

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Tema: “Efecto del ozono gaseoso sobre la actividad antioxidante, los azúcares y los compuestos bioactivos de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth)”

Trabajo de Investigación, previo a la obtención del Grado Académico de Magíster en
Tecnología de Alimentos

Autor: Ing. Rodolfo Abelardo López Salazar

Directora: Ph.D. Sandra Horvitz Szoiche

Ambato – Ecuador

Junio - 2018

A la Unidad Académica de Titulación de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

El Tribunal receptor del Trabajo de Investigación , presidido por Doctora Jacqueline de las Mercedes Ortiz Escobar e integrado por las Señoras: Ingeniera Dolores del Rocío Robalino Martínez Magíster, Ingeniera Mirari Yosune Arancibia Soria Doctora designados por la Unidad Académica de Titulación de Posgrado de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato, para receptor el trabajo de Investigación con el tema: “Efecto del ozono gaseoso sobre la actividad antioxidante, los azúcares y los compuestos bioactivos de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth)”, elaborado y presentado por el señor Ingeniero Rodolfo Abelardo López Salazar, para optar por el Grado Académico de Magíster en Tecnología de Alimentos ; una vez escuchada la defensa oral del Trabajo de Investigación, el Tribunal aprueba y remite el trabajo para uso y custodia en las bibliotecas de la UTA.



Dra. Jacqueline de las Mercedes Ortiz Escobar
Presidenta del Tribunal



Ing. Dolores del Rocío Robalino Martínez, Mg.
Miembro del Tribunal



Ing. Mirari Yosune Arancibia Soria, Dra.
Miembro del Tribunal

AUTORÍA DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

La responsabilidad de las opiniones, comentarios y críticas emitidas en el Trabajo de Investigación presentado con el tema: “Efecto del ozono gaseoso sobre la actividad antioxidante, los azúcares y los compuestos bioactivos de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth)” le corresponde exclusivamente a: Ingeniero Rodolfo Abelardo López Salazar, Autor bajo dirección de Sandra Horvitz Szoichet, Ph.D., Directora del trabajo de investigación; y el patrimonio intelectual a la Universidad Técnica de Ambato.



Ing. Rodolfo Abelardo López Salazar

c.c. 1714925326

AUTOR



Ph.D. Sandra Horvitz Szoichet

c.c. 1756947642

DIRECTORA

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que el Trabajo de Investigación, sirva como documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigaciones, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos de mi trabajo de Investigación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de éste documento, dentro de las regulaciones de la Universidad.



Ing. Rodolfo Abelardo López Salazar

c.c. 1714925326

AUTOR

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA.....	i
Autoría del trabajo de investigación	iii
Derechos de autor.....	iv
Índice De Contenidos	v
Índice de Tablas.....	viii
Indice de Figuras	viii
Agradecimiento.....	ix
Dedicatoria.....	x
Resumen Ejecutivo.....	xi
Introducción	13
CAPÍTULO I	14
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	14
1.1. Tema de investigación.....	14
1.2. Planteamiento del problema	14
1.2.1. Contextualización.....	14
1.2.2. Análisis Crítico.....	15
1.2.3. Prognosis	16
1.2.4. Formulación del problema	16
1.2.5. Interrogantes (subproblemas).....	16
1.2.6. Delimitación del objeto de investigación	16
1.3. Justificación.....	17
1.4. Objetivos	18
1.4.1. General	18
1.4.2. Específicos	18
CAPÍTULO II	19
MARCO TEÓRICO.....	19
2.1. Antecedentes investigativos	19
2.2. Fundamentación filosófica	20
2.3. Fundamentación legal	20
2.4. Categorías fundamentales	21
2.5. Hipótesis.....	21

