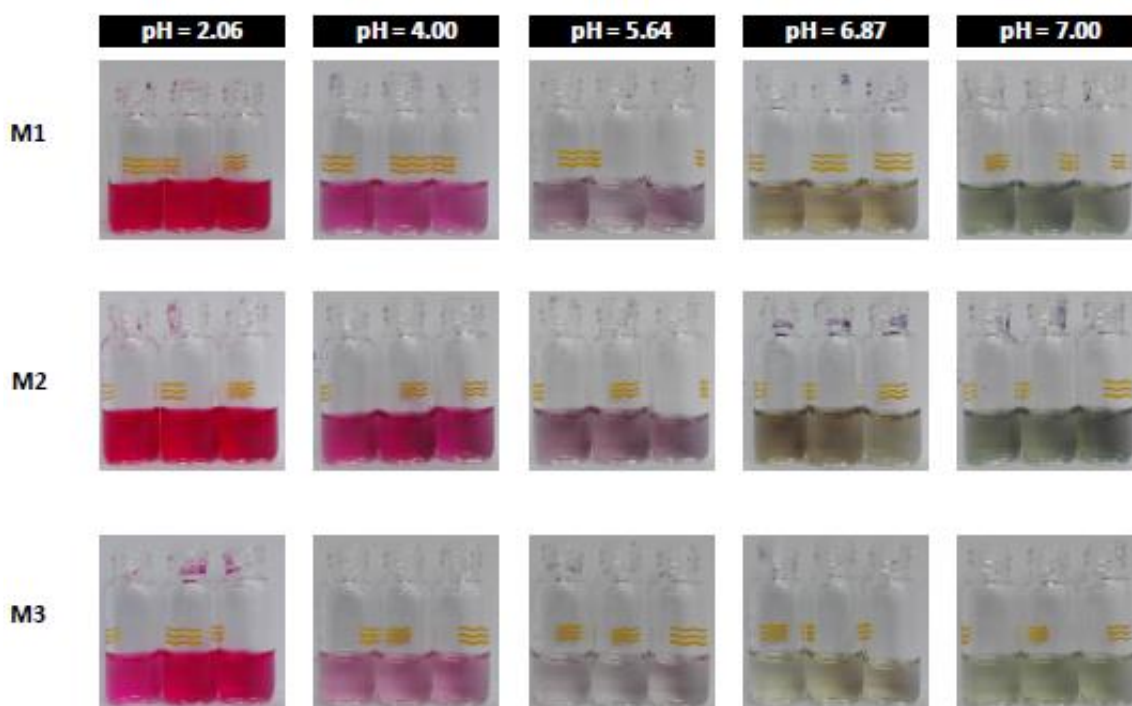


Figura 20. Influencia de pH sobre las antocianinas de Mashua

Los extractos de los tres ecotipos muestran similar comportamiento al ser sometidos a diferentes pH (Figura 20) por lo que no habría diferencia en cuanto al comportamiento de la antocianina cual sea el ecotipo que se utilice; la variación de los colores a diferentes pH son considerados como patrones para mediciones con el uso de antocianinas como sondas, variaciones que se deben al efecto del pH sobre la estabilidad y el color visual de

los extractos acuosos de antocianinas de Mashua; misma que según Reyes y Cisneros-Zevallos (2007) encontró en su estudio que los colores brillantes y atractivos que se mostraron inicialmente variaron al igual que en la presente investigación, solo los extractos a pH bajo (de 1 a 3) mostraron retención de color durante el período de almacenamiento mientras los observados en la región alcalina se decoloraron (Figura 21).

El color y la estabilidad de las soluciones acuosas de antocianinas dependen de los cambios en el equilibrio de sus 4 especies debido al pH y a las reacciones de protonación o hidratación durante el almacenamiento. A pH bajo son más estables, debido a que en los extractos de antocianinas están presentes en su forma como el catión flavilio (Jackman *et al.*, 1987). Esta forma de color rojo brillante luego se transforma en bases quinonoidales azules o pseudobases de carbinol incoloras, y en amarillo a partir de la especie de chalcone (Brouillard, 1982). Además del efecto del pH, también se sabe que la temperatura y la luz influyen en la estabilidad de este antioxidante (Francis, 1989; Wrolstad, 2000) y las modificaciones estructurales con grupos hidroxilo, metoxilo, glicosilo y especialmente acilo (Mazza y Brouillard, 1987) influyen en su estabilidad, lo que explicaría el cambio de las coloraciones cuando las sondas son sometidas a diferentes buffers.

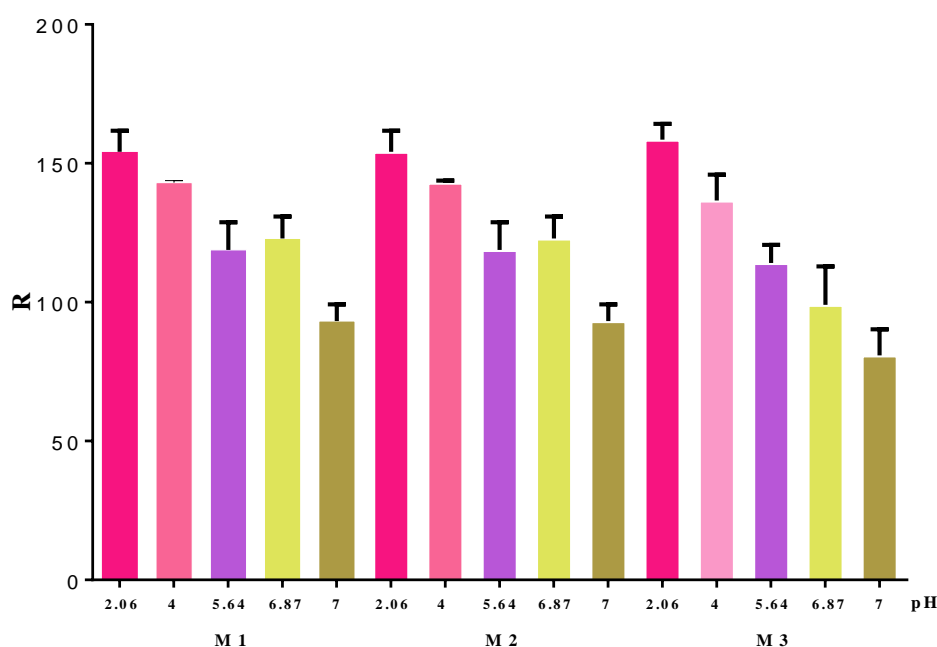


Figura 21. Influencia de pH sobre las antocianinas de diferentes ecotipos de Mashua. En la Figura 22, se muestra el resultado de los μ PADma a pH extremos, efectuándose la discriminación de los extractos de Mashua respecto a los buffers, de las imágenes se

detectan los cambios de coloración en cada dilución efectuada, utilizando para ello tres diluciones 10 μ L:100 μ L, 10 μ L:200 μ L 10 μ L:300 μ L, de las cuales se discriminó una de ellas por la intensidad de coloración, por lo que la sonda M2 es la más adecuada o la más recomendada para ser utilizada como un buen indicador, por presentar mayor estabilidad en la coloración, misma que se puede observar que a pH ácidos las sondas se muestran más estables; las que se pueden corroborar en el anexo 2.

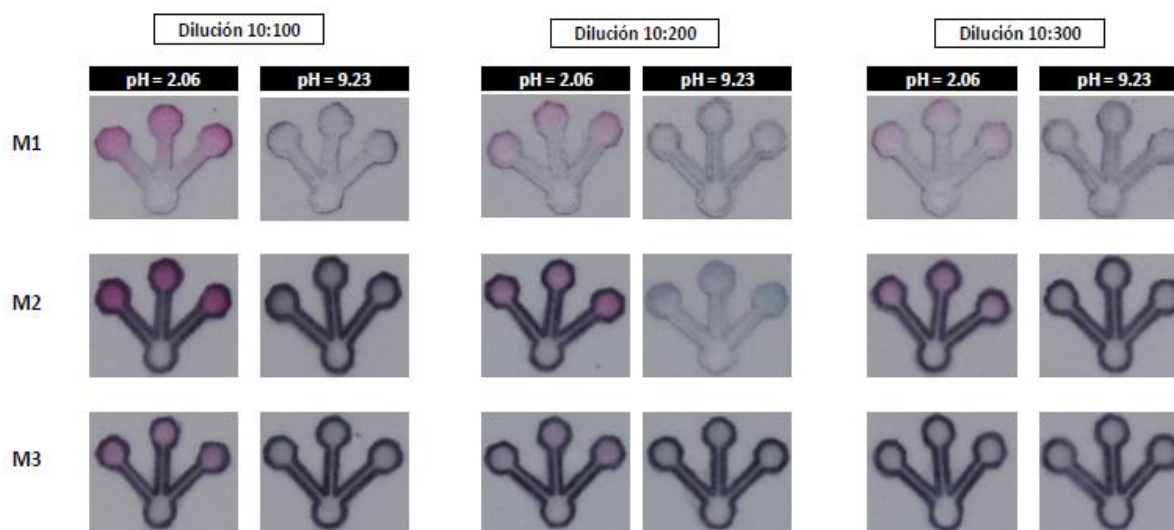


Figura 22. Comparación de μ PADma

4.3 Diseño y fabricación del micro-dispositivo analítico en papel (μ PAD) de pH basado en antocianinas de Mashua (μ PADma)

En la Figura 23, se muestra las dimensiones del micro-dispositivo analítico diseñado para su impresión en papel de filtro Wattman como zona hidrofílica y una cinta de doble cara para definir la hidrofóbica, tomando en consideración el diámetro de las zonas de detección y separación, a fin de optimizar el tiempo de análisis y volumen de muestra.

Los sensores ópticos para determinar el pH son obtenidos por inmovilización de los indicadores de pH en una base sólida (Moreno *et al.*, 1990, Safavi y Bagheri, 2003 y Sotomayor *et al.*, 2001) misma que en la presente investigación haría la cinta de doble cara; y la sonda (antocianinas de Mashua) como sensor óptico de pH es a la fecha estudiado en frutos como la uva estudiado por Abolghasemi, Sobhi y Piryaei (2016) quienes desarrollaron un sensor óptico de pH ecológico, utilizando antocianinas de uva *Siahe Sardasht*, en un acoplamiento optimizado, dicho sensor responde a los cambios de pH en un rango de 1 a 10 con un tiempo de respuesta de 3 min y cuyas replicas mejoraron

en 0.3%. El μ PADma propuesto responde a rangos de pH de 1 a 7 con tres micromódulos cuya sonda que se requiere es de 2 μ L.

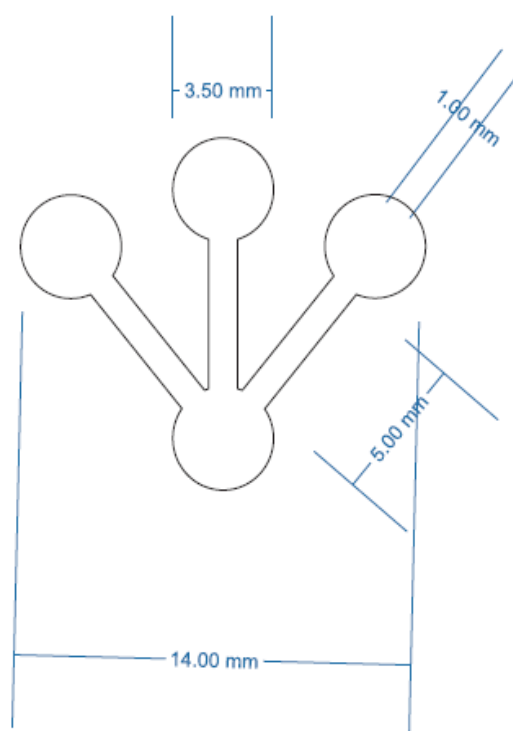


Figura 23. Dimensiones del microdispositivo en papel

El presente trabajo de investigación con lo mencionado por Dou *et al.*, (2015), concuerda en muchos aspectos, pues existen diferentes tipos de papel que son adecuados para la fabricación de plataformas microfluidicas de papel, la selección del tipo apropiado se basa en las tecnologías de fabricación y en el campo de las aplicaciones, el papel de celulosa es el más empleado ampliamente, la que se utilizó en esta investigación fue el papel filtro Whatman No. 1 (tamaño de poro 11 μ m) la que goza de porosidad bien categorizada, caudal y retención de partículas su posterior impresión con tinta y para el corte por lo general se utilizan tijeras o equipos de corte controlados por ordenadores y la cinta es necesaria como apoyo a fin de que esta sea una estructura firme.

La dispersión de la muestra y la sonda a través de los microcanales se pueden verificar durante la validación de los μ PADma, la técnica utilizada en este trabajo fue similar a la usada por Khan *et al.* (2010), pues la impresión a tinta puede inferir en la Adsorción de las partículas de las muestras misma que influirían en la dispersión de los colores. Un cambio en el color también se puede obtener por un cambio de pH en una solución,

misma que se investigó en este estudio en la validación; Apilux *et al.* (2010) efectuaron diversos estudios en la detección de Fe (III) en solución de desecho industrial usando μ PAD, en cuyo estudio el ácido ascórbico y la 10-fenantrolina las que reaccionaron con Fe (III), misma que se redujo a Fe (II) de igual manera en el presente estudio la cianidina-3-glucosido reacciona con diferentes muestras alimenticias, cambiando de coloración a diferentes pH.

4.4 Validar el μ PADma como multi sensor de pH ecológico en diferentes productos alimenticios

En los Anexos 3 y 4 se encuentran los resultados obtenidos para la validación de los μ PADma, la técnica utilizada denominada Image-F-C, fue la base para esta etapa del estudio, misma que cada PAD simula a tres pocillos, a las cuales se le provee de la sonda y una vez estabilizada esta interactúa primeramente las muestras que vendrían a ser los buffers, tal y como se muestra en la figura 24, imágenes que trabajo en formato TIFF, para luego seleccionar y analizar la imagen. La cuantificación se realizó en un área circular (diámetro = 0.15 ; 171 pixeles).

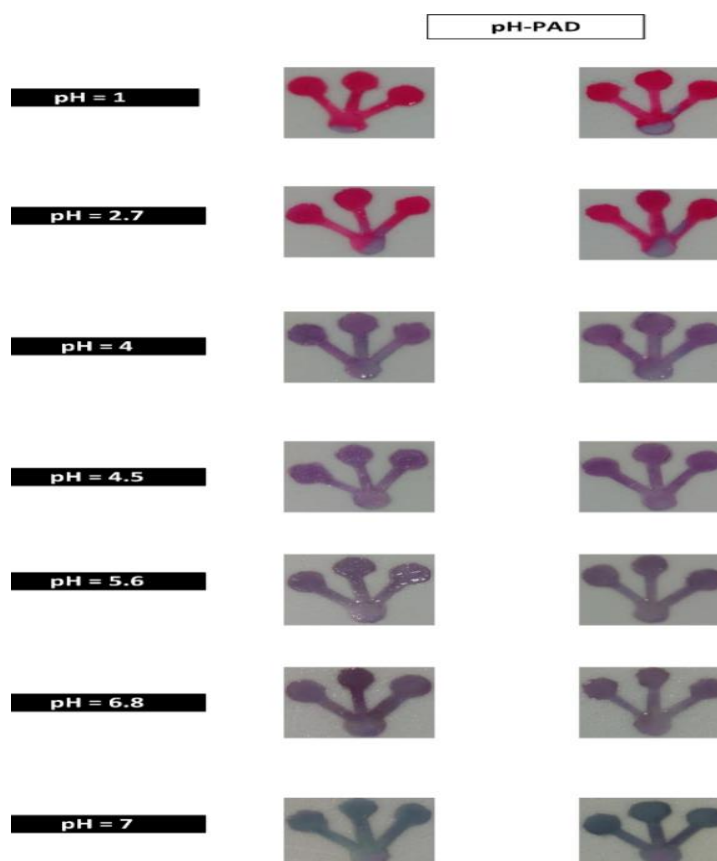


Figura 24. Reacción del micro-dispositivo a diferentes pH.

Para la validación del micro-dispositivo analítico en papel de pH basado en antocianinas de Mashua (μ PADma), se utilizó diferentes productos (7 muestras alimenticias) los cuales se detallan en la tabla 7, el resumen de los valores encontrados para el análisis de los parámetros de color RGB para el μ PADma en diferentes alimentos (Tabla 11), utilizando como método de referencia los valores que se medidos en un potenciómetro digital (Tabla 12).

Tabla 11
Valores del análisis de color RGB para μ PADma en diferentes alimentos

	R		G		B	
	MEDIA	DS	MEDIA	DS	MEDIA	DS
A1	135,17	3,55	30,29	7,53	84,17	6,71
A2	132,49	4,40	57,73	6,33	102,54	4,72
A3	94,55	1,90	79,44	1,95	107,76	2,16
A4	126,43	1,99	63,33	7,44	106,78	4,83
A5	117,63	2,36	66,65	6,99	106,29	4,42
A6	118,14	5,74	66,47	4,61	107,45	2,93
A7	112,01	3,30	74,70	4,92	109,19	3,19

Tabla 12

Valores del pH encontradas con el pH metro instrumental en los diferentes alimentos.

Alimentos	Media pH
A1	2.37
A2	3.10
A3	4.18
A4	2.51
A5	3.03
A6	3.04
A7	3.30

En las figuras 25, 26, 27, 28 y 29 se observa los resultados de los parámetros R, G, B, DE-RGB y DE-RG optimizados de la sonda a diferentes buffers, a partir de Image obtenida y escaneada, la cual está relacionada linealmente con la concentración de cianidina-3-glucosido (estándar) con la finalidad de garantizar la precisión de la evaluación de la capacidad de reducción en muestras reales; se calculó cinco parámetros digitales basados en imágenes R, G, B, DE-RGB y DE-RG mediante un macro Image J, cuyos puntos promedios analizados se encuentran dentro de la pendiente de la curva estándar, misma que se puede contrastar con la tabla 24 del anexo 3; las que coinciden con los estudios efectuados por Abderrahim *et al.* (2016) en diferentes productos alimenticios, quienes encontraron que los estudios realizados muestran una relación lineal con la concentración de ácido gálico, similarmente en este estudio se muestra resultados con un r superiores a 0.80 los cuales se muestran en los anexos 5, 6, 7, 8 y 9 encontrándose valores de 0.91; 0.89; 0.61; 0.92 y 0.90 para los parámetros estudiados R, G, B, DE-RGB y DE-RG respectivamente, y que la cianidina-3-glucosido presenta un comportamiento similar al ácido gálico y sería un buen indicador, se podría deducir que se encontró una relación lineal mejor o más elevada entre RGB; R, RG y la concentración de cianidina-3-glucosido.