2.5.1.	Hipótesis alterna.....	21
2.5.2.	Hipótesis nula.....	21
2.6.	Señalamiento de las variables	22
2.6.1.	Variables independientes.....	22
2.6.2.	Variables dependientes.....	22
CAPÍTULO III		23
METODOLOGÍA.....		23
3.1.	Enfoque Investigativo	23
3.2.	Modalidad básica de la investigación.....	23
3.2.1.	Investigación bibliográfica documental	23
3.2.2.	Investigación de campo.....	23
3.2.3.	Investigación experimental.....	23
3.3.	Nivel o tipo de investigación.....	24
3.3.1.	Exploratoria.....	24
3.3.2.	Descriptiva	24
3.3.3.	Explicativa.....	24
3.4.	Población y muestra	24
3.5.	Operacionalización de variables.....	25
3.5.1.	Variable independiente.....	25
3.5.2.	Variable dependiente.....	26
3.6.	Plan de recolección de información	27
3.6.1.	Materiales y métodos	27
3.6.2.	Análisis químicos	28
3.7.	Plan de procesamiento de la información.....	31
CAPÍTULO IV		32
ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS		32
4.1.	Análisis e interpretación de resultados.....	32
4.1.1.	Ácido ascórbico.....	32
4.1.2.	Antocianinas.....	33
4.1.3.	Azúcares	35
4.1.4.	Polifenoles y actividad antioxidante.....	36
4.2.	Verificación de hipótesis	38
4.2.1.	Modelo Lógico	38

4.2.2.	Modelo Matemático	38
4.2.3.	Modelo Estadístico	39
4.2.4.	Conclusión.....	39
CAPÍTULO V		40
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		40
5.1.	Conclusiones	40
5.2.	Recomendaciones	40
CAPÍTULO VI		41
LA PROPUESTA		41
6.1.	Datos Informativos	41
6.2.	Antecedentes de la propuesta	41
6.3.	Justificación	42
6.4.	Objetivos	42
6.4.1.	Objetivo General	42
6.4.2.	Objetivos Específicos	42
6.5.	Análisis de la factibilidad	43
6.6.	Fundamentación científico técnica	43
6.7.	Metodología	44
6.8.	Modelo Operativo de la propuesta	47
6.9.	Administración de la propuesta	48
6.10.	Previsión de la evaluación de la propuesta	49
MATERIALES DE REFERENCIA		50
ANEXOS		53
	Anexo 1. Fotografías del trabajo experimental de laboratorio.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de la variable independiente.....	25
Tabla 2. Operacionalización de la variable dependiente.....	26
Tabla 3. Contenido de ácido ascórbico (mg/100 MF) en moras de Castilla control y tratadas con ozono durante 10 días de almacenamiento refrigerado (6 ± 1 °C).....	32
Tabla 4. Contenido de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) en moras de Castilla control y tratadas con 0,4; 0,5; 0,6 y 0,7 ppm de ozono.....	35
Tabla 5. Polifenoles y actividad antioxidante en moras de Castilla control y tratadas con 0,4; 0,5; 0,6 y 0,7 ppm de ozono.....	37
Tabla 6. Costos de investigación.....	43
Tabla 7. Modelo Operativo de la propuesta.....	47
Tabla 8. Administración de la propuesta.....	48
Tabla 9. Previsión de la evaluación de la propuesta.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol del problema.....	15
Figura 2. Categorías fundamentales de las variables dependientes e independientes.....	21
Figura 3. Antocianinas (mg/100 MF) de moras de Castilla control y tratadas con ozono durante 10 días de almacenamiento refrigerado (6 ± 1 °C).....	34

AGRADECIMIENTO

A Dios por haberme dado fortaleza y sabiduría para poder culminar con uno más de mis anhelados objetivos

A la Universidad Técnica de Ambato en especial a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos que me ha permitido culminar mis estudios.

A todos mis catedráticos que a lo largo de mi carrera, compartieron sus conocimientos, experiencias e inteligentes consejos que ayudaron en mi formación académica.

A la Doctora Sandra Horvitz (tutora), por toda su profesionalismo, paciencia, entrega, confianza y su apoyo incondicional depositado en mí para culminar con éxito mi meta.

A mis compañeros de aula por su apoyo incondicional, por las alegrías, las penas, las risas, por todos los momentos que pasamos juntos y que nunca se borrarán de mi mente los recordaren siempre con mucho cariño y aprecio.

Rodolfo

DEDICATORIA

El actual trabajo está dedicado en primer lugar a mi Amada Esposa Patricia Coello por haberme brindado todo su apoyo incondicional durante esta dura pero fructífera travesía y a mis dos bellos hijos Rodolfo y Patricio, quienes han tenido que sacrificarse al no poder compartir muchos fines de semana con su padre quien los ama mucho.

Con cariño y mucho amor.

Rodolfo

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

TEMA:

“Efecto del ozono gaseoso sobre la actividad antioxidante, los azúcares y los compuestos bioactivos de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth)”

AUTOR: Ing. Rodolfo Abelardo López Salazar

DIRECTORA: Ph.D. Sandra Horvitz Szoichet

FECHA: 27 abril 2018

RESUMEN EJECUTIVO

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto del ozono gaseoso sobre la actividad antioxidante, los azúcares y los compuestos bioactivos de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth).

Las concentraciones de ozono gaseoso evaluadas fueron de 0,4; 0,5; 0,6 y 0,7 ppm por un periodo de tres minutos. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento. La actividad antioxidante y el contenido de antocianinas, polifenoles totales, ácido ascórbico y azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) fueron evaluados en los días 1, 4, 7, y 10 de almacenamiento refrigerado ($6 \pm 1^{\circ}\text{C}$), utilizando muestras previamente liofilizadas.

Se pudo concluir que independientemente de las concentraciones utilizadas, el tratamiento postcosecha con ozono gaseoso afectó de manera positiva y negativa, debido a que en algunos casos se observaron incrementos y en otra reducción de los compuestos en estudio.

Descriptores: Ozono gaseoso, actividad antioxidante, azúcares, compuestos bioactivos, mora de Castilla, manejo postcosecha, conservación de alimentos, glúcidos, almacenamiento, ácido ascórbico.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

THEME:

“Efecto del ozono gaseoso sobre la actividad antioxidante, los azúcares y los compuestos bioactivos de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth)”

AUTHOR: Ing. Rodolfo Abelardo López Salazar

DIRECTED BY: Ph.D. Sandra Horvitz Szoichet

DATE: 27 april 2018

EXECUTIVE SUMMARY

The objective of the present research work was to evaluate the effect of gaseous ozone on antioxidant activity, sugars and bioactive compounds of Castile blackberries (*Rubus glaucus* Benth).

The ozone gas concentrations evaluated were 0,4 ; 0,5 ; 0,6 and 0,7 ppm for a period of three minutes. Three repetitions were performed per treatment. The antioxidant activity, and the content of anthocyanins, total polyphenols, ascorbic acid and sugars (glucose, fructose and sucrose) were evaluated on days 1, 4, 7, and 10 of refrigerated storage at $6 \pm 1^{\circ}\text{C}$, using previously lyophilized samples.

From the results obtained it was possible to conclude that regardless of the concentrations used, post-harvest treatment with gaseous ozone affected positively and negatively because in some cases an increase was observed and in others reduction and compounds in study.

Keywords: Gaseous ozone, antioxidant activity, sugars, bioactive compounds, Castile blackberries, post-harvest quality, food preservation, glucides, ascorbic acid, storage.

INTRODUCCIÓN

La mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) es considerada como una planta arbustiva, perenne, perteneciente a la familia de las rosáceas. Su fruto está conformado por pequeñas drupas adheridas que van cambiando la tonalidad de blanco a rojo y finalmente a negro brillante a medida que se acerca la cosecha (NTE INEN, 2010). Esta fruta es rica en compuestos fenólicos, tales como ácidos fenólicos, taninos, estilbenos, flavonoides y antocianinas por lo cual su ingestión tiene un impacto positivo y profundo en la salud humana (De Souza et al., 2014).

El 41% de la producción de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) de Ecuador se encuentra en la provincia de Tungurahua, mientras que las provincias de Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha, Imbabura y Carchi representan en conjunto el 59% restante del total de la producción (MAGAP, 2013).

Debido a que las moras son frutas no climatéricas deben cosecharse en plena madurez pero en esta etapa son más susceptibles a sufrir daños físicos y microbiológicos provocando que su vida útil sea muy corta (Horvitz, Chanaguano, & Arozarena, 2017).

En postcosecha, el ozono se puede aplicar en forma gaseosa o disuelto en agua. Los principales efectos de la aplicación de ozono son la inactivación de crecimiento microbiano, la destrucción de pesticidas y residuos químicos y el control de plagas del almacenamiento (Öztekin et al., 2006). Además, la FDA lo ha reconocido como sustancia segura (GRAS) por lo que ha aumentado el interés para su aplicación en la industria de alimentos. Existen muchos estudios de tratamientos de frutas con ozono, sin embargo, la información para el caso de moras es escasa y la existente se enfoca principalmente en su efecto sobre la calidad microbiológica de la fruta por lo que es necesario estudiar también los efectos de este gas sobre la actividad antioxidante y los compuestos bioactivos de la fruta tratada.