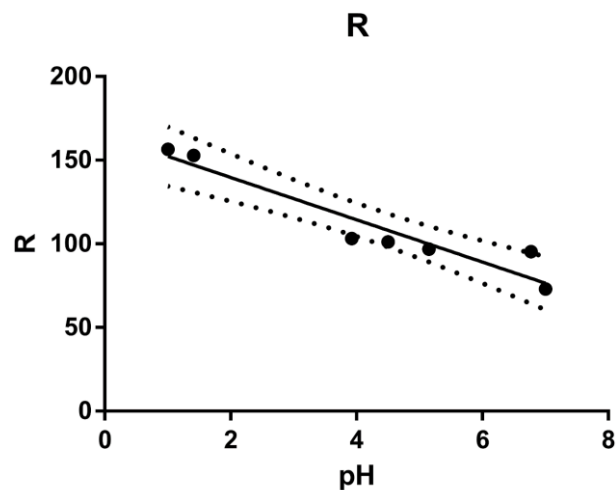


Figura 25. Influencia del pH sobre el valor R

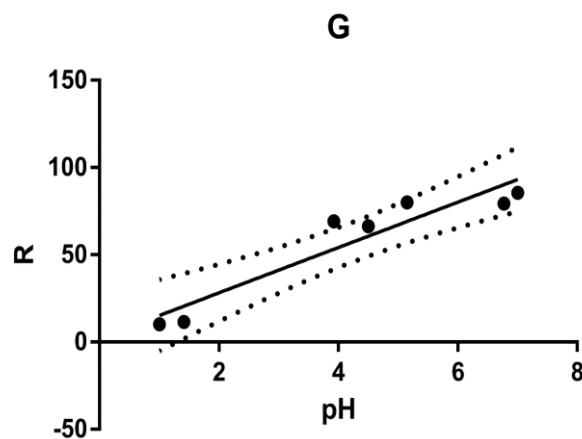


Figura 26. Influencia del pH sobre el valor G

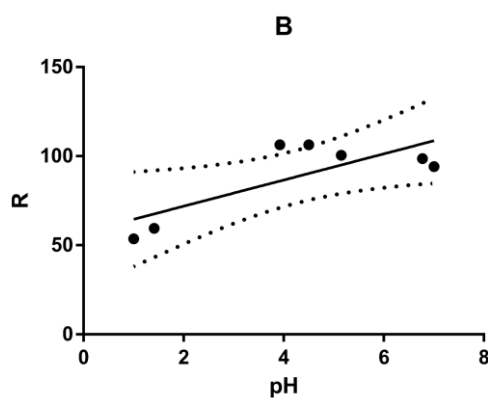


Figura 27. Influencia del pH sobre el valor B

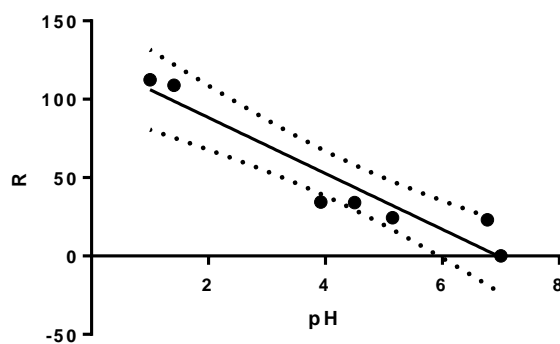


Figura 28. Influencia del pH sobre el valor DE-RGB

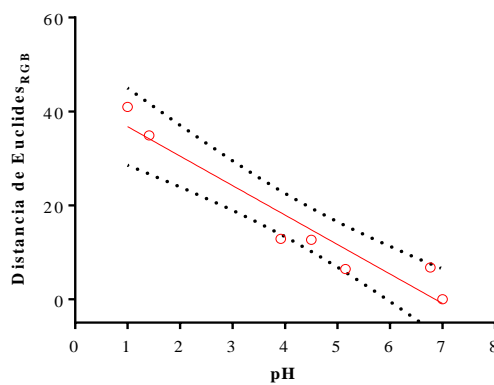


Figura 29. Influencia del pH sobre el valor DE-RGB

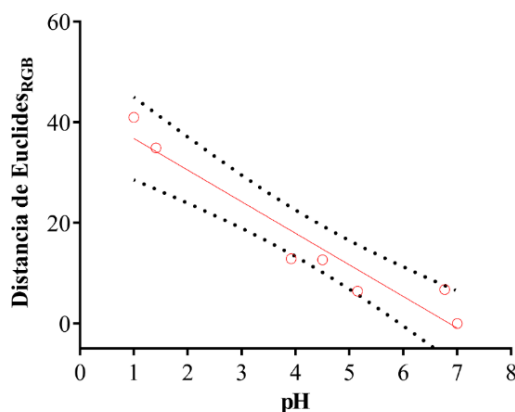


Figura 30. Relación de pH y la distancia de Euclides

Asimismo, se efectuó el estudio de la distancia euclidiana (Figura 30), parámetro que integra los valores R, G y B en un parámetro único, el cual muestra un valor de $r = 0.9221$, existiendo una relación lineal alta con la concentración de cianidina-3-glucosido, el análisis de regresión se realizó para ajustar los datos experimentales y el cálculo del coeficiente de determinación (r) basados en el estudio efectuado por Abderrahim et al. (2016), con ácido gálico, sin embargo en el presente estudio, se trabajó con cianidina-3-glucosido, llegándose a la conclusión de que ambas bases de antocianinas presentan similar comportamiento, por lo que el extracto de Mashua puede ser utilizado.

Además, es necesario señalar que la distancia euclidiana fue utilizada con éxito en la presente investigación, a fin de encontrar la coincidencia más cercana a la imagen dada para la cuantificación de ácido gálico realizada por Abderrahim et al. (2016) y tetraciclina en la leche por el colorímetro de imagen digital realizada por Magalhaes (2006).

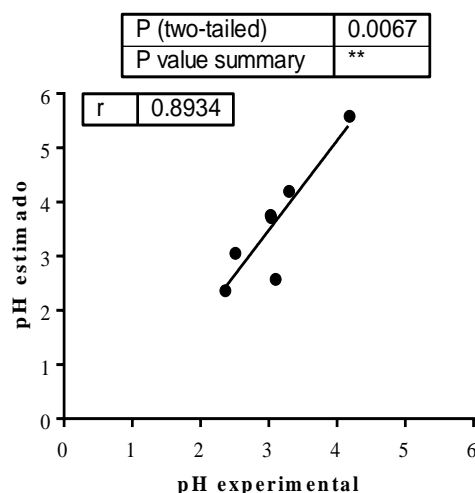


Figura 31. Análisis de correlación entre el pH estimado y el pH experimental.

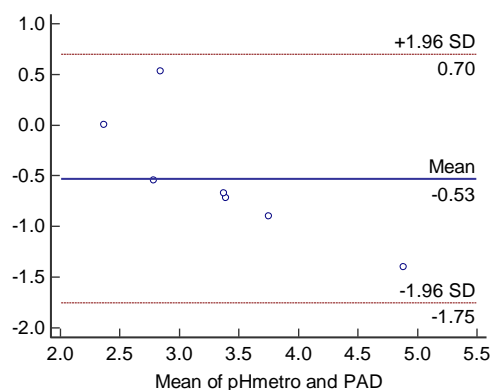


Figura 32. Análisis de Bland-Altman del pH

En la Figura 31 se muestra el análisis de correlación encontrado entre el pH estimado y el pH experimental, la cual muestra un $R^2=0.8934$ comparados con estudios efectuados en creatinina ($R^2=0.935$) efectuado por Medeiros De Morais (2014) existe una diferencia de 0.40 la cual puede deberse a que el volumen, la orientación del escaneo, el modelo de escáner utilizado influyen en el ensayo haciéndola más sensible, sin embargo se puede afirmar que los valores experimentales y los estimados guardan relación y que el R^2 encontrado es elevado y superior a 0.80 lo que significa que la metodología utilizada es válida para la medición de pH en productos con pH por debajo de 7.00 misma concuerda con la figura 32 Análisis de correlación por Bland-Altman entre el pH estimado y el pH experimental, la cual muestra un $R=0.8934$ comparados con estudios efectuados en creatinina ($R=0.935$) efectuado por Medeiros De Morais (2014) existe una diferencia de

0.40 la cual puede deberse a que el volumen, la orientación del escaneo, el modelo de escáner utilizado influyen en la sensibilidad del ensayo.

CONCLUSIONES

- Los valores de antocianinas encontradas en los ecotipos de Mashua presentan un promedio de 806.24 mg de cianidina-3-glucosido/L, siendo el ecotipo *Yana añu* con el mayor valor 811.63 mg mg de cianidina-3-glucosido/L, cuanto más oscuro es un ecotipo la cantidad de mg de cianidina-3-glucosido se incrementa.
- Al evaluar el efecto de las diversas muestras de pH sobre la cianidina-3-glucosido de la Mashua, el ecotipo *Yana añu*, presenta mayor estabilidad a los patrones de color, asimismo la cianidina-3-glucosido reacciona con las muestras establecidas a diferentes pH.
- El μ PADma diseñado con el software Corel Draw X8, impreso en papel filtro Wattman No. 1 y adherida a una cinta de doble, puede ser utilizada como un micro-dispositivo y como sensor de pH a la cianidina-3-glucosido extraída de la Mashua.
- El procesamiento, análisis y evaluación de imágenes, resulta útil, pues con el uso de los parámetros RGB es posible calcular el pH de diferentes alimentos que presenten pH experimentales menores a 7, haciendo uso del μ PADma ecológico, la que debe de ser implementada a fin de efectuar evaluaciones de pH en tiempo real utilizando como sonda a la cianidina-3-glucosido de Mashua.

RECOMENDACIONES

- Realizar estudios relacionados con química cuidando la contaminación ambiental, a fin de desarrollar sensores que puedan detectar diferentes compuestos, amigables con el medio ambiente.
- Proveer al mercado químico-sensores y biosensores a base de papel con rendimientos y rentabilidad elevada, así como sencillos y de bajo costo.
- Desarrollar métodos de detección con sensores de papel de bajo costo, para la detección de diferentes enfermedades para un tratamiento oportuno y adecuado.
- Estudiar la aplicación de diferentes compuestos bioactivos en temas relacionados al cuidado de la salud haciendo uso de la diversidad de tubérculos andinos y frutos tropicales existentes en nuestra Región.

BIBLIOGRAFÍA

- Abderrahim, M.; Arribas, M., S. y Condezo-Hoyos, L. (2016). *A novel high-throughput image based rapid Folin-Ciocalteu assay for assessment of reducing capacity in foods*. *Talanta* 152: 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.01.051>.
- Abolghasemi, M. M., Sobhi, M., & Piryaeei, M. (2016). *Preparation of a novel green optical pH sensor based on immobilization of red grape extract on bioorganic agarose membrane*. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 224, 391–395. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.10.038>
- Aguilera, O., M.; Reza V. M.C.; Chew M., R.G; Meza V., J.A. (2011). *Propiedades funcionales de las antocianinas*. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, XIII: 16-22.
- Alcalde-Eon, C.; García-Estévez, I.; Rivas-Gonzalo, J.; Rodríguez de la Cruz, D.; y Escribano-Bailón, M. T. (2004). *Liquid chromatography-mass spectrometry identification of anthocyanins of isla oca (Oxalis tuberosa, Mol.) tubers*. *Journal of Chromatography A*. 1054: 211-215. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.074>.
- Andersson L. & Andersson, S. (2000). *In Taxon*. *Opera Bot.* 49(4): 721-736.
- André, C.; Castanheira, I.; Cruz, J. M.; Paseiro, P., & Sanches-Silva (2010). *Estrategias Analíticas Para Evaluar Los Antioxidantes En Los Alimentos: Una Revisión. Las Tendencias*. En *Ciencia Y Tecnología De Los Alimentos*, 21 (5), 229-246. <Http://Doi.Org/10.1016/J.Tifs.2009.12.003>
- Akyazi, T., Basabe-Desmots, L., & Benito-Lopez, F. (2018). *Review on microfluidic paper-based analytical devices towards commercialisation*. *Analytica Chimica Acta*, 1001, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.11.010>
- Arbizu, C.; M. Tapia. 1992. *Tubérculos andinos*. En: J. Hernández y J. León. (eds.). *Cultivos marginados: otra perspectiva de 1492*. FAO – Producción y protección vegetal. No 26. 1992. p. 147-161.
- Avello, M.; Suwalsky M. (2006). *Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección*. *Atenea*. 4(1):161-172.

- Barrera, V., Brito, B., Caicedo, C., Córdova, J., Espín, S., Espinoza, P., Villacrés, E. (2003). *Caracterización físico-química, nutricional y funcional de raíces y tubérculos andinos. Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993 - 2003)* (Vol. 4). Lima, Perú: INIAP - CIP. Retrieved from [http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Raíces y Tubérculos Alternativas para el uso sostenible en Ecuador.pdf](http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Raíces_y_Tubérculos_Alternativas_para_el_uso_sostenible_en_Ecuador.pdf)
- Bridgers, E. N.; Chinn, M.S.; Truong, V.D. (2010). *Extraction of anthocyanins from industrial purple-fleshed sweetpotatoes and enzymatic hydrolysis of residues for fermentable sugars*. Industrial, en: *Crops and Products*, 32 (3): 613–620.
- Campos, D., Noratto, G., Chirinos, R., Arbizu, C., Roca, W., & Cisneros- Zevallos, L. (2006). *Antioxidant capacity and secondary metabolites in four species of andean tuber crops: Native potato (Solanum sp.), mashua (Tropaeolum tuberosum Ruiz&Pavon), oca (Oxalis tuberosa Molina) and olluco (Ullucus tuberosum)*. Journal of the Science of Food and and Agricultural, 86, 1481–1488.
- Cárdenas, M. 1989. *Manual de plantas económicas de Bolivia*. 2a Edición. Editorial Los Amigos del Libro, La Paz, Bolivia.
- Castañeda, A., M.; Pacheco, M.; Páez, J. Rodríguez y C. Galán (2009). *Chemical studies of anthocyanins: A review*. Journal Food Chemistry 113: 859–871.
- Cavar, S.; Kova Ć.; F., & Maksimovi Ć. M. (2012). *Evaluación De La Actividad Antioxidante De Una Serie De 4-Methylcoumarins Utilizando Diferentes Métodos De Análisis*. Química De Los Alimentos, 133 (3) 930 937. <Http://Doi.Org/10.1016/J.Foodchem.2012.02.006>
- Chen, X., & Gu, Z. (2013). *Absorption-type optical pH sensitive film based on immobilized purple cabbage pigment*. Sensors and Actuators, B: Chemical, 178, 207–211. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.12.094>
- Chirinos, R., Campos, D., Betalleluz, I., Giusti, M. M., Schwartz, J. S., Tian, Q.; Larondelle, Y. (2006). *High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection (HPLC – DAD)/ HPLC – Mass Spectrometry (MS) Profiling of Anthocyanins from Andean Mashua Tubers (z and Pavó n) and Their (Tropaeolum tuberosum Rui Contribution to the Overall*. J.Agric.FoodChem, 54, 7089–7097. <https://doi.org/10.1021/jf0614140> CCC:
- Chirinos, R., Campos, D., Costa, N., Arbizu, C., Pedreschi, R., & Larondelle, Y. (2008). *Phenolic profiles of andean mashua (Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavón) tubers: Identification by HPLC-DAD and evaluation of their antioxidant activity*. Food Chemistry, 106(3), 1285–1298. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.024>
- Contreras J, Calderon L, Guerra E. y García B. 2010. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. Food Res Int doi:10.1016/j.foodres.2010.11.00.

- Cronquist, A. 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia Univ. Press, N.Y. and 1988. The evolution and classification of flowering plants, ed. 2. New York Botanical Garden, N.Y
- De Pascual-Teresa S. C.; Santos-Buelga, J. C.; Rivas-Gonzalo (2002) *LC-MS analysis of anthocyanins from purple corn cob*. J. Sci. Food Agric. 82:1003-1006.
- De Pascual-Teresa S. y Sánchez-Ballesta, M.T. (2008) *Anthocyanins: from plant to health*. Phytochem. Rev. 7:281-299.
- Durst, R. y Wrolstad, R.E., (2001). *Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC*. In: Handbook of Food Analytical Chemistry. New Jersey: John Wiley & Sons; p. 33-45.
- Garzón G. A. (2008). *Anthocyanins as Natural Colorants and Bioactive Compounds*. A Review. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia.
- Gómez, P. (1998). *Efectos de la nutrición mineral sobre el crecimiento y rendimiento de la mashua (Tropaeolum tuberosum Ruiz y Pavón)*. Tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo. UNALM. Lima, Perú.
- Grau, A., Ortega, R., Nieto, C., & Hermann, M. (2003). *Mashua Tropaeolum tuberosum Ruiz and Pav. Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops*. 25. Retrieved from <http://books.google.com.pe/books?id=ASLFjZxwIJC&pg=PA45&lpg=PA45&dq=Mashua+Tropaeolum+tuberosum+Ruiz+and+Pav.+Promoting+the+Conservation+and+Use+of+Underutilized+and+Neglected+Crops+25&source=bl&ots=Sh5RLghmRP&sig=AqXm0FnWlaWpqDOEcB4uNhubzbo&hl=en&sa=X>
- Hawkes, J.G. (1989). *The domestication of roots and tubers in the American tropics*. in Foraging and farming (D.R. Harris and B.C. Hillman, eds). Unwin Hyman, London, UK. 481–503
- Hermann, M. y, & Heller, J. (1997). *Andean roots and tubers: Ahipa, arracacha, maca and yacon*. *Andean roots and tubers: ahipa, arracacha, maca and yacon*. Retrieved from <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=j7pgT1lDogC&oi=fnd&pg=PA16&dq=Andean+roots+and+tubers+:+Ahipa+,+arracacha+,+maca+and+yacon&ots=RbCMhpKUsR&sig=K52MAkvzOHYQR81YnnGKyvQvi-M>
- Huaccho H., C. V. (2016). *Capacidad antioxidante, compuestos fenólicos, caretenoides y antocianinas de 84 cultivares de mashua (Tropaeolum tuberosum Ruiz y Pavón)*. UNALM. Lima. Perú.
- Hygreeva, D.; Pandey, M. C., & Radhakrishna, K. (2014). *Posibles aplicaciones de base vegetal Los derivados como sustitutos de grasa, antioxidantes y antimicrobianos en carne fresca y procesada Los productos*. Ciencia de la carne. 98 (1), 47-57. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.04.006>.

- Ignat, I., Volf, I. y Popa, V.I. (2011). *Una revisión crítica de los métodos para Caracterización de los compuestos polifenólicos en frutas y verduras*. Los alimentos Química, 26, 1821-1835.
- Integrated Taxonomic Information System - ITIS (2018). *Clasificación taxonómica de la mashua*.
http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=506375
- Jin M., K.; Lian S. Ch. (2003). *Analysis and biological activities of anthocyanins*. J Phytochemistry 64, 923- 933, Pergamon.
- Jin, P.; Wang, S. Y.; Wang, C. Y.; Zheng, Y. (2011). *Effect of cultural system and storage temperature on antioxidant capacity and phenolic compounds in strawberries*, En: Food Chemistry, 124: 262–270.
- Kalt, W.; McDonald, J.E.; Donner, H. (2000). *Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity of processed lowbush blueberry products*, En: Food Chemistry and Toxicology, 65(3): 390-393.
- Kong J. M, Chia L. S.; Goh, N. K.; Chia, T.F.; Brouillard, R. (2003) *Analysis and biological activities of anthocyanins*. Phytochemistry 64:923-933.
- Krauss y Soberanis, (2001). *Control de pudriciones de poscosecha de extracto de mashua (Tropaeolum tuberosum), informes de investigación*. Universidad Nacional Agraria de la Selva. www.informesdeinvestigacion-RMIP57htm.
- Longo, L. y G. Vasapollo, (2006). *Extraction and identification of anthocyanins from Smilax aspera L. berries*. Food Chemistry 94: 226–231.
- López-Alarcón, C.; Denicola, A. (2013). *Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays*, En: Analytica Chimica Acta, 763(6): 1–10.
- Ma, Q., & Wang, L. (2016). *Preparation of a visual pH-sensing film based on tara gum incorporating cellulose and extracts from grape skins*. Sensors and Actuators, B: Chemical, 235, 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.05.107>
- Mann J. (1994). *Natural Products. Their Chemistry and Biological Significance*. Longman Scientific & Technical, Pp 361-388.
- Martinez-Valverde I., Periago M., Ros, G. (2007). *Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta*. Arch. Latin. Nutric. 50:5-18.
- Muñoz O. (2007). *Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos en mieles chilenas e índice antioxidante*. Quim. Nova. 30(4): 848-851.
- Martinez, A. W., Phillips, S. T., Butte, M. J., & Whitesides, G. M. (2007). *Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays*. Angewandte Chemie - International Edition, 46(8), 1318–1320.
<https://doi.org/10.1002/anie.200603817>

- Marzouk, Mohamed S.A., Moharram, Fatma A., Mohamed, Mona, A. M., Amira Gamal-Eldeen Aboutabl Elsayed, A., (2006). *Anticancerígeno y antioxidante de los taninos de Pimenta dioica hojas*. Z. Naturforsch. 62 (7-8), 526-536.
- Mesa A. (2010). *Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales en algunas especies del género Calophyllum*. Rev. Cub. Plant. Med. 15(2):13-26.
- Morillas J, Delgado J. (2012). *Análisis nutricional de alimentos vegetales con diferentes orígenes: Evaluación de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales*. Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria. 32(2):8-20.
- Murillo E., Lombo O., Tique M., Mendez J. (2007). *Potencial antioxidante de Bauhinia Kalbreyeri Harms*. Inf.tecnol. 18(6):65-74.
- National Research Council. (1989). *Lost Crops of the Incas. Little known plants of the andes with promise for worldwide cultivation*. National Academy Press. Washington D.C. U.S.A.
- Olaya, C., M. Castaño y G. Garzón, (2009). *Stability of anthocyanins from Rubus glaucus Benth and Solanum betaceum Cav. dark-red strain as affected by temperature, storage time and water activity*. Acta Biológica Colombiana 14 (3): 141-156.
- Ortega, O. R.; Kliebenstein, D. J.; Arbizu, C.; Ortega, R.; y Quiros, C. F. (2006). *Glucosinolate survey of cultivated and feral mashua (Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavón) in the Cuzco Region of Peru*. Economic Botany. 60: 254-264. <http://www.jstor.org/stable/4257115>.
- Pearsall, D. (1992). *The origins of plant cultivation in South America*. In The origins of agriculture. An international perspective (C.Wesley and P.J. Watson (eds.), Smithsonian Institution, Washington D.C., USA. 173–205
- Peña-Neira, A. (2006). *En la calidad de uvas y vino los taninos y su importancia*. <http://www.gie.uchile.cl/publicaciones/index.html>. (Consultado: Septiembre de 2009).
- Perón, J. M. R.; López, J. R. M.; López, Y. T. (2001). *Radicales Libres en la Biomedicina y Estrés Oxidativo*. Revista Cubana de Medicina Militar, v. 30, n. 1, p. 15 -20.
- Puertas M., Gomez L., Saenz J. (2009). *Capacidad antioxidante in vitro de fracciones de hojas de Piper peltatum L*. Rev Cubana Plant Med. 14(2):1-5
- Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., Y Kumar, M. N. V. R. (2006). *Papel De Los Antioxidantes En La Profilaxis Y Terapia: Una Perspectiva De Productos Farmacéuticos*. Oficial De Controlado Liberar 113(3) 189-207 <Http://Doi.Org/10.1016/J.Jconrel.2006.04.015>
- Remesy C., Manach C., Demogne C., Texier O., Regerat F. (2006). *Intererret nutritionnal des flavonoides*. Med. Et Nutr. 32(1):17-27.
- Robbins, R.J. (2003). *Los ácidos fenólicos en alimentos: un resumen analítico de Metodología*. Revista de Química Agrícola y Alimentaria, de 51 años, 2866-87.