CAPÍTULO I

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Tema de investigación

“Efecto del ozono gaseoso sobre la actividad antioxidante, los azúcares y los compuestos bioactivos de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth)”

1.2. Planteamiento del problema

Las pérdidas de calidad postcosecha provocan una disminución en el valor comercial de las moras y las causas principales de estas pérdidas son desórdenes fisiológicos, daños físicos y daños patológicos (Brito Grandes et al., 2016).

Los daños fisiológicos son producidos por un aumento de la tasa de respiración debido a que habitualmente no se usa refrigeración durante el almacenamiento mientras que los daños físicos son provocados durante la manipulación, el empaque y el transporte de la fruta. Finalmente, los daños patológicos son provocados por bacterias y hongos, principalmente por *Botrytis cinérea*, agente causal de la podredumbre gris (Brito Grandes et al., 2016).

1.2.1. Contextualización

La mora es una planta nativa de los Andes que en la actualidad se produce en todos los continentes del mundo, con una producción aproximada de 154578 toneladas anuales (Kaume, Howard, & Devareddy, 2012). Estados Unidos, con más de 3500 ha, y Europa, con más de 5000 ha, son los productores más importantes del mundo en el mercado de procesados mientras que Chile es uno de los productores más importantes para el mercado de fruta fresca (Clark & Finn, 2014). En Ecuador se han reportado cerca de 5000 ha destinadas a producción de mora, distribuidas en pequeños y medianos productores de la

serranía, en las provincias de Tungurahua, Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha, Imbabura y Carchi (MAGAP, 2013).

1.2.2. Análisis Crítico

Los principales factores que aceleran el deterioro de las moras son la susceptibilidad a ataques microbianos, su fragilidad y la susceptibilidad a daños mecánicos, convirtiéndose en una de las limitantes para los agricultores al momento de la cosecha y comercialización. El tratamiento con ozono podría ser una alternativa para reducir el ataque de hongos y prolongar su vida útil, frenando el impacto negativo que enfrentan los agricultores de mora de Castilla.

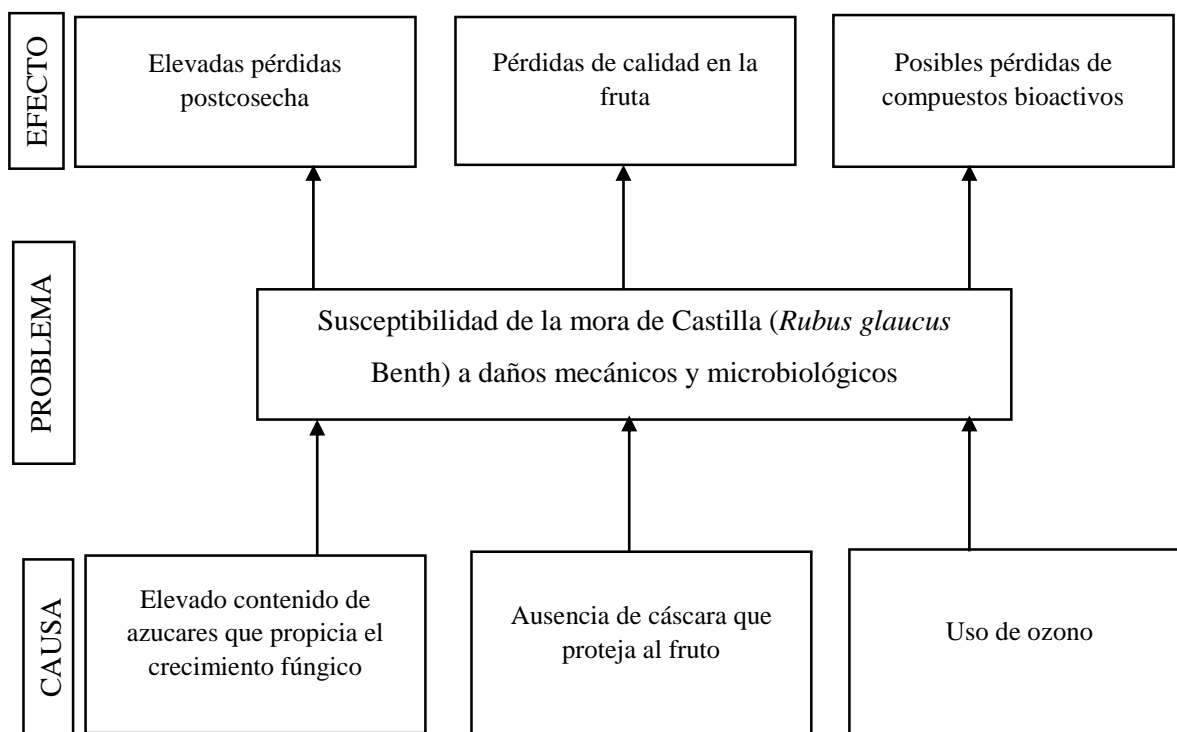


Figura 1. Árbol del problema

1.2.3. Prognosis

Si no se llega a realizar el presente trabajo de investigación y no damos a conocer los resultados de cómo afecta el ozono gaseoso a la actividad antioxidante, los azúcares y los compuestos bioactivos de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) se estaría negando la oportunidad de aprovechar compuestos nutricionales, metabolitos secundarios que confieren color y sabor característico y algunos compuestos como flavonoides, especialmente antocianinas, que son compuestos antioxidantes de gran interés para la alimentación humana.

1.2.4. Formulación del problema

¿Cómo incide el tratamiento postcosecha con ozono gaseoso sobre la actividad antioxidante, los azúcares y los compuestos bioactivos de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) durante el almacenamiento?

1.2.5. Interrogantes (subproblemas)

- ¿Cuál será la dosis de ozono gaseoso más efectiva para su aplicación en postcosecha de moras?
- ¿Cuál será la evolución de la actividad antioxidante, los azúcares y los compuestos bioactivos de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) durante el almacenamiento refrigerado?

1.2.6. Delimitación del objeto de investigación

- **Área:** Agroindustrial
- **Sub-área:** Alimentos
- **Sector:** Industrial

- **Delimitación Espacial:** el estudio se desarrolló en los laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.
- **Delimitación temporal:** Enero - Abril 2018.

1.3. Justificación

El 41% de la producción de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) de Ecuador se encuentra en la provincia de Tungurahua, mientras que las provincias de Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha, Imbabura y Carchi representan en conjunto el 59% restante del total de la producción (MAGAP, 2013). El cultivo de mora es una fuente de ocupación rural rentable para los agricultores de la zona, por tener acogida en el mercado nacional e internacional por su aroma, su sabor ligeramente dulce y por ser una fruta rica en minerales y vitaminas (Damely & Méndez, 2008).

Debido a que las moras son frutas no climatéricas deben cosecharse en plena madurez pero en esta etapa son más susceptibles a sufrir daños físicos y microbiológicos provocando que su vida útil sea muy corta (Horvitz, Chanaguano, & Arozarena, 2017).

El ozono (O₃) se ha utilizado durante décadas como agente desinfectante en plantas de tratamiento de agua en Europa y hoy en día se usa también como gas o agua ozonizada para tratamientos postcosecha de frutas y hortalizas. Asimismo, es utilizado en el almacenamiento de alimentos para evitar la proliferación de agentes microbianos (Pérez, Sanz, Ríos, Olías, & Olías, 1999).

Si bien existen muchos estudios de tratamientos de frutas con ozono, la información para el caso de moras es escasa y la existente se enfoca principalmente en su efecto sobre la calidad microbiológica de la fruta por lo que es necesario estudiar también los efectos de este gas sobre la actividad antioxidante los azúcares y los compuestos bioactivos de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) durante el almacenamiento de la fruta tratada.

1.4. Objetivos

1.4.1. General

Evaluar el efecto del ozono gaseoso sobre la actividad antioxidante, los azúcares y los compuestos bioactivos de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth).