- Sahidi F, y Naczk, M. (2004). *Phenolics in food and nutraceuticals*, CRC Press LLC, Boca Raton, FL.
- Saldana, L. (2004). *Efecto de la copigmentacion sobre la expresión de color En sistemas modelo De ciruela (Prunus domestica)*. Departamento de Quimica y Biologia. Universidad de las Americas, Puebla
- Santoro, K., & Ricciardi, C. (2016). *Biosensors. Encyclopedia of Food and Health*, 430–436. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00072-6>
- Sparre, B. and L. Andersson. (1991). *A taxonomic revision of the Tropaeolaceae*. Opera Botanica, No. 108. Copenhagen, Denmark.
- Stintzing F C, A S; Stintzing, R; Carle, B; Frei; Wrolstad, R. E. (2002). *Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments*. J. Agric. Food Chem.50:6172-6181.
- Tapia, M. E. y Fries, A. M. (2007). *Guía de campo de cultivos andinos*. Lima, Perú: FAO Y ANPE.
- Temoche, C. (2003). *Evaluación de algunas características funcionales de 30 clones de mashua (Tropaeolum tuberosum Ruiz y Pavón)*. UNALM. Lima. Perú.
- Tomas-Barberan, F.A., petirrojos, R.J., (1997). *Fitoquímica de frutas y verduras*. Calendon Press, Oxford/Nueva York.
- Thomas, M. J. (2000). *The role of free radicals and antioxidants*. Nutrition, v. 16, n. 7-8, 716-718.
- Travis, A. C. (1999). *Mashua. Ethnobotanical Leaflets*, 6. Recuperado de: <http://www.siu.edu/~ebl/>
- Villagomez, V. y Rodríguez, G. (2006). *Manejo agronómico de la papa Imaynatan Apanchik Patata Tarpusca y de sus parientes menores Uchuy Aylluntawan: oca, mashua, olluco*. Facultad de Agronomía. UNALM. Lima. Perú.



ANEXOS

Anexo 1. Resultado del extracto de Mashua: RGB, media y desviación estándar a diferente pH.

Tablas

Tabla 13

Resultados de RGB, media y desviación estándar a diferente pH para Mashua Santo Cristo A.

	RGB-M1					
	R		G		B	
	MEDIA	DS	MEDIA	DS	MEDIA	DS
pH = 2.06	154,158667	7,571680153	2,449	0,25043163	39,1083333	3,92447326
pH = 4	143,068667	0,713425773	45,3373333	7,18843977	97,4	6,91945106
pH = 5.64	118,839667	9,982605689	95,3366667	13,7258905	109,339	11,117329
pH = 6.87	122,956	7,912965879	110,168667	7,24805521	85,186	3,22009829
pH = 7	93,1823333	6,071893389	95,2676667	6,42278229	84,0723333	5,97697928

Tabla 14

Resultados de RGB, media y desviación estándar a diferente pH para Mashua Yana Añu

	RGB-M2					
	R		G		B	
	MEDIA	DS	MEDIA	DS	MEDIA	DS
pH = 2.06	158,5463333	5,66849692	2,88133333	0,724036831	39,36133333	1,149844482
pH = 4	136,6123333	9,286766409	22,1516667	7,328844134	66,83166667	10,06399872
pH = 5.64	114,1186667	6,500641302	79,988	5,233667261	95,20133333	14,12778512
pH = 6.87	99,06733333	13,85098857	88,284	18,44733292	73,42466667	15,7876595
pH = 7	80,872	9,353426538	82,3246667	10,52675498	74,85333333	6,531609475

Tabla 15

Resultados de RGB, media y desviación estándar a diferente pH para Mashua Santo Cristo B.

	RGB-M3					
	R		G		B	
	MEDIA	DS	MEDIA	DS	MEDIA	DS
pH = 2.06	164,3573333	8,658559022	13,56433333	9,49199633	70,55633333	20,24015033
pH = 4	134,1983333	4,296212557	76,72466667	4,210159657	106,2916667	4,732003416
pH = 5.64	117,9523333	2,272341597	109,8546667	1,698593928	112,6243333	1,827841988
pH = 6.87	112,8063333	6,650518952	107,146	9,227741706	94,39933333	9,356920665
pH = 7	113,3876667	7,556762623	116,4156667	7,477861481	96,65066667	8,819385031

Tabla 16
Muestra de Mashua Santo Cristo A.

M1

			MEDIA	MODA	DESVIACION ESTÁNDAR
pH = 2.06	D10:100-1	1 R	149.743	152	5.404
	D10:100-1	2 G	109.414	116	8.152
	D10:100-1	3 B	146.545	147	6.141
	D10:100-2	1 R	152.658	153	4.428
	D10:100-2	2 G	109.054	111	6.507
	D10:100-2	3 B	149.195	151	4.925
	D10:100-3	1 R	152.086	154	6.663
	D10:100-3	2 G	110.545	122	12.172
	D10:100-3	3 B	147.814	154	8.448
pH = 9.23	D10:100-1	1 R	146.067	147	5.881
	D10:100-1	2 G	144.056	145	6.048
	D10:100-1	3 B	156.423	156	5.265
	D10:100-2	1 R	146.594	149	4.628
	D10:100-2	2 G	145.637	148	4.707
	D10:100-2	3 B	156.848	159	4.057
	D10:100-3	1 R	143.66	146	6.31
	D10:100-3	2 G	143.231	146	7.068
	D10:100-3	3 B	154.55	156	5.194

			MEDIA	MODA	DESVIACION ESTÁNDAR
pH = 2.06	D10:200-1	1 R	153.588	157	5.162
	D10:200-1	2 G	139.969	144	6.348
	D10:200-1	3 B	159.457	162	5.216
	D10:200-2	1 R	154.72	155	3.186
	D10:200-2	2 G	136.473	137	6.32
	D10:200-2	3 B	158.492	159	3.73
	D10:200-3	1 R	152.556	152	4.247
	D10:200-3	2 G	132.795	133	6.268
	D10:200-3	3 B	155.197	156	4.666
pH = 9.23	D10:200-1	1 R	149.504	152	4.779
	D10:200-1	2 G	150.66	152	4.6
	D10:200-1	3 B	158.17	160	4.834
	D10:200-2	1 R	149.399	153	3.687
	D10:200-2	2 G	149.673	151	3.446
	D10:200-2	3 B	157.601	159	3.502
	D10:200-3	1 R	149.574	149	3.343
	D10:200-3	2 G	150.09	150	3.384
	D10:200-3	3 B	157.817	158	3.275

			MEDIA	MODA	DESVIACION ESTÁNDAR
pH = 2.06	D10:300-1	1 R	156.994	156	3.319
	D10:300-1	2 G	147.424	144	4.8
	D10:300-1	3 B	164.267	163	3.4
	D10:300-2	1 R	157.359	158	3.915
	D10:300-2	2 G	146.982	152	6.676
	D10:300-2	3 B	164.223	166	4.469
	D10:300-3	1 R	159.114	160	3.317
	D10:300-3	2 G	147.58	152	5.982
	D10:300-3	3 B	165.641	165	4.019
pH = 9.23	D10:300-1	1 R	151.134	153	3.663
	D10:300-1	2 G	150.028	152	3.849
	D10:300-1	3 B	159.048	160	3.254
	D10:300-2	1 R	143.554	145	5.482
	D10:300-2	2 G	141.962	145	5.544
	D10:300-2	3 B	153.328	155	5.193
	D10:300-3	1 R	148.524	150	3.083
	D10:300-3	2 G	147.134	149	3.385
	D10:300-3	3 B	156.222	157	2.581

Gráficas de los resultados de la Mashua M1 a diferente pH

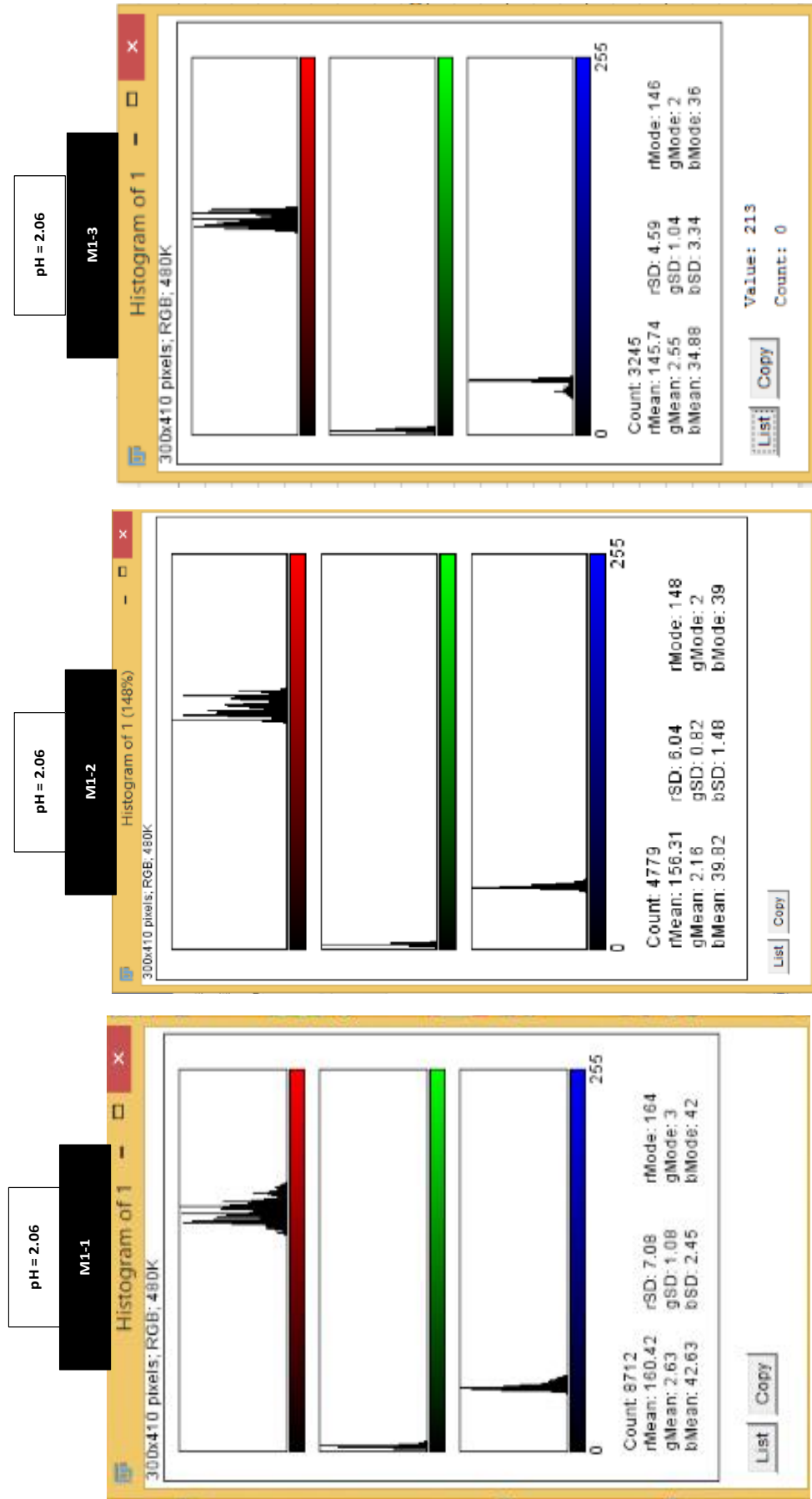


Figura 33. Grafica M1-PH2.06

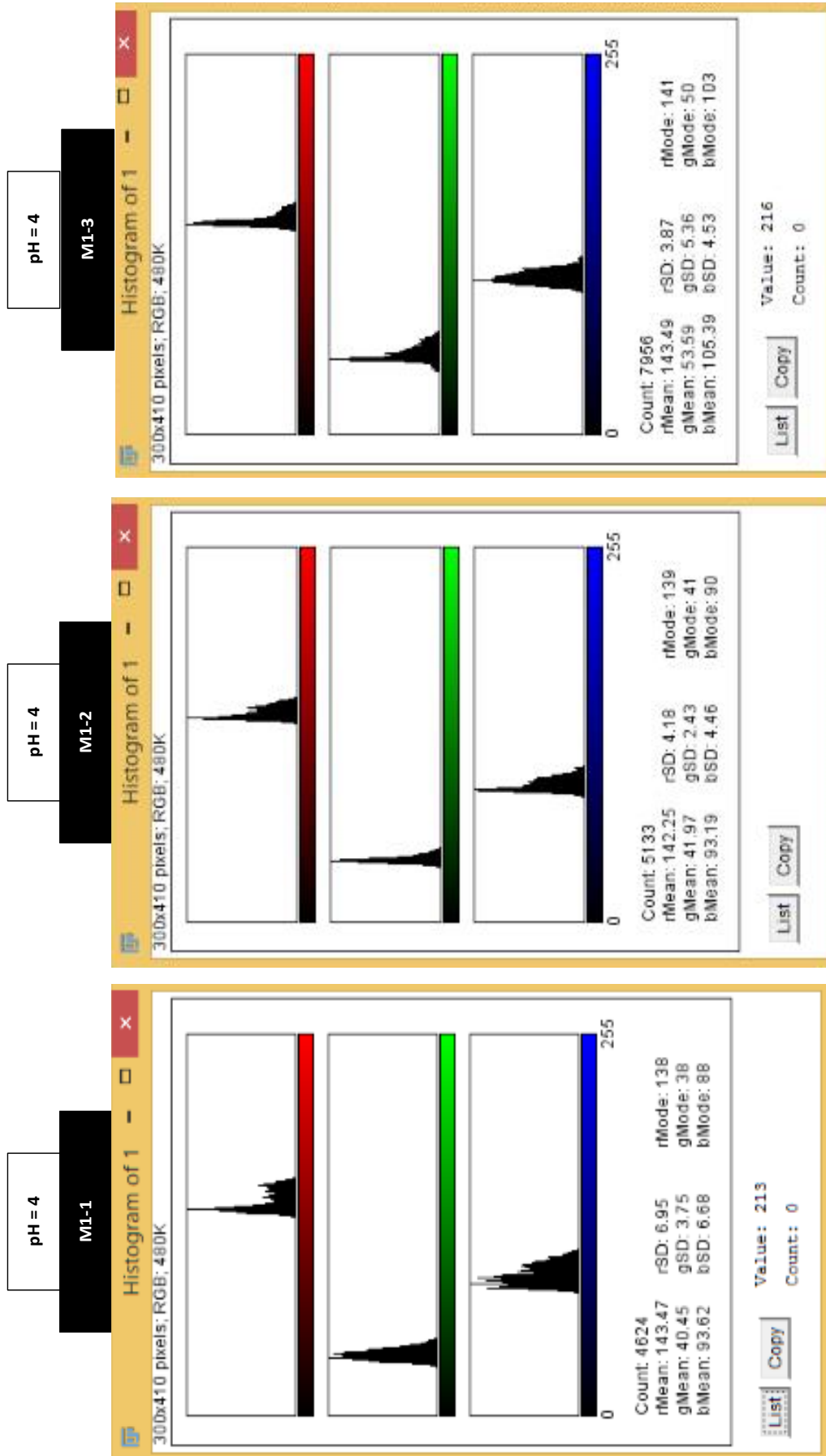


Figura 34. Grafica M1-PH4

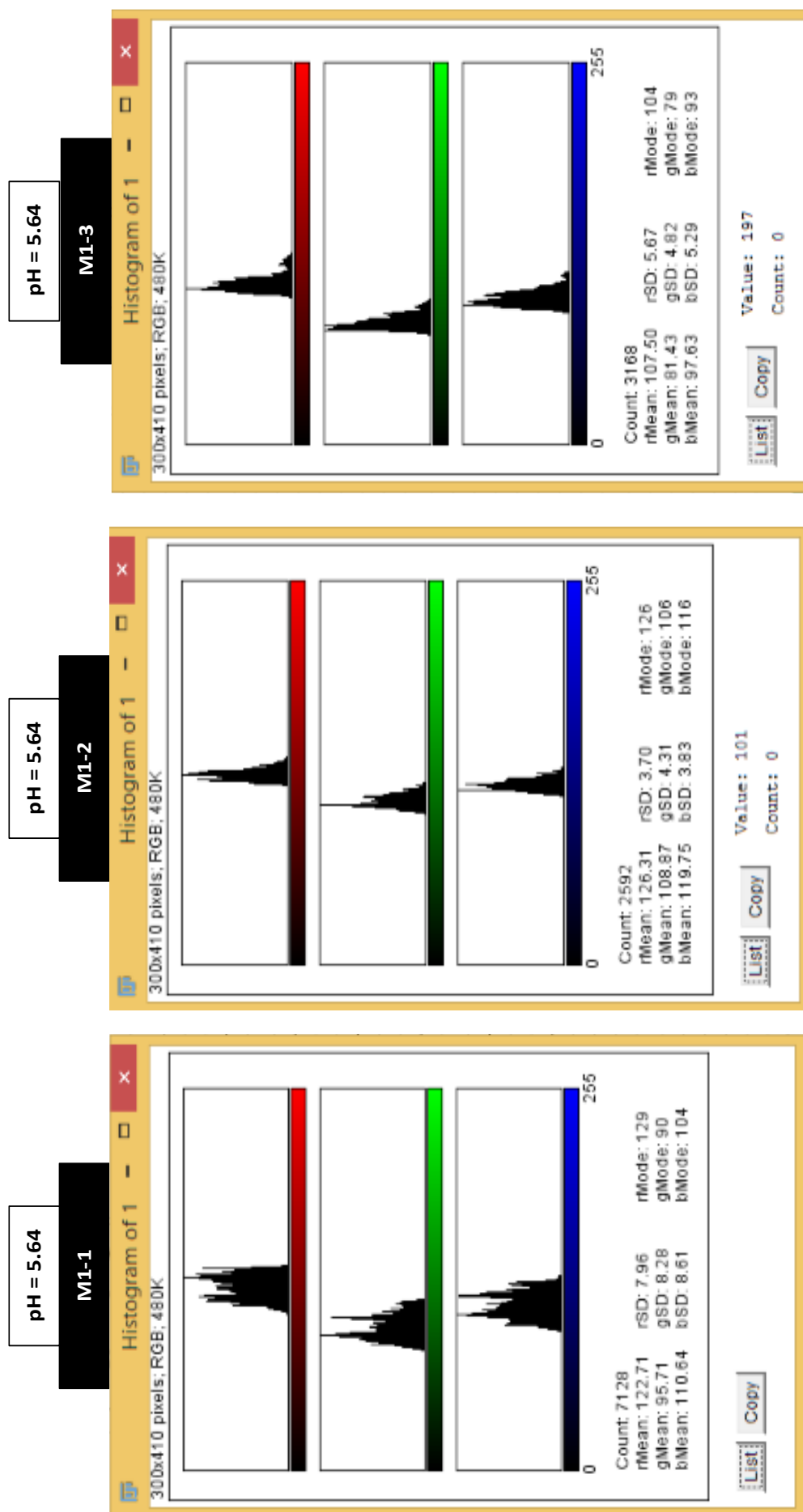


Figura 35. Grafica M1-PH5.64

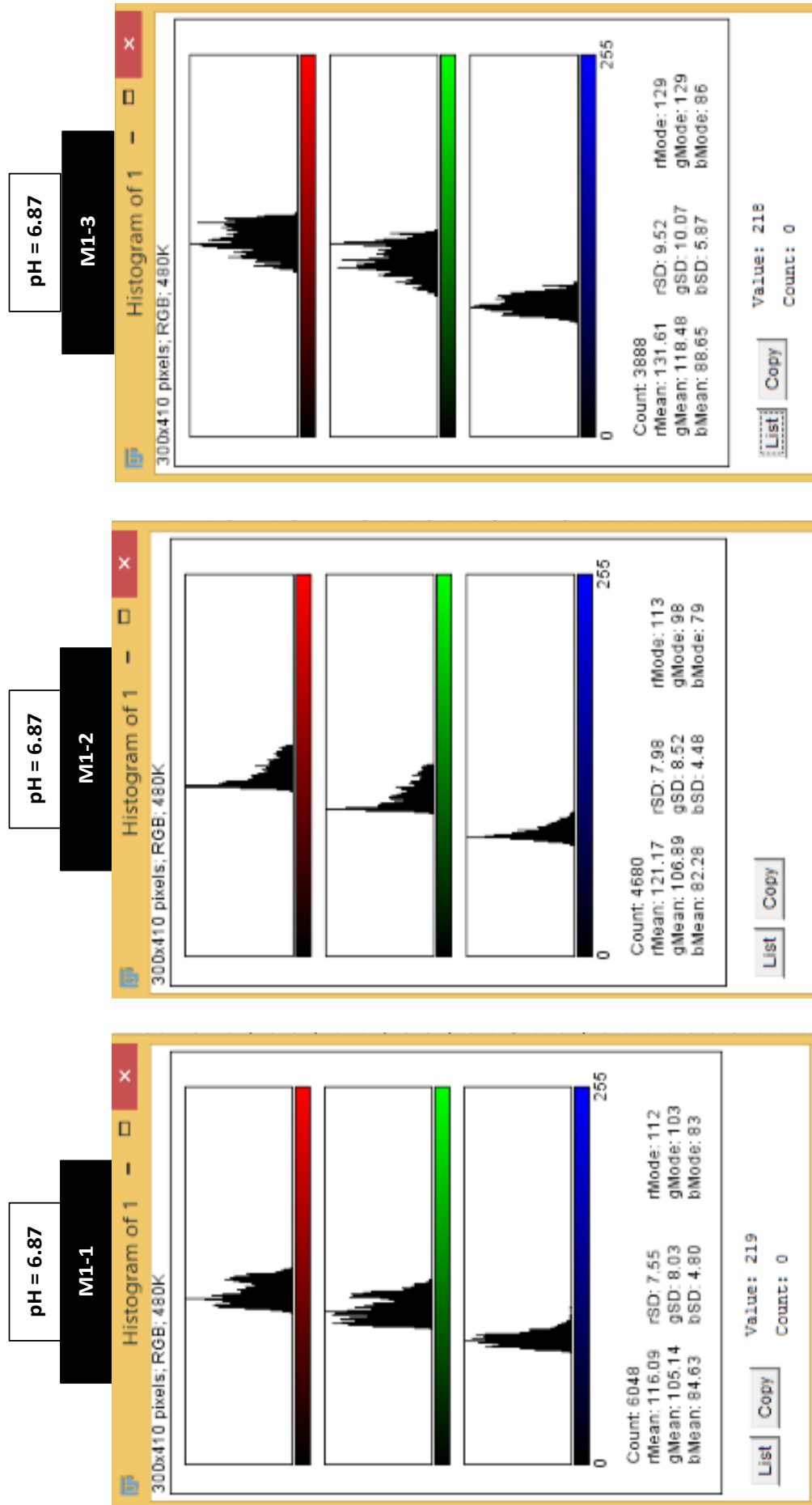


Figura 36. Grafica M1-PH6.87



Figura 37. Grafica M1-PH7

Tabla 17
Muestra de Mashua Yana aña

M2

			MEDIA	MODA	DESVIACION ESTÁNDAR
pH = 2.06	M2-1	1 R	157.775	159	4.656
	M2-1	2 G	2.548	2	1.41
	M2-1	3 B	40.093	43	6.715
	M2-2	1 R	164.561	174	7.66
	M2-2	2 G	2.384	2	0.988
	M2-2	3 B	39.955	40	1.369
	M2-3	1 R	153.303	146	9.319
	M2-3	2 G	3.712	2	2.21
	M2-3	3 B	38.036	41	5.711
pH = 4	M2-1	1 R	145.282	148	8.284
	M2-1	2 G	27.491	26	2.186
	M2-1	3 B	77.269	81	6.755
	M2-2	1 R	137.743	142	9.693
	M2-2	2 G	13.796	13	2.377
	M2-2	3 B	57.188	54	4.804
	M2-3	1 R	126.812	119	8.491
	M2-3	2 G	25.168	25	2.678
	M2-3	3 B	66.038	64	3.802
pH = 5.64	M2-1	1 R	121.294	113	8.615
	M2-1	2 G	85.964	85	7.739
	M2-1	3 B	101.381	104	8.413
	M2-2	1 R	112.44	110	7.23
	M2-2	2 G	77.779	72	6.628
	M2-2	3 B	92.89	90	6.709
	M2-3	1 R	108.622	106	5.483
	M2-3	2 G	76.221	75	3.664
	M2-3	3 B	91.333	90	3.697
pH = 6.87	M2-1	1 R	92.42	88	6.277
	M2-1	2 G	77.952	72	5.429
	M2-1	3 B	63.023	61	3.441
	M2-2	1 R	89.793	89	1.967
	M2-2	2 G	77.318	78	2.332
	M2-2	3 B	65.66	66	3.095
	M2-3	1 R	114.989	112	4.152
	M2-3	2 G	109.582	105	5.507
	M2-3	3 B	91.591	86	5.352
pH = 7	M2-1	1 R	88.294	89	4.279
	M2-1	2 G	90.871	84	5.751
	M2-1	3 B	81.065	78	3.427
	M2-2	1 R	83.956	82	3.618
	M2-2	2 G	85.537	83	4.226
	M2-2	3 B	75.452	75	2.15
	M2-3	1 R	70.366	70	3.104
	M2-3	2 G	70.566	70	3.132
	M2-3	3 B	68.043	67	3.19
pH = 8.1	M2-1	1 R	80.716	79	3.854
	M2-1	2 G	63.863	62	4.064
	M2-1	3 B	46.395	47	4.056
	M2-2	1 R	74.584	70	4.465
	M2-2	2 G	56.138	56	3.1
	M2-2	3 B	40.797	41	1.911
	M2-3	1 R	80.051	78	4.933
	M2-3	2 G	64.914	61	5.715
	M2-3	3 B	52.153	52	4.384
pH = 9.23	M2-1	1 R	134.507	129	6.975
	M2-1	2 G	78.265	74	7.286
	M2-1	3 B	46.721	44	4.151
	M2-2	1 R	116.409	111	5.956
	M2-2	2 G	52.438	52	2.253
	M2-2	3 B	33.877	33	2.328
	M2-3	1 R	122.419	117	5.473
	M2-3	2 G	68.858	59	8.271
	M2-3	3 B	48.384	43	5.978