1.4.2. Específicos

- Evaluar el efecto de la aplicación postcosecha de ozono sobre la actividad antioxidante de mora de Castilla.
- Evaluar el efecto de la aplicación postcosecha de ozono sobre el contenido de antocianinas de mora de Castilla.
- Evaluar el efecto de la aplicación postcosecha de ozono sobre el contenido de polifenoles totales de mora de Castilla.
- Estudiar el efecto de la aplicación postcosecha de ozono sobre el contenido de ácido ascórbico de mora de Castilla.
- Evaluar el efecto de la aplicación postcosecha de ozono sobre el contenido de azúcares de mora de Castilla.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos

La mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) es considerada como una planta arbustiva, perenne, perteneciente a la familia de las rosáceas. Su fruto está conformado por pequeñas drupas adheridas que van cambiando la tonalidad de blanco a rojo y finalmente a negro brillante a medida que se acerca la cosecha (NTE INEN, 2010). Las moras son bayas muy frágiles por su alta tasa de respiración una vez que han sido cosechadas, lo que contribuye a su deterioro nutricional y microbiológico, limitando su vida útil a un periodo de 3 a 5 días a temperatura ambiente (Wu, Frei, Kennedy, & Zhao, 2010).

Estas frutas son ricas en compuestos fenólicos, tales como ácidos fenólicos, taninos, estilbenos, flavonoides y antocianinas por lo cual su ingestión tiene un impacto positivo y profundo en la salud humana (de Souza et al., 2014). Los compuestos bioactivos de estas frutas son utilizados en la prevención de enfermedades degenerativas y en la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares y de ciertas formas de cáncer (Ali, Svensson, Alsanius, & Olsson, 2011; Joshipura et al., 2001; Tiwari, O'Donnell, Patras, Brunton, & Cullen, 2009). Además, las antocianinas tienen gran importancia en la industria de alimentos ya que se las puede utilizar como sustitutos de colorantes sintéticos (Acosta-Montoya et al., 2010).

Los objetivos principales de aplicar técnicas de postcosecha son mantener la calidad y reducir las pérdidas entre la recolección y el consumo. Frente a la peligrosidad de los agentes químicos utilizados habitualmente, el ozono ofrece una serie de ventajas: gran capacidad desinfectante, uso autorizado en alimentos, extensión de la vida útil en alimentos y ausencia de impacto ambiental (Pérez et al., 1999).

En postcosecha, el ozono se puede aplicar en forma gaseosa o disuelto en agua. Los principales efectos de la aplicación de ozono son la inactivación de crecimiento

microbiano, la destrucción de pesticidas y residuos químicos y el control de plagas de almacenamiento (Öztekin et al., 2006). Además, la FDA lo ha reconocido como sustancia segura (GRAS) por lo que ha aumentado el interés para su aplicación en la industria de alimentos.

2.2. Fundamentación filosófica

La presente investigación se sitúa en el paradigma crítico propositivo, el criterio filosófico fundamental que lo rige está básicamente encaminado a la búsqueda de alternativas de tratamiento con ozono en moras de Castilla con la finalidad de prolongar el tiempo de vida útil y de mantener las características nutricionales y sensoriales de la fruta, hecho que permitirá a las empresas comercializadoras y procesadoras garantizar su frescura en percha y extender los días durante la comercialización y almacenamiento de las mismas. También por sus características nutricionales y compuestos antioxidantes se puede lograr diversificar sus productos, incrementando sus ventas y a la vez logrando un crecimiento en el ámbito competitivo.

2.3. Fundamentación legal

En la presente investigación se tendrá en cuenta la NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 2427 que establece los requisitos de calidad de la mora de Castilla.

2.4. Categorías fundamentales

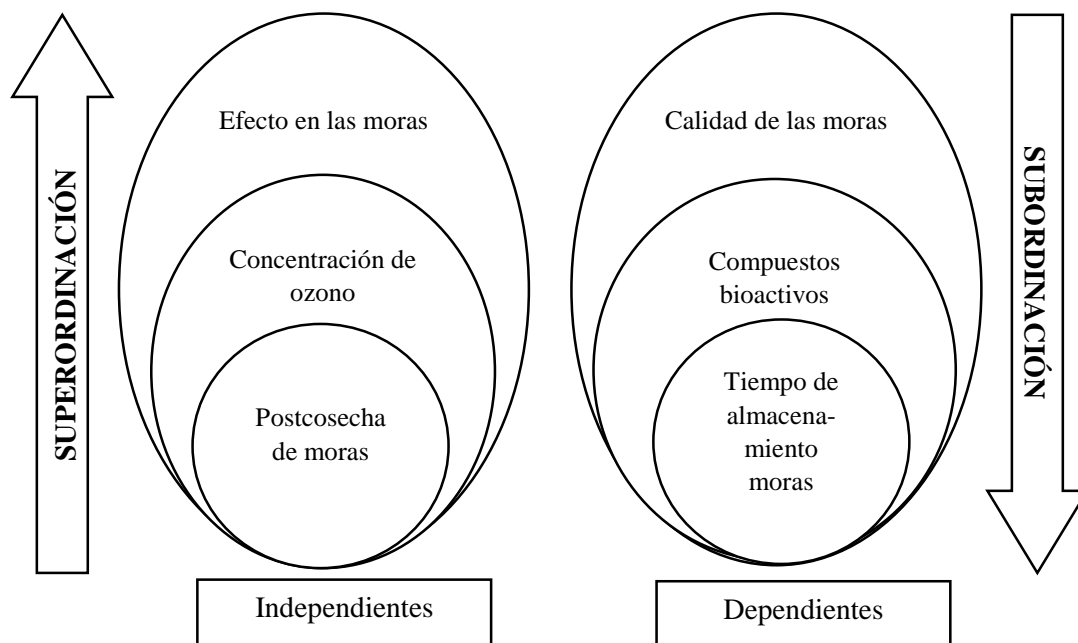


Figura 2. Categorías fundamentales de las variables dependientes e independientes

Para estudiar el efecto del ozono sobre la composición de las moras se efectuarán análisis químicos para determinar la actividad antioxidante y el contenido de antocioninas, vitamina C, polifenoles y azúcares.

2.5. Hipótesis

2.5.1. Hipótesis alterna

Hi: El uso de ozono gaseoso afecta la actividad antioxidante, los azúcares y los compuestos bioactivos de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth)

2.5.2. Hipótesis nula

Ho: El uso de ozono gaseoso no afecta la actividad antioxidante, los azúcares ni los compuestos bioactivos de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth)

2.6. Señalamiento de las variables

2.6.1. Variables independientes

- Concentraciones de ozono

2.6.2. Variables dependientes

- Actividad antioxidante
- Contenido de antocianinas
- Contenido de polifenoles
- Contenido de ácido ascórbico
- Contenido de azúcares

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1. Enfoque Investigativo

La presente investigación está bajo el *Paradigma Cuantitativo* ya que se utilizó estadística inferencial para levantar información a través de un diseño experimental. Además, también tiene inferencia del *Paradigma Cualitativo*, debido a que se realizó el análisis e interpretación de la información procesada.

3.2. Modalidad básica de la investigación

3.2.1. Investigación bibliográfica documental

En el desarrollo de la presente investigación se hizo una búsqueda amplia en bases de datos de investigaciones científicas de las que se seleccionaron las más relevantes de acuerdo al tema de investigación planteado.

3.2.2. Investigación de campo

El trabajo de campo se realizó en el cantón Pelileo de la provincia de Tungurahua, donde se obtuvieron las moras de Castilla.

3.2.3. Investigación experimental

La investigación experimental se hizo en el laboratorio de la UODIDE perteneciente a la Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos, a través de la manipulación de las concentraciones de ozono para determinar su efecto sobre las variables (actividad antioxidante, contenido de antocianinas, contenido de polifenoles, contenido de ácido ascórbico, contenido de azúcares).

3.3. Nivel o tipo de investigación

El tipo de investigación fue:

3.3.1. Exploratoria

Debido a que se generó un grado de familiaridad con respecto al efecto del ozono sobre la calidad postcosecha de las moras de Castilla (*Rubus glaucus* Benth).

3.3.2. Descriptiva

Debido a que permitió describir los resultados obtenidos a través de cuadros y figuras estadísticas.

3.3.3. Explicativa

Porque permitió discutir los resultados obtenidos y compararlos con los de otros autores.

3.4. Población y muestra

Para esta investigación se utilizó mora de Castilla (*Rubus glaucus*) cultivada en el Cantón Pelileo, Provincia de Tungurahua.

3.4.1. Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con 5 tratamientos y 3 repeticiones/tratamiento y día de evaluación.