Gráficas de los resultados de la muestra M2 a diferente pH

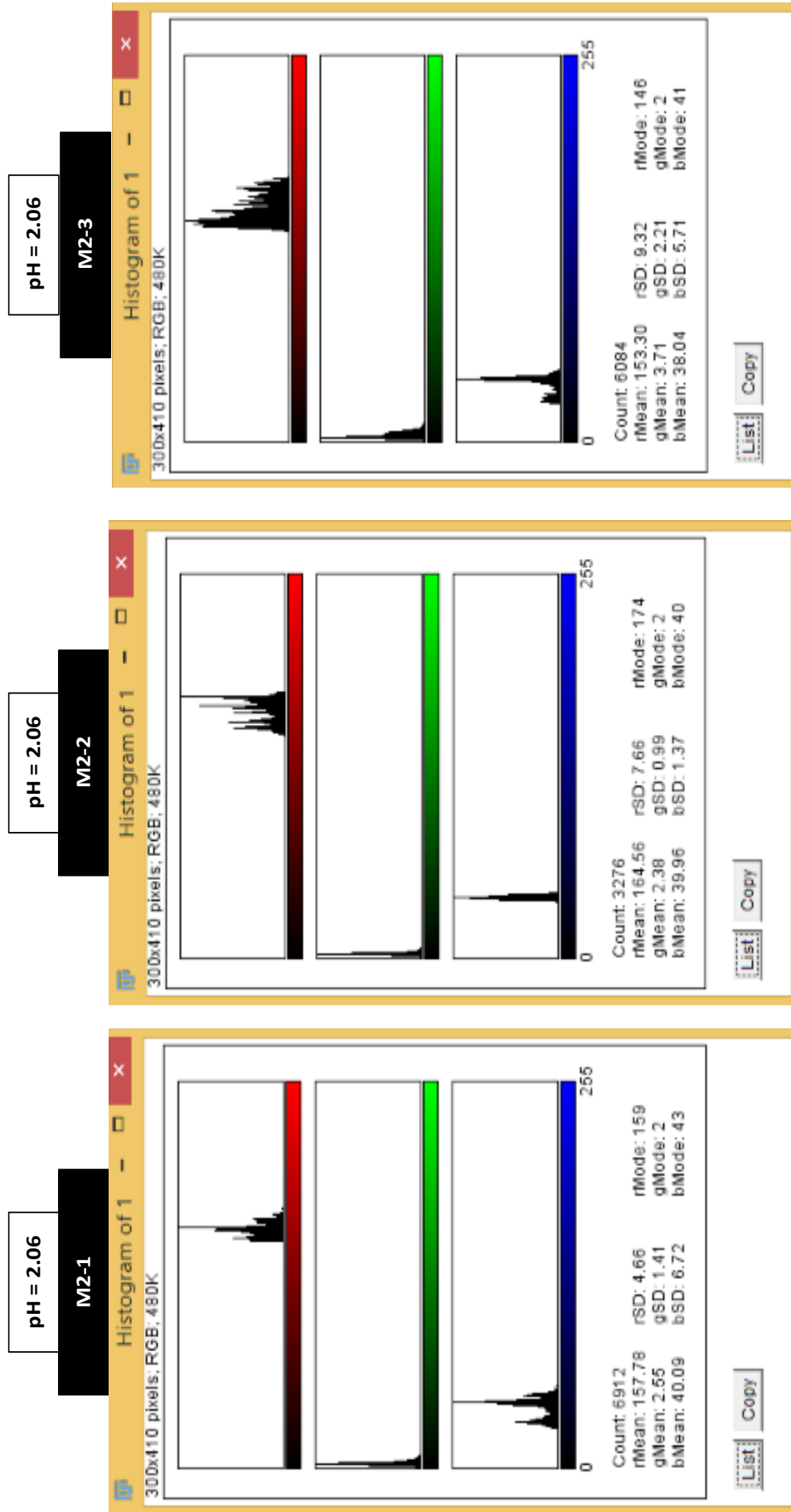


Figura 38. Grafica M2-PH2.06

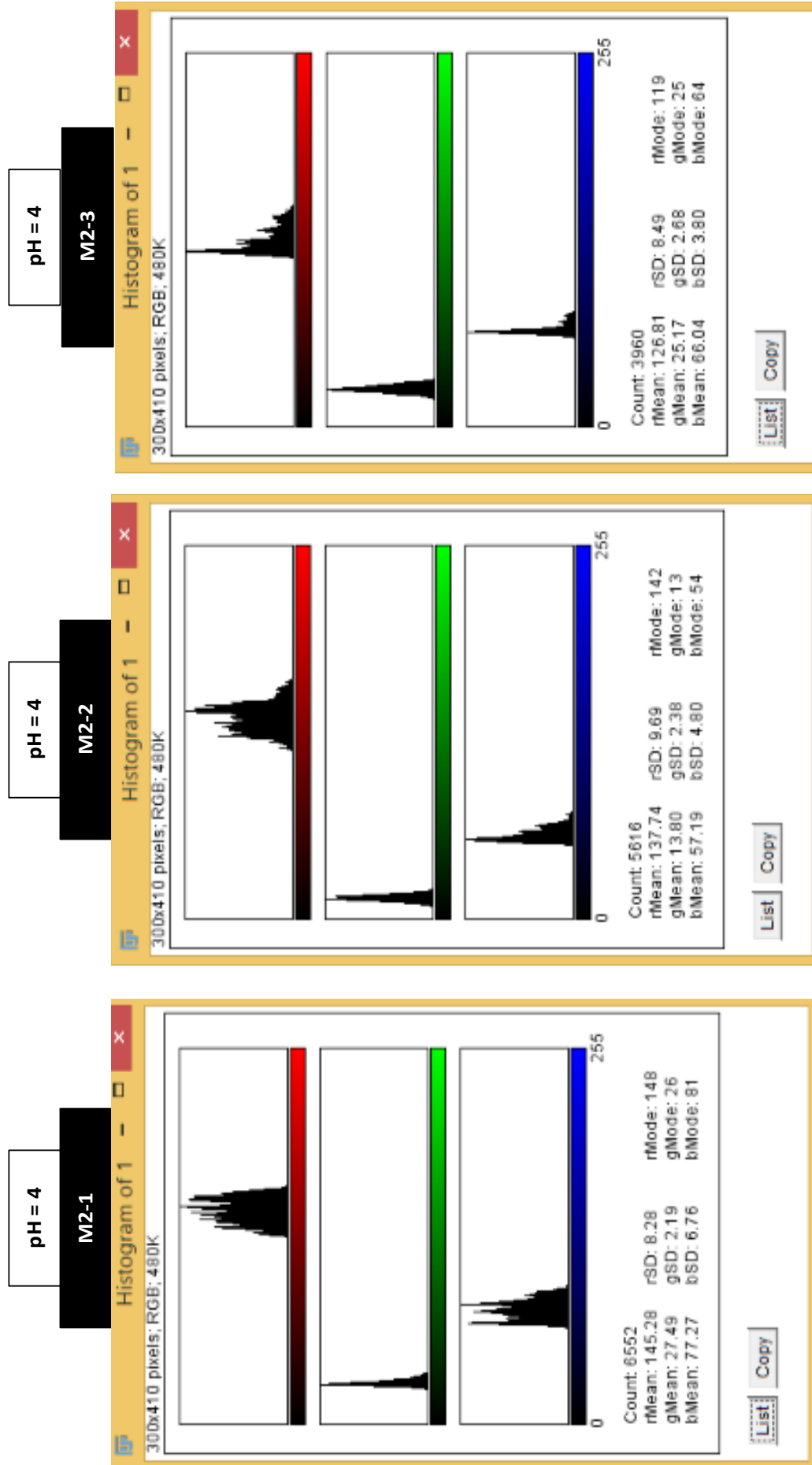


Figura 39. Grafica M2-PH4

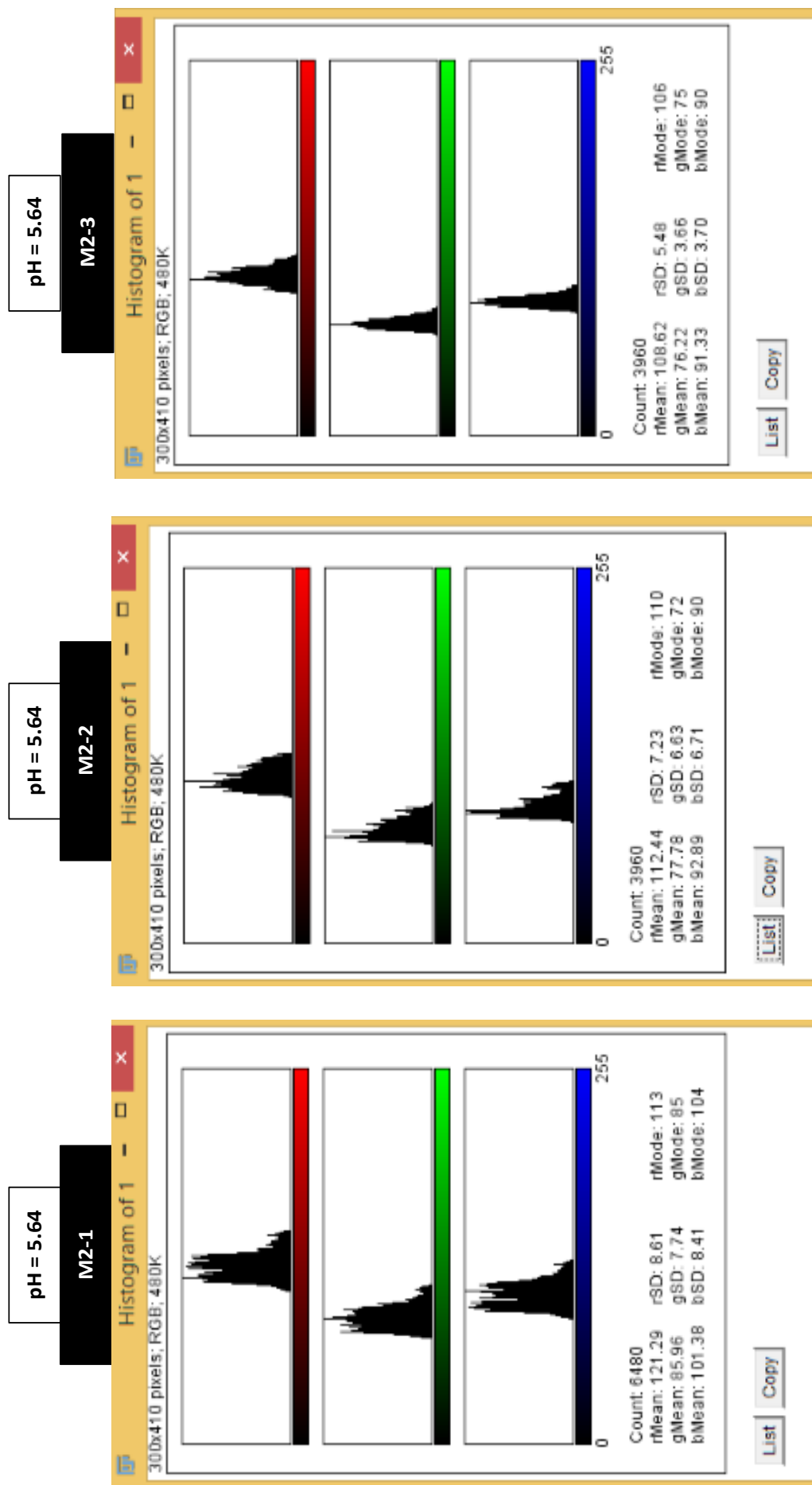


Figura 40. Grafica M2-PH5.64

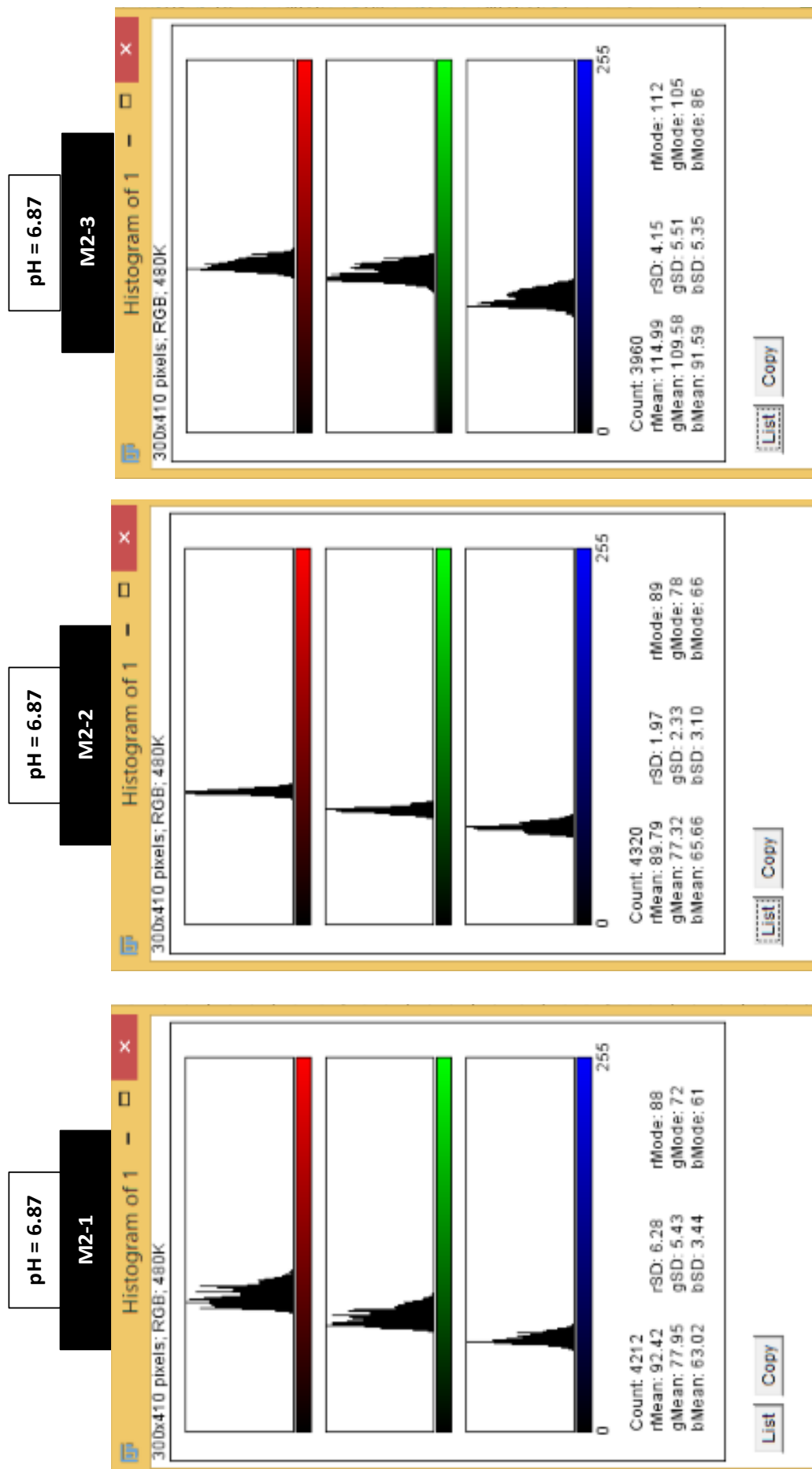


Figura 41. Grafica M2-PH6.87

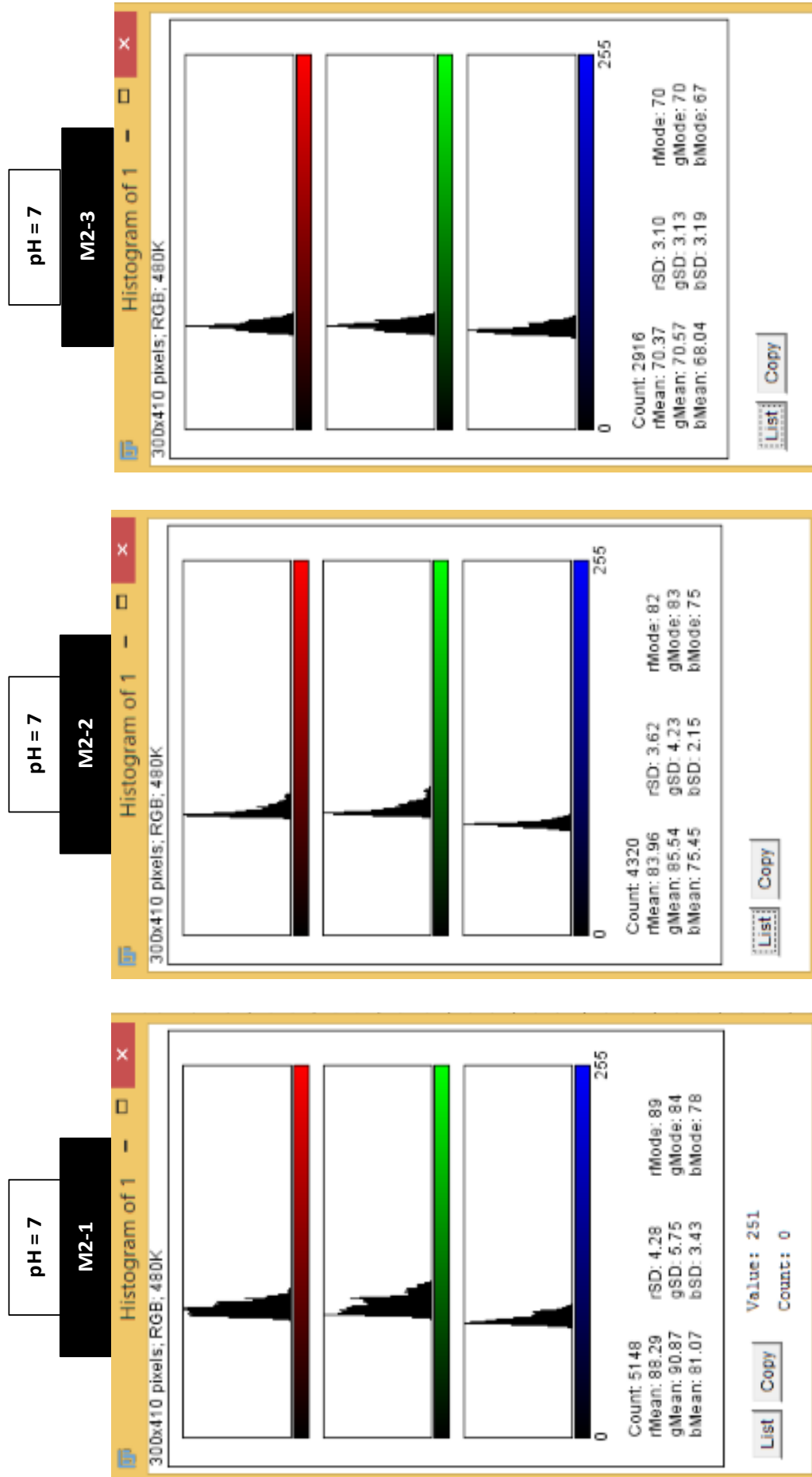


Figura 42. Grafica M2-PH7

Tabla 18
Muestra de Mashua Santo Cristo B

M3

			MEDIA	MODA	DESVIACION ESTÁNDAR
pH = 2.06	M3-1	1 R	173.675	167	6.56
	M3-1	2 G	22.366	22	4.119
	M3-1	3 B	92.635	94	5.985
	M3-2	1 R	162.838	161	6.204
	M3-2	2 G	3.507	3	1.433
	M3-2	3 B	52.879	52	2.319
	M3-3	1 R	156.559	155	3.406
	M3-3	2 G	14.82	9	5.549
	M3-3	3 B	66.155	58	8.092
pH = 4	M3-1	1 R	139.117	134	9.29
	M3-1	2 G	81.337	78	6.593
	M3-1	3 B	111.646	107	7.906
	M3-2	1 R	132.298	130	5.138
	M3-2	2 G	73.088	72	5.022
	M3-2	3 B	102.671	98	5.557
	M3-3	1 R	131.18	130	6.454
	M3-3	2 G	75.749	78	6.555
	M3-3	3 B	104.558	106	6.873
pH = 5.64	M3-1	1 R	120.517	118	3.148
	M3-1	2 G	111.06	112	2.917
	M3-1	3 B	114.358	114	2.783
	M3-2	1 R	117.15	116	2.702
	M3-2	2 G	110.592	110	2.798
	M3-2	3 B	112.8	112	2.649
	M3-3	1 R	116.19	114	4.845
	M3-3	2 G	107.912	102	6.835
	M3-3	3 B	110.715	105	6.028
pH = 6.87	M3-1	1 R	120.453	119	2.993
	M3-1	2 G	117.599	118	2.927
	M3-1	3 B	104.68	105	3.093
	M3-2	1 R	108.37	108	2.036
	M3-2	2 G	100.13	99	2.312
	M3-2	3 B	86.381	86	2.809
	M3-3	1 R	109.596	111	3.777
	M3-3	2 G	103.709	105	4.548
	M3-3	3 B	92.137	89	5.577
pH = 7	M3-1	1 R	122.097	120	6.543
	M3-1	2 G	125.014	120	6.649
	M3-1	3 B	106.791	108	5.669
	M3-2	1 R	109.497	105	7.847
	M3-2	2 G	112.802	108	8.038
	M3-2	3 B	90.767	87	5.814
	M3-3	1 R	108.569	106	5.136
	M3-3	2 G	111.431	109	5.245
	M3-3	3 B	92.394	91	3.676
pH = 8.1	M3-1	1 R	128.386	130	7.84
	M3-1	2 G	116.998	126	7.395
	M3-1	3 B	77.048	81	4.83
	M3-2	1 R	120.01	121	5.936
	M3-2	2 G	105.176	107	6.456
	M3-2	3 B	64.34	63	4.41
	M3-3	1 R	112.217	110	6.762
	M3-3	2 G	94.884	93	6.979
	M3-3	3 B	59.77	61	2.626
pH = 9.23	M3-1	1 R	133.296	133	1.538
	M3-1	2 G	115.963	116	1.461
	M3-1	3 B	85.114	86	2.164
	M3-2	1 R	141.12	143	4.461
	M3-2	2 G	118.249	117	4.805
	M3-2	3 B	79.797	78	3.08
	M3-3	1 R	137.179	133	8.866
	M3-3	2 G	120.375	117	8.463
	M3-3	3 B	91.783	91	4.883

Gráficas de los resultados de la muestra M3 a diferente pH.

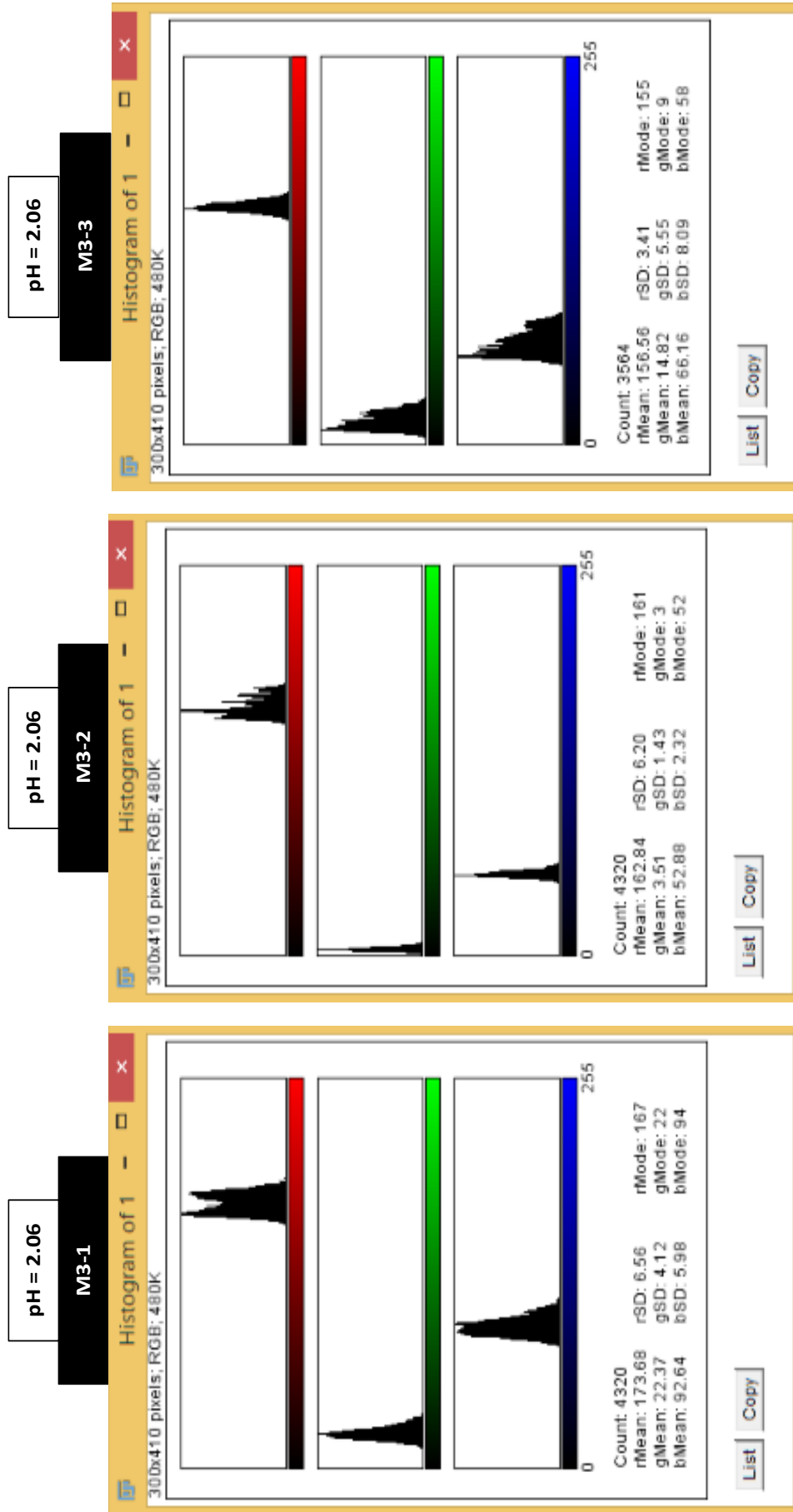


Figura 43. Grafica M3-PH2.06

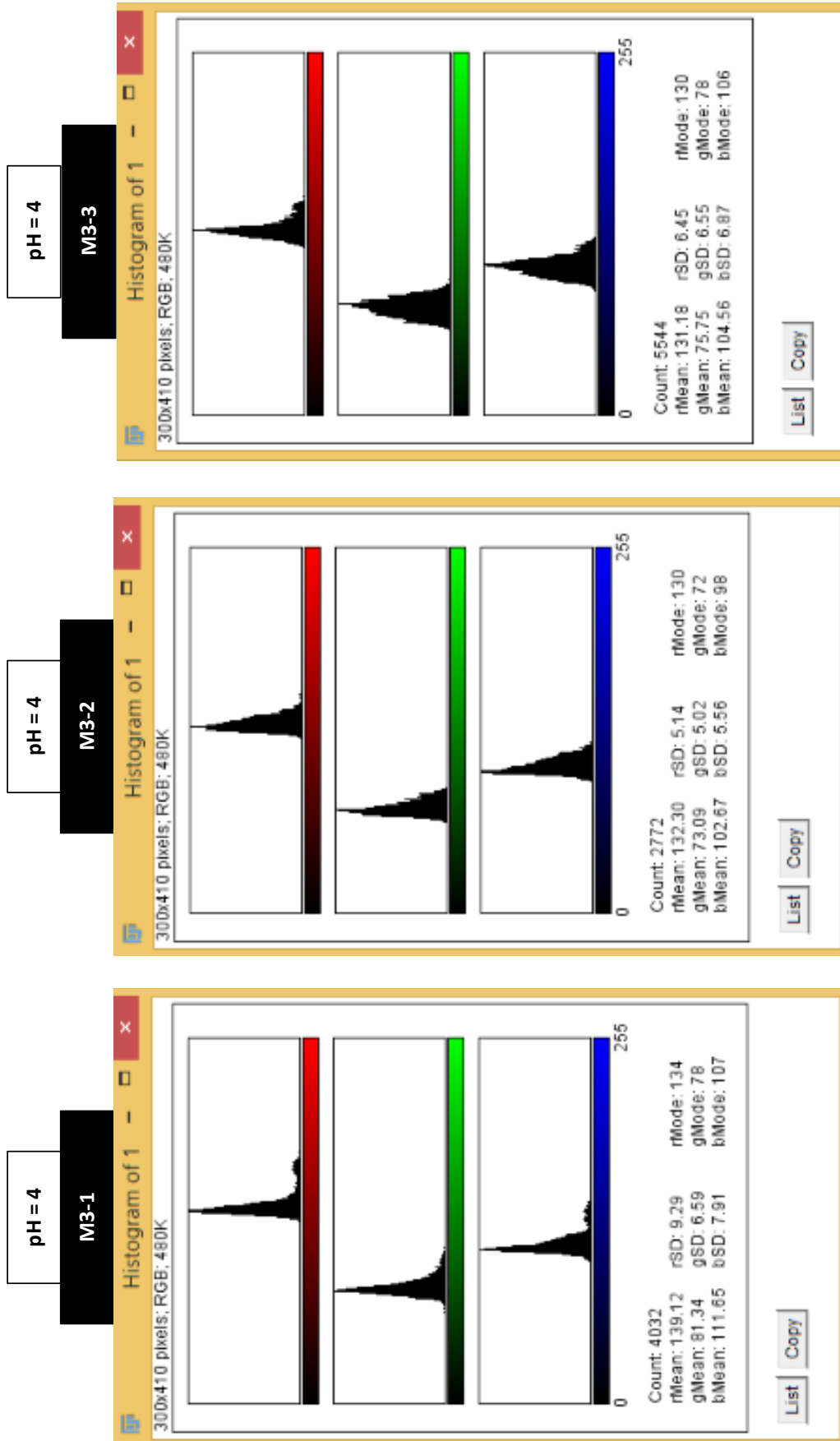


Figura 44. Grafica M3-PH4



Figura 45. Grafica M3-PH5.64



Figura 46. Grafica M3-PH6.87



Figura 47. Grafica M3-PH7

Tabla 19
Resultados de las sondas a pH 2.06 y a distintas diluciones

M1 - D – PADMA

		R		G		B	
		MEDIA	DS	MEDIA	DS	MEDIA	DS
pH = 2.06	D10:100	151,495667	1,544563477	109,671	0,77801478	147,851333	1,32539441
pH = 2.06	D10:200	153,621333	1,082385021	136,412333	3,58738475	157,715333	2,23367597
pH = 2.06	D10:300	157,822333	1,133405635	147,328667	0,31018919	164,710333	0,80628118

M2 - PADMA

		R		G		B	
		MEDIA	DS	MEDIA	DS	MEDIA	DS
pH = 2.06	D10:100	115,274	2,280336159	64,2163333	2,7068316	106,288	4,83553379
pH = 2.06	D10:200	125,309667	3,092476246	95,7596667	6,80712365	127,791	2,39700146
pH = 2.06	D10:300	132,092	2,061972114	109,691333	6,25943259	137,463	3,34362214

M3 – PADMA

		R		G		B	
		MEDIA	DS	MEDIA	DS	MEDIA	DS
pH = 2.06	D10:100	125,164667	4,838513443	100,366333	7,1290022	130,121667	5,94004094
pH = 2.06	D10:200	125,419667	1,518660375	113,736333	4,78402115	137,079667	2,24311309
pH = 2.06	D10:300	127,481667	1,982644782	124,333667	2,3882308	140,937	2,54239592

Tabla 20
Resultados de las sondas a pH 2.06 y a distintas diluciones

M1

			MEDIA	MODA	DESVIACION ESTÁNDAR
pH = 2.06	D10:100-1	1 R	149.743	152	5.404
	D10:100-1	2 G	109.414	116	8.152
	D10:100-1	3 B	146.545	147	6.141
	D10:100-2	1 R	152.658	153	4.428
	D10:100-2	2 G	109.054	111	6.507
	D10:100-2	3 B	149.195	151	4.925
	D10:100-3	1 R	152.086	154	6.663
	D10:100-3	2 G	110.545	122	12.172
	D10:100-3	3 B	147.814	154	8.448
pH = 9.23	D10:100-1	1 R	146.067	147	5.881
	D10:100-1	2 G	144.056	145	6.048
	D10:100-1	3 B	156.423	156	5.265
	D10:100-2	1 R	146.594	149	4.628
	D10:100-2	2 G	145.637	148	4.707
	D10:100-2	3 B	156.848	159	4.057
	D10:100-3	1 R	143.66	146	6.31
	D10:100-3	2 G	143.231	146	7.068
	D10:100-3	3 B	154.55	156	5.194

			MEDIA	MODA	DESVIACION ESTÁNDAR
pH = 2.06	D10:200-1	1 R	153.588	157	5.162
	D10:200-1	2 G	139.969	144	6.348
	D10:200-1	3 B	159.457	162	5.216
	D10:200-2	1 R	154.72	155	3.186
	D10:200-2	2 G	136.473	137	6.32
	D10:200-2	3 B	158.492	159	3.73
	D10:200-3	1 R	152.556	152	4.247
	D10:200-3	2 G	132.795	133	6.268
	D10:200-3	3 B	155.197	156	4.666
pH = 9.23	D10:200-1	1 R	149.504	152	4.779
	D10:200-1	2 G	150.66	152	4.6
	D10:200-1	3 B	158.17	160	4.834
	D10:200-2	1 R	149.399	153	3.687
	D10:200-2	2 G	149.673	151	3.446
	D10:200-2	3 B	157.601	159	3.502
	D10:200-3	1 R	149.574	149	3.343
	D10:200-3	2 G	150.09	150	3.384
	D10:200-3	3 B	157.817	158	3.275

			MEDIA	MODA	DESVIACION ESTÁNDAR
pH = 2.06	D10:300-1	1 R	156.994	156	3.319
	D10:300-1	2 G	147.424	144	4.8
	D10:300-1	3 B	164.267	163	3.4
	D10:300-2	1 R	157.359	158	3.915
	D10:300-2	2 G	146.982	152	6.676
	D10:300-2	3 B	164.223	166	4.469
	D10:300-3	1 R	159.114	160	3.317
	D10:300-3	2 G	147.58	152	5.982
	D10:300-3	3 B	165.641	165	4.019
pH = 9.23	D10:300-1	1 R	151.134	153	3.663
	D10:300-1	2 G	150.028	152	3.849
	D10:300-1	3 B	159.048	160	3.254
	D10:300-2	1 R	143.554	145	5.482
	D10:300-2	2 G	141.962	145	5.544
	D10:300-2	3 B	153.328	155	5.193
	D10:300-3	1 R	148.524	150	3.083
	D10:300-3	2 G	147.134	149	3.385
	D10:300-3	3 B	156.222	157	2.581

Gráficas de los resultados de las muestras a diferentes diluciones

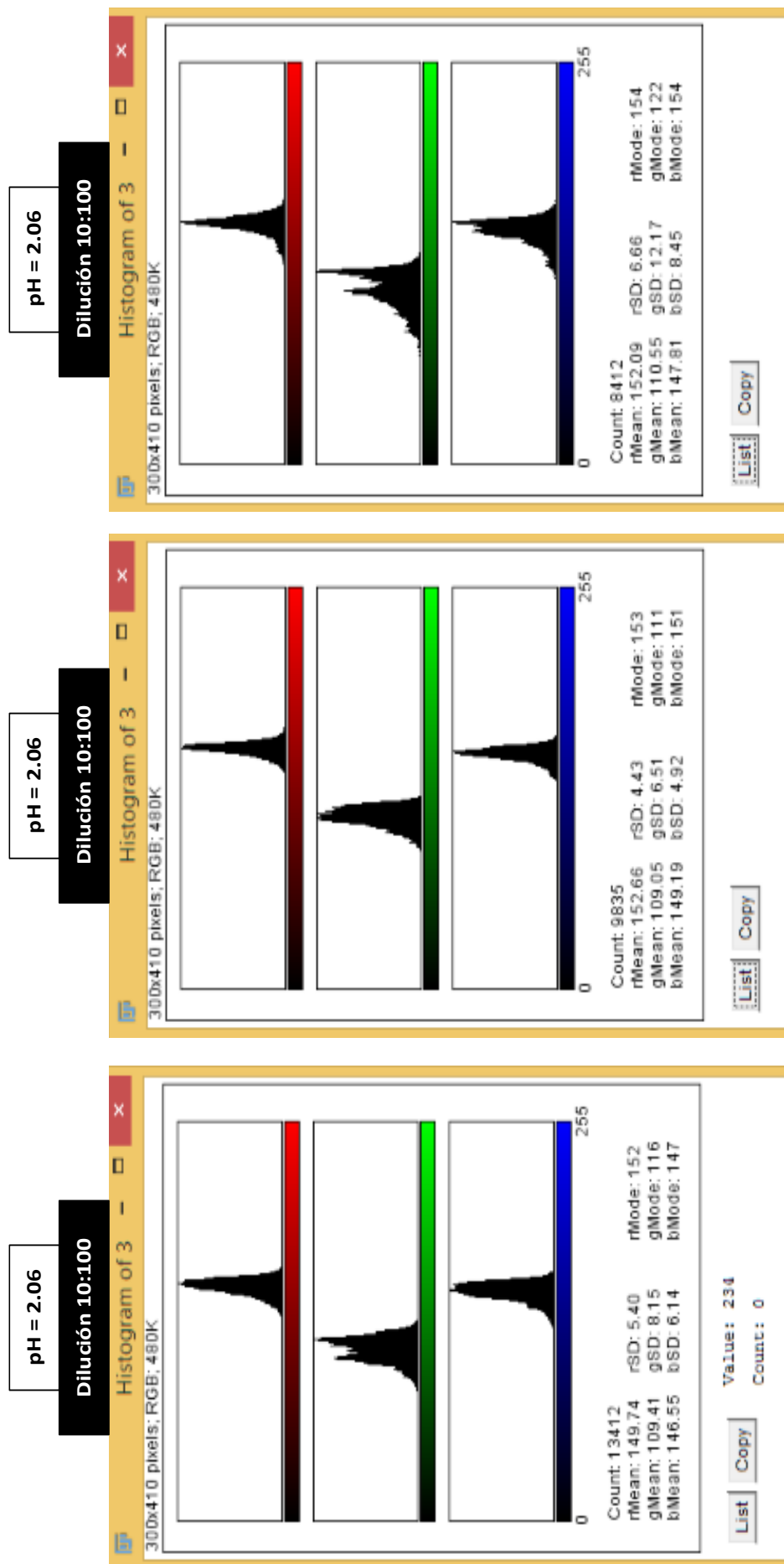


Figura 48. Grafica M1-PH2.06-D10.100

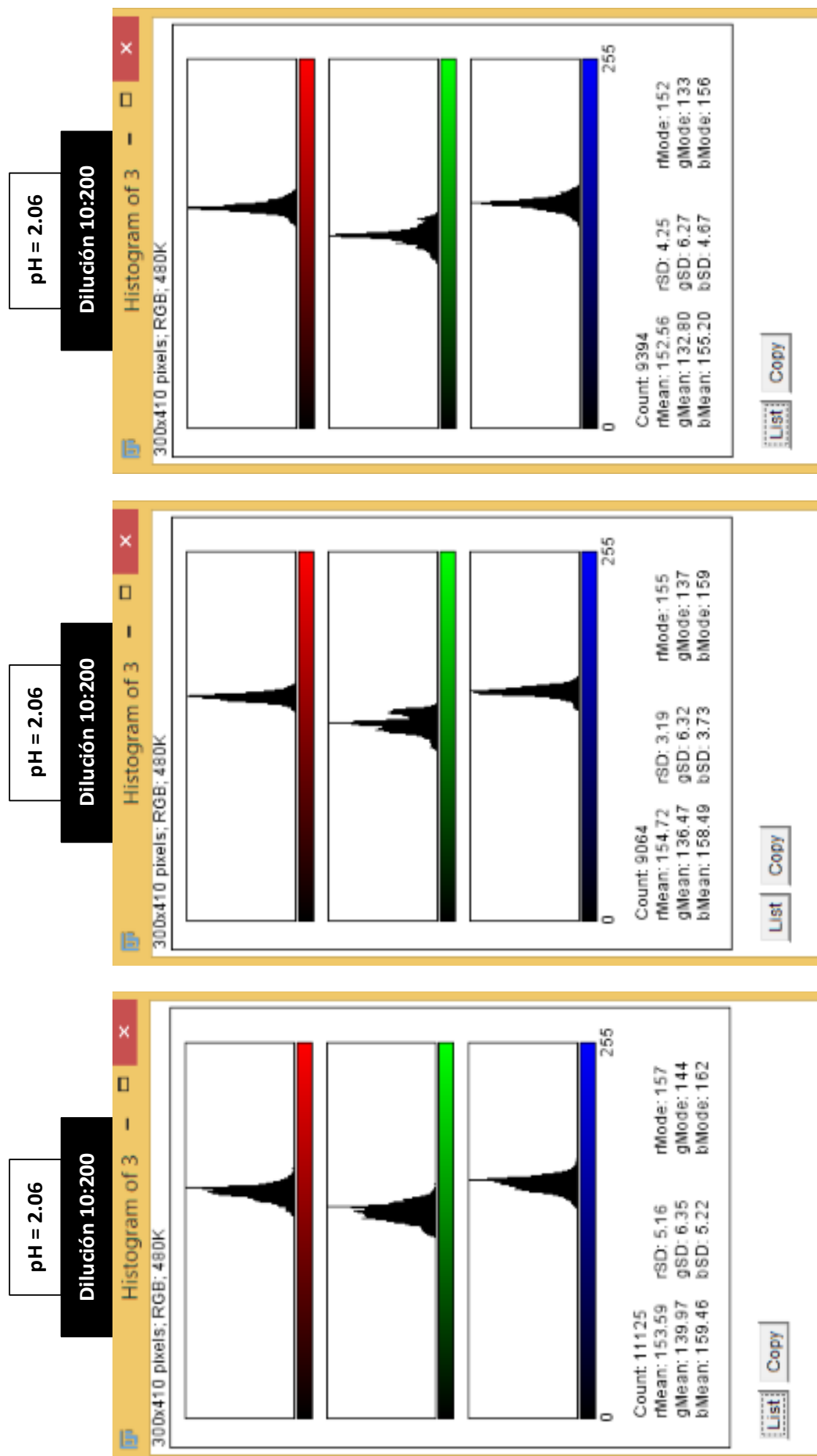


Figura 49. Grafica M1-PH2.06-D10.200

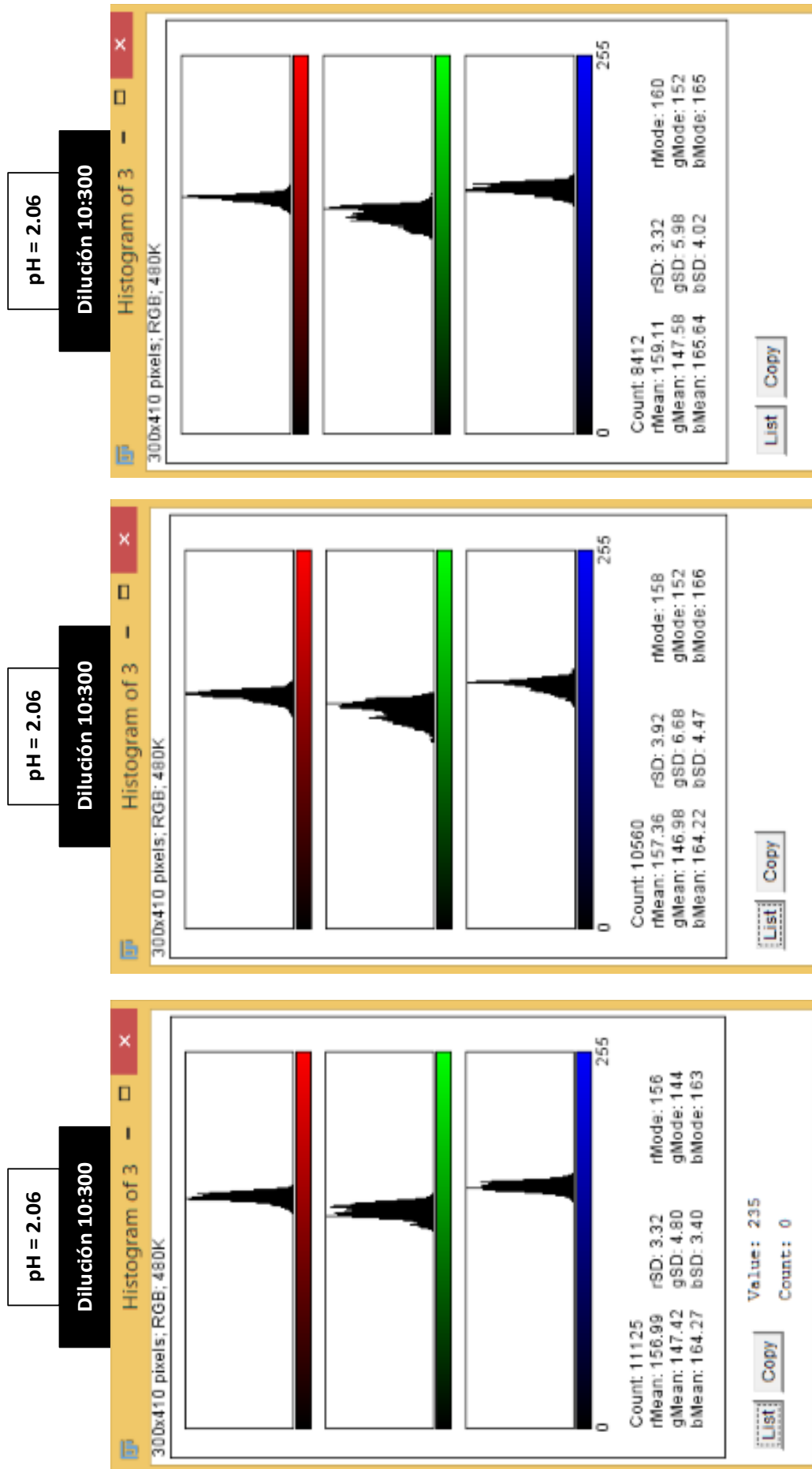


Figura 50. Grafica M1-PH2.06-D10.300

Tabla 21
Muestra 2 de pH PADma

M2

			MEDIA	MODA	DESVIACION ESTÁND
pH = 2.06	D10:100-1	1 R	117.075	120	8.193
	D10:100-1	2 G	65.993	66	5.044
	D10:100-1	3 B	110.29	111	7.856
	D10:100-2	1 R	116.037	120	5.518
	D10:100-2	2 G	65.555	70	5.739
	D10:100-2	3 B	107.659	112	7.251
	D10:100-3	1 R	112.71	118	7.572
	D10:100-3	2 G	61.101	63	5.551
	D10:100-3	3 B	100.915	107	7.111
pH = 9.23	D10:100-1	1 R	100.96	106	6.723
	D10:100-1	2 G	100.681	108	7.136
	D10:100-1	3 B	116.698	120	6.482
	D10:100-2	1 R	102.508	111	8.174
	D10:100-2	2 G	100.934	109	8.131
	D10:100-2	3 B	114.301	122	7.595
	D10:100-3	1 R	108.726	112	6.577
	D10:100-3	2 G	108.547	110	7.723
	D10:100-3	3 B	121.656	124	6.661

			MEDIA	MODA	DESVIACION ESTÁND
pH = 2.06	D10:200-1	1 R	122.087	126	8.935
	D10:200-1	2 G	99.611	108	8.427
	D10:200-1	3 B	127.711	126	8.271
	D10:200-2	1 R	128.253	131	8.132
	D10:200-2	2 G	99.768	100	7.392
	D10:200-2	3 B	130.227	131	7.495
	D10:200-3	1 R	125.589	130	5.778
	D10:200-3	2 G	87.9	92	5.209
	D10:200-3	3 B	125.435	131	5.996
pH = 9.23	D10:200-1	1 R	134.579	133	3.393
	D10:200-1	2 G	138.269	136	3.327
	D10:200-1	3 B	152.625	151	2.621
	D10:200-2	1 R	130.018	126	4.58
	D10:200-2	2 G	133.285	131	4.369
	D10:200-2	3 B	151.281	150	2.737
	D10:200-3	1 R	124.585	121	4.272
	D10:200-3	2 G	134.16	133	3.527
	D10:200-3	3 B	149.401	150	2.615

			MEDIA	MODA	DESVIACION ESTÁND
pH = 2.06	D10:300-1	1 R	133.545	137	5.008
	D10:300-1	2 G	111.111	113	5.382
	D10:300-1	3 B	139.206	141	4.665
	D10:300-2	1 R	129.732	135	4.851
	D10:300-2	2 G	102.844	103	4.291
	D10:300-2	3 B	133.608	136	4.334
	D10:300-3	1 R	132.999	136	5.303
	D10:300-3	2 G	115.119	117	7.478
	D10:300-3	3 B	139.575	143	5.195
pH = 9.23	D10:300-1	1 R	131.186	131	2.699
	D10:300-1	2 G	130.788	130	2.698
	D10:300-1	3 B	144.046	144	2.13
	D10:300-2	1 R	131.35	134	4.722
	D10:300-2	2 G	129.531	132	4.925
	D10:300-2	3 B	143.132	146	4.567
	D10:300-3	1 R	133.783	136	3.431
	D10:300-3	2 G	131.649	134	3.59
	D10:300-3	3 B	144.623	145	2.821

Gráficas de los resultados de la muestra M2 a diferentes diluciones

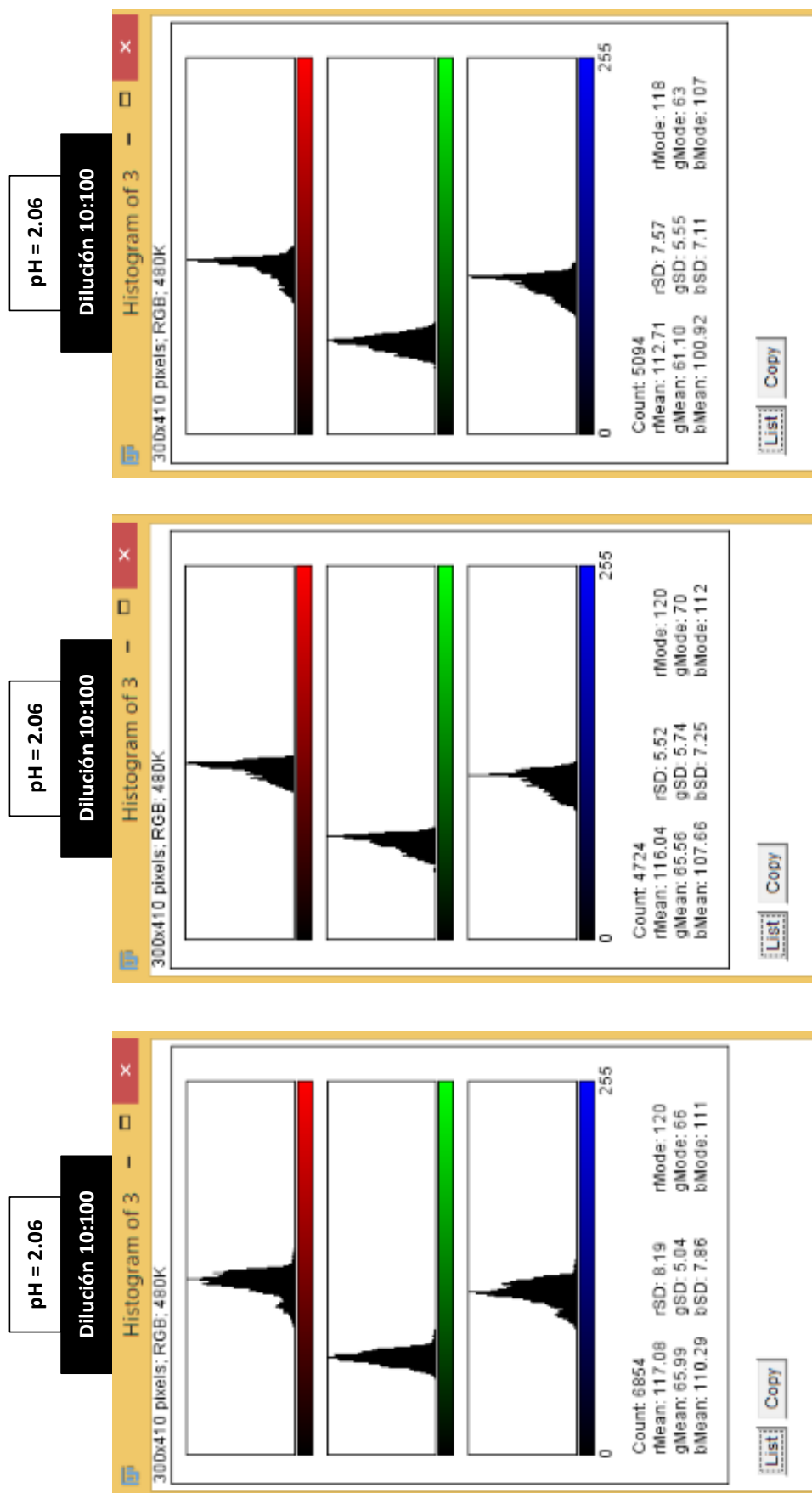


Figura 51. Grafica M2-PH2.06-D10.100

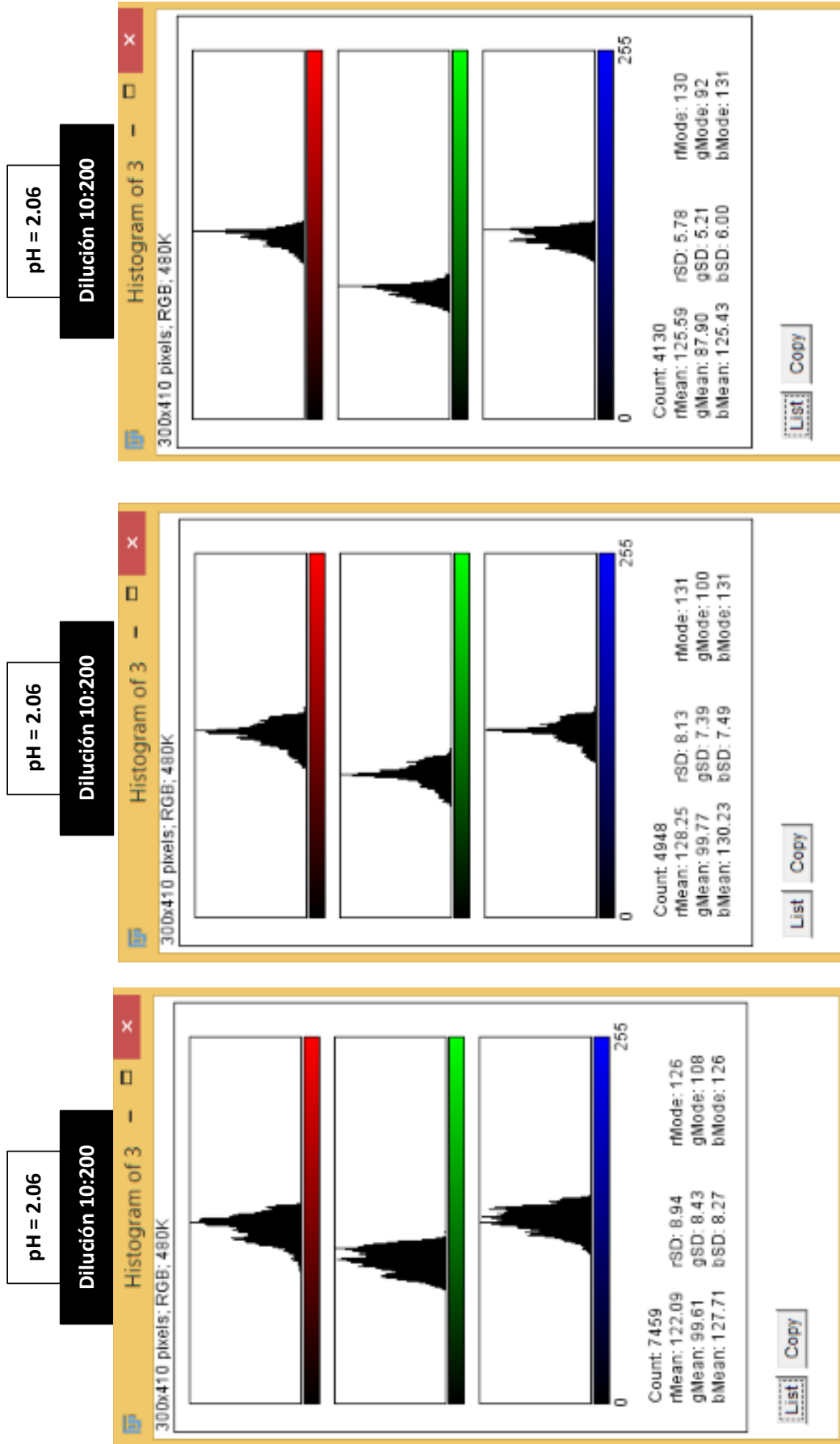


Figura 52. Grafica M2-PH2.06-D10.200

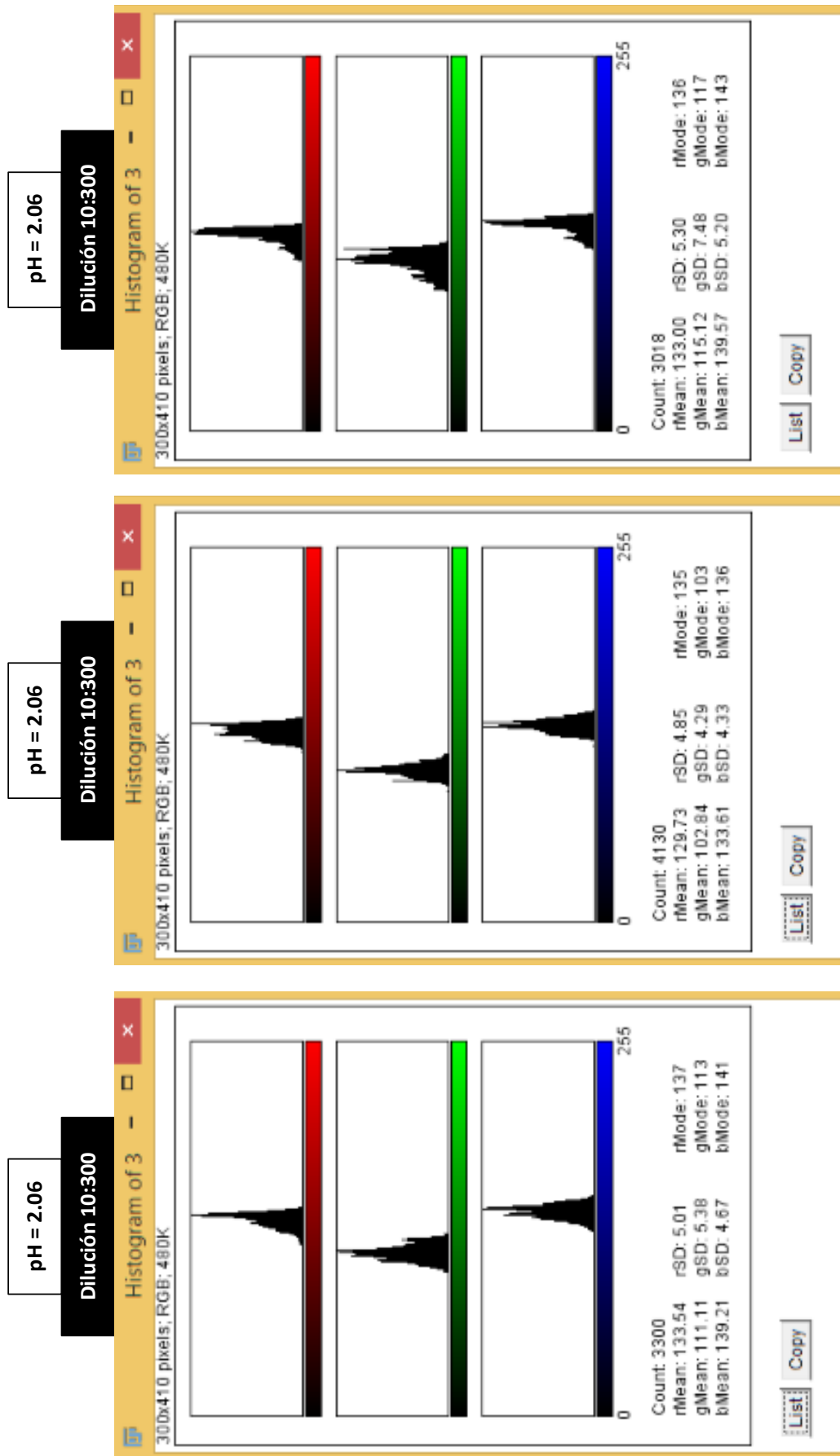


Figura 53. Grafica M2-PH2.06-D10.300

Tabla 22
Muestra 3 de pH PADma

M3

			MEDIA	MODA	DESVIACION ESTÁNDAR
pH = 2.06	D10:100-1	1 R	123.828	127	7.552
	D10:100-1	2 G	97.878	99	6.019
	D10:100-1	3 B	127.407	129	6.686
	D10:100-2	1 R	130.531	132	3.961
	D10:100-2	2 G	108.406	108	3.195
	D10:100-2	3 B	136.934	137	3.112
	D10:100-3	1 R	121.135	119	5.62
	D10:100-3	2 G	94.815	92	4.793
	D10:100-3	3 B	126.024	123	5.452
pH = 9.23	D10:100-1	1 R	119.256	122	3.144
	D10:100-1	2 G	121.282	124	3.142
	D10:100-1	3 B	134.402	137	2.917
	D10:100-2	1 R	116.202	119	4.208
	D10:100-2	2 G	117.492	120	4.347
	D10:100-2	3 B	130.821	132	3.415
	D10:100-3	1 R	118.72	115	5.237
	D10:100-3	2 G	118.761	121	5.165
	D10:100-3	3 B	131.501	134	4.734

			MEDIA	MODA	DESVIACION ESTÁNDAR
pH = 2.06	D10:200-1	1 R	124.929	128	4.466
	D10:200-1	2 G	118.658	121	3.643
	D10:200-1	3 B	139.127	141	3.938
	D10:200-2	1 R	127.123	127	2.722
	D10:200-2	2 G	113.448	115	2.541
	D10:200-2	3 B	137.43	138	2.147
	D10:200-3	1 R	124.207	124	2.865
	D10:200-3	2 G	109.103	108	2.712
	D10:200-3	3 B	134.682	134	2.722
pH = 9.23	D10:200-1	1 R	118.849	122	5.044
	D10:200-1	2 G	120.379	124	5.321
	D10:200-1	3 B	133.255	137	4.722
	D10:200-2	1 R	116.871	118	3.864
	D10:200-2	2 G	119.887	122	4.042
	D10:200-2	3 B	132.267	134	3.777
	D10:200-3	1 R	123.094	127	4.963
	D10:200-3	2 G	124.944	129	5.523
	D10:200-3	3 B	138.587	142	5.426

			MEDIA	MODA	DESVIACION ESTÁNDAR
pH = 2.06	D10:300-1	1 R	125.212	126	6.544
	D10:300-1	2 G	121.578	124	6.786
	D10:300-1	3 B	138.169	140	6.04
	D10:300-2	1 R	128.357	132	4.243
	D10:300-2	2 G	125.803	130	4.499
	D10:300-2	3 B	141.474	144	3.837
	D10:300-3	1 R	128.876	133	4.54
	D10:300-3	2 G	125.62	130	4.647
	D10:300-3	3 B	143.168	145	3.706
pH = 9.23	D10:300-1	1 R	127.605	126	4.426
	D10:300-1	2 G	126.568	124	4.635
	D10:300-1	3 B	141.639	143	4.042
	D10:300-2	1 R	126.646	130	5.507
	D10:300-2	2 G	124.149	128	5.814
	D10:300-2	3 B	140.153	142	4.295
	D10:300-3	1 R	130.572	133	3.969
	D10:300-3	2 G	128.59	131	3.781
	D10:300-3	3 B	143.256	145	3.4

Gráficas de los resultados de la muestra M3 a diferentes diluciones



Figura 54. Grafica M3-PH2.06-D10.100



Figura 55. Grafica M3-PH2.06-D10.200



Figura 56. Grafica M3-PH2.06-D10.300

Anexo 2. pH – PAD

Tabla 23

Resultados de la sonda a distintos buffers

pH - PAD

pH	R		G		B	
	MEDIA	DS	MEDIA	DS	MEDIA	DS
1	156,543833	1,90506204	10,26733333	2,49272074	53,6935	3,42333917
1,41	152,909	5,47865005	11,55533333	2,30975546	59,5525	4,945214
3,92	103,2835	4,74231229	69,2056667	2,78862501	106,405167	2,29415173
4,5	101,173667	4,19630884	66,3776667	4,61601567	106,493833	5,28005104
5,15	96,8928333	6,9274016	80,163	7,12048327	100,537167	7,33627885
6,77	95,3364	2,98305494	79,373	2,89190327	98,7274	1,89797387
7	73,0363333	6,69860832	85,5885	6,22369208	94,1868333	7,21745976

Tabla 24

Resultados optimizados de la sonda a distintos buffers

DE-RGB-7	DE-RG
40,9464074	112,457906
34,8761271	108,906164
12,8419021	34,3989581
12,6612944	34,0700109
6,41742271	24,4656625
6,74706597	23,1500629
0	0

Tabla 25
Resultados RGB disgregados de la sonda a distintos buffers

			MEDIA	MODA	D.S.
pH=1	r1	1 R	155.595	155	2.787
		2 G	13.736	12	3.108
		3 B	57.272	56	3.481
		1 R	156.906	157	1.564
		2 G	11.995	12	1.201
		3 B	55.995	56	1.777
	r2	1 R	156.274	156	1.537
		2 G	10.687	10	1.706
		3 B	54.485	53	1.964
		1 R	153.631	154	1.691
		2 G	8.944	9	1.712
		3 B	50.521	50	2.177
pH=1.41	r1	1 R	159.281	160	1.924
		2 G	9.688	10	1.678
		3 B	55.385	56	1.606
		1 R	157.576	157	2.055
		2 G	6.554	6	2.323
		3 B	48.503	46	2.909
	r2	1 R	153.018	153	1.922
		2 G	13.632	14	1.884
		3 B	63.5	63	2.615
		1 R	156.611	156	1.535
		2 G	11.97	12	1.232
		3 B	62.704	63	1.516
r1	1 R	158.85	159	1.468	
	2 G	9.323	9	1.334	
	3 B	58.028	57	2.138	
	1 R	155.242	155	1.67	
	2 G	14.74	15	1.876	
	3 B	64.982	65	1.754	
r2	1 R	143.505	144	1.69	
	2 G	10.587	11	1.698	
	3 B	55.536	56	2.168	
	1 R	150.228	150	1.892	
	2 G	9.08	9	1.847	
	3 B	52.565	51	2.485	

pH=3.92	r1	1 R	94.821	95	2.455
		2 G	68.008	68	2.418
		3 B	103.024	103	2.298
		1 R	109.186	110	1.838
		2 G	73.541	75	2.081
		3 B	108.86	109	1.5
	r2	1 R	104.392	104	1.474
		2 G	67.919	68	1.626
		3 B	107.248	107	1.543
		1 R	102.371	102	1.524
		2 G	66.057	66	1.682
		3 B	104.165	104	1.527
pH=4.5	r1	1 R	105.22	106	1.715
		2 G	71.621	72	1.531
		3 B	108.03	108	1.435
		1 R	103.711	105	2.279
		2 G	68.088	69	3.096
		3 B	107.104	107	2.271
	r2	1 R	105.421	105	1.931
		2 G	69.951	71	1.873
		3 B	113.189	113	2.008
		1 R	103.387	105	1.793
		2 G	71.298	73	1.799
		3 B	112.032	112	1.592
r1	1 R	96.322	98	2	
	2 G	68.137	70	2.199	
	3 B	106.137	108	2.199	
	1 R	95.497	95	1.948	
	2 G	59.234	58	2.566	
	3 B	99.193	99	2.12	
r2	1 R	103.939	104	1.776	
	2 G	67.125	68	2.341	
	3 B	104.218	105	1.675	
	1 R	102.476	103	1.815	
	2 G	62.521	62	1.508	
	3 B	104.194	104	1.502	

pH=5.15	r1	1 R	102.654	102	2.467
		2 G	84.047	83	2.439
		3 B	106.986	106	2.2
		1 R	99.354	99	1.572
		2 G	81.276	81	1.459
		3 B	103.203	103	1.636
	r2	1 R	105.952	106	1.464
		2 G	91.466	91	1.453
		3 B	110.151	109	1.84
		1 R	94.686	94	2.056
		2 G	78.197	77	1.693
		3 B	96.997	98	1.53
pH=6.77	r1	1 R	89.096	89	1.284
		2 G	74.185	73	1.418
		3 B	92.709	92	1.25
		1 R	89.615	90	1.783
		2 G	71.807	72	1.87
		3 B	93.177	94	1.793
	r2	1 R	99.78	98	2.626
		2 G	81.399	81	2.017
		3 B	101.729	102	2.311
		1 R	93.28	93	1.696
		2 G	75.677	76	1.628
		3 B	96.835	97	1.797
r1	1 R	93.556	94	1.791	
	2 G	78.399	79	1.675	
	3 B	97.399	98	1.675	
	1 R	97.066	97	1.45	
	2 G	83.066	83	1.45	
	3 B	98.715	98	1.828	
r2	1 R	93	94	2.339	
	2 G	78.324	79	2.624	
	3 B	98.959	99	2.276	

pH=7	r1	1 R	80.059	81	1.639
		2 G	91.175	91	1.815
		3 B	101.801	102	1.601
		1 R	78.018	78	1.473
		2 G	91.948	92	1.346
		3 B	99.476	100	1.325
	r2	1 R	76.169	76	1.789
		2 G	88.247	88	1.622
		3 B	100.109	100	1.589
		1 R	62.747	63	2.201
		2 G	76.163	77	1.963
		3 B	85.136	86	1.93
		1 R	67.237	68	2.185
		2 G	80.479	81	1.719
		3 B	87.092	87	1.677
		1 R	73.988	75	2.19
		2 G	85.519	86	1.869
		3 B	91.507	92	1.879

Gráficas de la sonda a distintos buffers

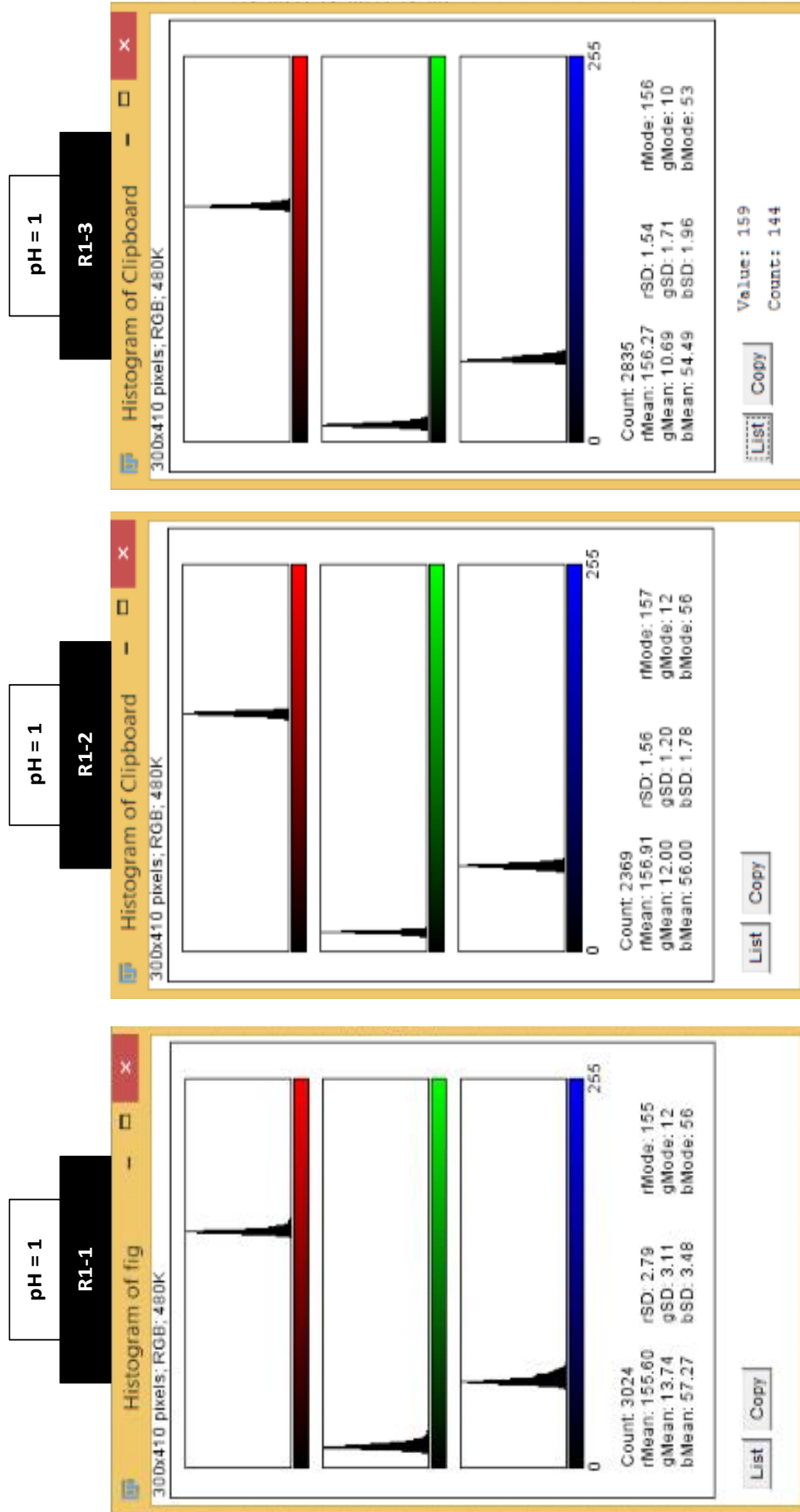


Figura 57. Grafica pH1



Figura 58. Grafica pH2.7



Figura 59. Grafica pH4



Figura 60. Grafica pH4.5

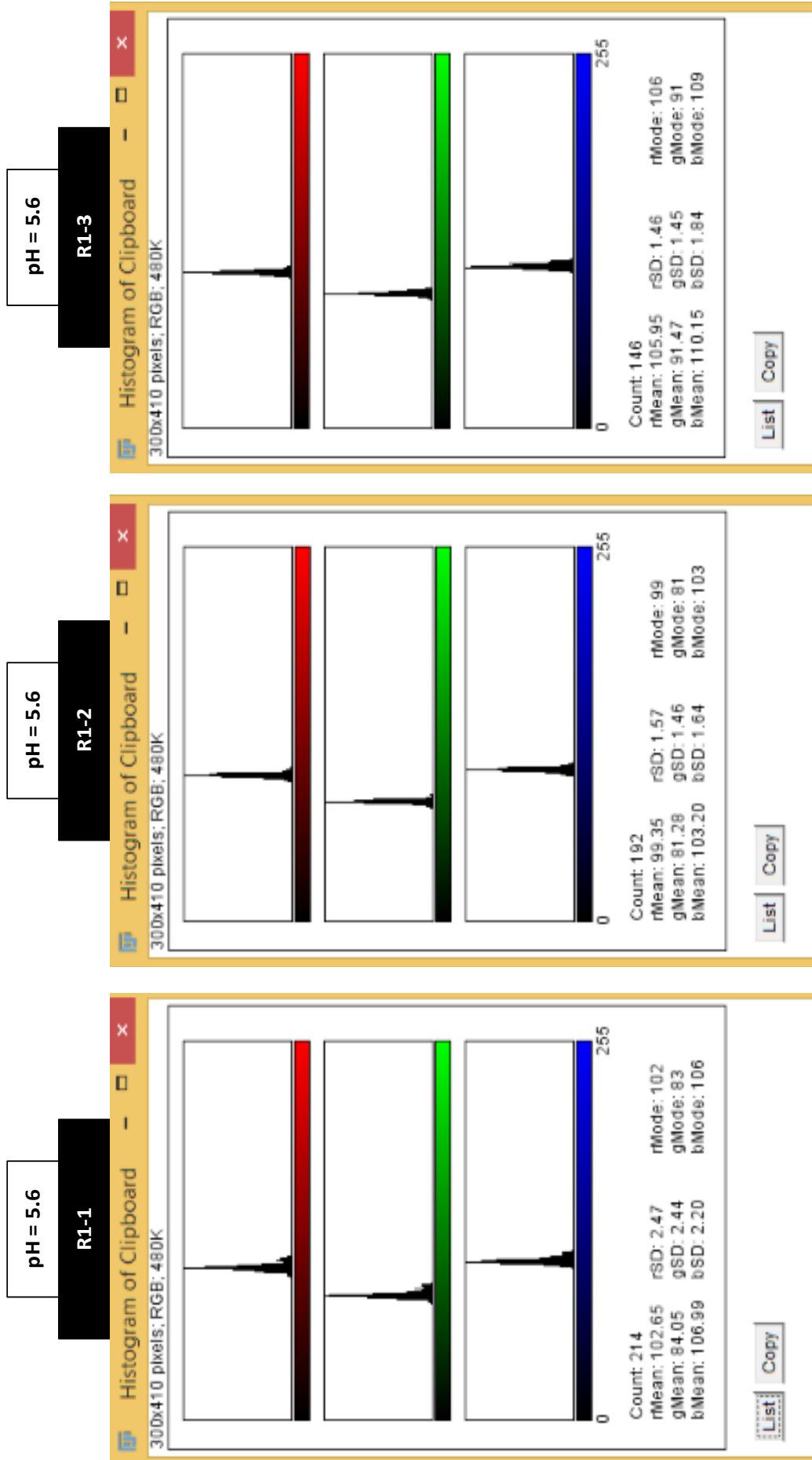


Figura 61. Grafica pH5.6



Figura 62. Grafica pH6.8



Figura 63. Grafica pH7

Anexo 3. PAD Alimentos

Tabla 26

Resultados RGB de la sonda con diferentes productos

**PAD-
ALIMENTOS**

	R		G		B	
	MEDIA	DS	MEDIA	DS	MEDIA	DS
A1	135,175833	3,55098879	30,2928333	7,5322302	84,1745	6,71006506
A2	132,4955	4,39947346	57,7336667	6,33283771	102,5375	4,72315398
A3	94,5155	1,90011523	79,4351667	1,94751703	107,755167	2,16202252
A5	126,431	1,99917893	63,3328333	7,43671706	106,7815	4,82799025
A6	117,6345	2,35514838	66,6508333	6,99003741	106,290167	4,41920017
A9	118,138833	5,73564157	66,4726667	4,61418576	107,449833	2,93446877
A10	112,012	3,30116773	74,7045	4,9185891	109,190833	3,18998661

Tabla 27

Resultados del pH de diferentes productos

Alimento (muestra)	pH instrumental
A1	2.35 2.39 2.36
A2	3.11 3.1 3.1
A3	4.16 4.19 4.2
A5	2.54 2.49 2.51
A6	3.03 3.02 3.04
A9	3.01 3.04 3.07
A10	3.29 3.32 3.29

Tabla 28
Resultados RGB de la sonda con diferentes productos

			MEDIA	MODA	D.S.
A1	r1	1 R	134.801	135	3.787
		2 G	38.61	39	4.436
		3 B	91.559	92	4.204
		1 R	137.63	137	3.765
		2 G	36.35	37	3.499
		3 B	88.782	90	3.519
	r2	1 R	133.653	133	5.527
		2 G	33.278	33	5.457
		3 B	87.324	87	5.448
		1 R	130.876	132	2.846
		2 G	31.249	32	2.806
		3 B	85.249	86	2.806
A2	r1	1 R	140.86	141	2.545
		2 G	21.489	23	2.602
		3 B	77.912	78	2.659
		1 R	133.235	134	3.44
		2 G	20.781	21	3.411
		3 B	74.221	76	3.443
	r2	1 R	131.942	132	2.932
		2 G	66.957	67	2.925
		3 B	109.47	109	2.866
		1 R	136.458	136	1.717
		2 G	63.415	63	1.671
		3 B	106.415	106	1.671
r1	1 R	130.545	129	2.729	
	2 G	57.226	57	2.573	
	3 B	103.331	103	2.591	
	r2	1 R	124.919	125	2.838
		2 G	54.559	54	2.692
		3 B	100.018	101	2.647
1 R		136.205	136	2.152	
2 G		49.901	49	2.652	
3 B		97.672	96	2.394	
r1	1 R	134.904	135	2.193	
	2 G	54.344	53	2.714	
	3 B	98.319	99	2.095	

A3	r1	1 R	96.762	97	1.559
		2 G	81.825	82	1.623
		3 B	110.645	111	1.539
		1 R	95.839	95	2.015
		2 G	81.402	81	2.147
		3 B	108.642	108	2.077
	r2	1 R	92.247	92	2.551
		2 G	77.84	76	2.798
		3 B	104.724	105	2.076
		1 R	93.12	90	4.394
		2 G	78.428	75	4.719
		3 B	109.236	108	3.842
A4	r1	1 R	93.121	93	1.911
		2 G	77.094	77	1.931
		3 B	106.209	106	1.892
		1 R	96.004	96	1.941
		2 G	80.022	80	1.939
		3 B	107.075	107	1.974
	r2	1 R	108.641	108	2.103
		2 G	72.833	72	2.049
		3 B	110.713	110	2.01
		1 R	113.154	113	2.413
		2 G	73.201	73	3.095
		3 B	112.493	112	2.541
r1	1 R	106.325	108	2.978	
	2 G	71.659	74	3.7	
	3 B	106.349	108	2.868	
	1 R	99.641	100	2.263	
	2 G	71.771	73	2.424	
	3 B	107.039	108	2.266	
r2	1 R	107.07	107	3.812	
	2 G	76.014	76	3.894	
	3 B	108.758	108	3.204	
	1 R	103.502	104	2.205	
	2 G	69.809	68	2.389	
	3 B	105.12	105	2.162	

A5	r1	1 R	127.618	127	5.953
		2 G	72.812	72	5.887
		3 B	113.233	114	5.761
		1 R	128.504	130	2.621
		2 G	57.282	58	2.545
		3 B	102.377	104	2.324
	r2	1 R	124.784	126	2.092
		2 G	58.773	58	2.551
		3 B	104.229	105	2.165
		1 R	128.56	130	8.329
		2 G	71.964	72	8.293
		3 B	112.436	113	8.142
A6	r1	1 R	124.684	123	3.42
		2 G	55.933	56	3.474
		3 B	102.832	103	3.344
		1 R	124.436	123	3.378
		2 G	63.233	61	4.129
		3 B	105.582	105	3.107
	r2	1 R	119.082	118	3.205
		2 G	76.902	76	3.412
		3 B	114.356	114	3.63
		1 R	116.131	116	2.442
		2 G	73.191	72	2.9
		3 B	106.82	107	2.505
r1	1 R	115.39	115	1.717	
	2 G	66.025	67	1.929	
	3 B	104.421	105	2.112	
	1 R	115.44	115	2.606	
	2 G	62.238	62	2.927	
	3 B	104.429	104	2.827	
r2	1 R	118.574	117	2.513	
	2 G	58.836	60	2.314	
	3 B	101.258	101	2.436	
	1 R	121.19	121	2.247	
	2 G	62.713	62	2.265	
	3 B	106.457	106	2.215	

A7	r1	1 R	113.475	113	1.769
		2 G	83.512	84	2.191
		3 B	118.021	118	1.816
		1 R	113.537	114	1.743
		2 G	78.799	78	1.771
		3 B	113.956	114	1.925
	r2	1 R	109.165	109	1.957
		2 G	75.494	75	2.027
		3 B	112.571	112	2.013
		1 R	102.912	103	1.728
		2 G	76.431	77	1.715
		3 B	110.298	110	2.053
A8	r1	1 R	104.657	105	2.635
		2 G	75.404	75	2.249
		3 B	107.217	107	2.223
		1 R	103.647	104	2.573
		2 G	74.11	74	2.685
		3 B	108.841	109	2.466
	r2	1 R	105.492	105	3.144
		2 G	76.588	78	3.359
		3 B	108.078	109	3.039
		1 R	110.501	110	1.802
		2 G	78.619	79	2.224
		3 B	110.915	111	2.003
r1	1 R	109.267	110	2.231	
	2 G	75.207	75	2.58	
	3 B	105.625	105	2.278	
	1 R	107.816	107	2.943	
	2 G	79.133	78	2.9	
	3 B	109.141	108	2.833	
r2	1 R	104.818	105	3.601	
	2 G	72.166	74	3.816	
	3 B	100.971	102	3.701	
	1 R	106.181	106	2.721	
	2 G	69.346	69	2.95	
	3 B	100.345	100	2.772	

A9	r1	1 R	114.23	114	2.993
		2 G	70.826	70	3.221
		3 B	106.465	106	3.066
		1 R	123.933	124	2.354
		2 G	68.804	68	2.659
		3 B	108.359	109	2.428
	r2	1 R	109.147	108	2.248
		2 G	61.787	61	2.578
		3 B	103.322	103	2.432
		1 R	117.049	117	2.984
		2 G	61.457	61	3.064
		3 B	105.867	105	2.986
A10	r1	1 R	122.291	123	2.406
		2 G	64.082	64	2.316
		3 B	108.766	109	2.19
		1 R	122.183	122	2.296
		2 G	71.88	72	2.909
		3 B	111.92	112	2.586
	r2	1 R	112.362	112	2.431
		2 G	78.053	79	2.309
		3 B	110.911	112	2.203
		1 R	116.757	116	2.704
		2 G	80.121	79	2.851
		3 B	113.721	113	2.715
r1	1 R	110.992	111	2.578	
	2 G	77.1	77	2.78	
	3 B	109.915	110	2.544	
	1 R	108.976	110	3.053	
	2 G	73.886	75	3.228	
	3 B	107.575	108	3.005	
r2	1 R	114.737	114	2.552	
	2 G	72.737	72	2.552	
	3 B	108.737	108	2.552	
	1 R	108.248	109	2.232	
	2 G	66.33	66	2.268	
	3 B	104.286	105	2.241	

Tabla 29
pH estimados

DE	pH estimado RGB	pH estimado R
83,780517	-6,492037122	2,361375033
66,189258	-3,689542456	2,573594616
26,1403478	2,690720445	5,580720507
59,2024557	-2,576462587	3,053760887
49,9411891	-1,101033787	3,75023753
50,7499533	-1,229879448	3,710306149
43,1588237	-0,020523134	4,195407759

Anexo 4. Análisis de Regresión R

Best-fit values	
Slope	-12.63 ± 1.763
Y-intercept when X=0.0	165.0 ± 8.428
X-intercept when Y=0.0	13.06
1/slope	-0.07915
95% Confidence Intervals	
Slope	-17.17 to -8.101
Y-intercept when X=0.0	143.3 to 186.7
X-intercept when Y=0.0	10.64 to 18.09
Goodness of Fit	
R square	0.9113
Sy.x	10.21
Is slope significantly non-zero?	
F	51.35
DFn, DFd	1.000, 5.000
P value	0.0008
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	7
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	7
Number of missing values	0
Runs test	
Points above line	3
Points below line	4
Number of runs	4
P value (runs test)	0.5429
Deviation from linearity	Not Significant
Equation	$Y = -12.63 * X + 165.0$

Anexo 5. Análisis de regresión para G

Best-fit values	
Slope	12.98 ± 2.031
Y-intercept when X=0.0	2.341 ± 9.707
X-intercept when Y=0.0	-0.1804
1/slope	0.07704
95% Confidence Intervals	
Slope	7.759 to 18.20
Y-intercept when X=0.0	-22.62 to 27.30
X-intercept when Y=0.0	-3.369 to 1.298
Goodness of Fit	
R square	0.8910
Sy.x	11.76
Is slope significantly non-zero?	
F	40.85
DFn, DFd	1.000, 5.000
P value	0.0014
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	7
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	7
Number of missing values	0
Runs test	
Points above line	3
Points below line	4
Number of runs	3
P value (runs test)	0.2000
Deviation from linearity	Not Significant
Equation	$Y = 12.98 * X + 2.341$

Anexo 6. Análisis de regresión para B

Best-fit values	
Slope	7.343 ± 2.640
Y-intercept when X=0.0	57.30 ± 12.62
X-intercept when Y=0.0	-7.804
1/slope	0.1362
95% Confidence Intervals	
Slope	0.5566 to 14.13
Y-intercept when X=0.0	24.86 to 89.75
X-intercept when Y=0.0	-155.0 to -1.831
Goodness of Fit	
R square	0.6075
Sy.x	15.28
Is slope significantly non-zero?	
F	7.739
DFn, DFd	1.000, 5.000
P value	0.0388
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	7
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	7
Number of missing values	0
Runs test	
Points above line	3
Points below line	4
Number of runs	3
P value (runs test)	0.2000
Deviation from linearity	Not Significant
Equation	Y = 7.343*X + 57.30

Anexo 7. Análisis de regresión para DE-RGB

Best-fit values	
Slope	-6.277 ± 0.8157
Y-intercept when X=0.0	43.03 ± 3.899
X-intercept when Y=0.0	6.856
1/slope	-0.1593
95% Confidence Intervals	
Slope	-8.374 to -4.180
Y-intercept when X=0.0	33.01 to 53.06
X-intercept when Y=0.0	5.933 to 8.433
Goodness of Fit	
R square	0.9221
Sy.x	4.723
Is slope significantly non-zero?	
F	59.21
DFn, DFd	1.000, 5.000
P value	0.0006
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	7
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	7
Number of missing values	0
Runs test	
Points above line	4
Points below line	3
Number of runs	3
P value (runs test)	0.2000
Deviation from linearity	Not Significant
Equation	Y = -6.277*X + 43.03

Anexo 8. Análisis de regresión para DE-RG

Best-fit values	
Slope	-17.82 ± 2.535
Y-intercept when X=0.0	123.9 ± 12.12
X-intercept when Y=0.0	6.956
1/slope	-0.05613
95% Confidence Intervals	
Slope	-24.33 to -11.30
Y-intercept when X=0.0	92.77 to 155.1
X-intercept when Y=0.0	5.943 to 8.804
Goodness of Fit	
R square	0.9081
Sy.x	14.68
Is slope significantly non-zero?	
F	49.39
DFn, DFd	1.000, 5.000
P value	0.0009
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	7
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	7
Number of missing values	0
Runs test	
Points above line	4
Points below line	3
Number of runs	3
P value (runs test)	0.2000
Deviation from linearity	Not Significant
Equation	$Y = -17.82 * X + 123.9$

Anexo 9. Análisis de regresión entre el pH estimado y el pH instrumental

Best-fit values	
Slope	1.654 ± 0.3720
Y-intercept when X=0.0	-1.485 ± 1.163
X-intercept when Y=0.0	0.8978
1/slope	0.6046
95% Confidence Intervals	
Slope	0.6975 to 2.610
Y-intercept when X=0.0	-4.474 to 1.504
X-intercept when Y=0.0	-2.129 to 1.736
Goodness of Fit	
R square	0.7981
Sy.x	0.5391
Is slope significantly non-zero?	
F	19.77
DFn, DFd	1.000, 5.000
P value	0.0067
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	7
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	7
Number of missing values	0
Equation	Y = 1.654*X - 1.485

Anexo 10. Análisis de correlación entre el pH estimado y el pH instrumental

Pearson r	
R	0.8934
95% confidence interval	0.4286 to 0.9843
R square	0.7981
P value	
P (two-tailed)	0.0067
P value summary	**
Significant? (alpha = 0.05)	Yes
Number of XY Pairs	
	7