3.5. Operacionalización de variables

A continuación se detalla el procedimiento mediante el cual se convierten en operativas las variables. Por tanto, cada variable tiene una característica observable y medible, con lo cual se pueden construir registros de datos.

3.5.1. Variable independiente

Tabla 1. Operacionalización de la variable independiente

Descripción	Conceptualización	Categoría	Indicadores	Ítems	Técnicas e instrumentos
Ozono (O ₃)	Es un potente oxidante y esterilizante.	Tratamientos antibacterianos utilizados en la aplicación a productos agrícolas como sustituto del cloro.	0,0 ppm 0,4 ppm 0,5 ppm 0,6 ppm 0,7 ppm	¿La aplicación de ozono influirá en la actividad antioxidante, los azúcares y los compuestos bioactivos de la mora de Castilla (<i>Rubus glaucus</i> Benth)	Generador y analizador de ozono.

3.5.2. Variable dependiente

Tabla 2. Operacionalización de la variable dependiente

Descripción	Conceptualización	Categoría	Indicadores	Ítems	Técnicas e instrumentos
Antioxidantes	Sustancias que disminuyen o retardan las reacciones de oxidación sobre diferentes sustratos.	Análisis Químicos	Actividad antioxidante	¿El uso de ozono influirá en la actividad antioxidante?	DPPH
Antocianinas	Colorantes naturales pertenecientes al grupo de los flavonoides. Están presentes en casi todas las plantas especialmente en bayas		Contenido de antocianinas	¿El uso de ozono influirá en el contenido de antocianinas?	Método de pH diferencial
Polifenoles	Compuestos con propiedades antioxidantes, beneficiosas para la salud		Contenido de polifenoles	¿El uso de ozono influirá en el contenido de polifenoles?	Método de FOLIN
Ácido ascórbico o vitamina C	Vitaminas hidrosolubles presenten en frutas y vegetales.		Contenido de vitamina C	¿El uso de ozono influirá en el contenido de vitamina C?	Espectrofotometría
Azúcares	Son carbohidratos como la fructosa y la glucosa presentes en frutas y hortalizas.	Análisis enzimático	Contenido de azúcares	¿El uso de ozono influirá en el contenido de azúcares?	Método enzimático

3.6. Plan de recolección de información

La información fue recolectada por el método de observación directa.

3.6.1. Materiales y métodos

- **Materia prima.** Se utilizaron moras de Castilla cosechadas en estado de madurez 4, acorde a la carta de color de la NTE INEN 2427 que establece los requisitos de la mora.
- **Tratamiento con ozono.** El O₃ se aplicó en concentraciones de 0,4; 0,5; 0,6 y 0,7 ppm por un período de tres minutos. La aplicación se realizó en una cámara hermética (PRECISION, USA) empleando un generador de ozono (ANSEROS MONITOR MP, Alemania) y la concentración del gas dentro de la cámara se midió en forma continua mediante un analizador de ozono (ANSEROS MONITOR MP, Alemania).
- **Envasado y Almacenamiento.** Para el envasado de las moras se utilizaron envases de tereftalato de polietileno (PET) en los que se colocaron 200 ± 10 g y se almacenaron a una temperatura de 6 ± 1 °C, sin control de humedad relativa. Los análisis se realizaron por triplicado los días 1, 4, 7 y 10 de almacenamiento.
- **Liofilización.** Se trituraron 100 ± 10 gramos de mora, utilizando una licuadora manual y se procedió a cernir la pulpa para retirar las semillas. Posteriormente se colocó la pulpa en frascos de plástico y se los almacenó en un ultra congelador a -80 °C. Una vez congeladas, las muestras fueron liofilizadas en un liofilizador (LABCONCO, Estados Unidos) a una temperatura de -52 ± 2 °C y una presión de 12 Pa, durante una semana. Finalmente, la muestra liofilizada fue triturada y almacenada en la oscuridad, en envases plásticos, hasta su análisis.

3.6.2. Análisis químicos

Vitamina C. Para determinar la vitamina C de las moras de Castilla se realizaron los siguientes pasos:

- **Extracción.** Se pesaron 0,5 gr de muestra liofilizada a los que se les añadió 5 ml de oxalato/tampón (pH 5,4) . El extracto se centrifugó por 5 min a 3000 rpm en una centrifuga (ROTINA 380, ALEMANIA), el sobrenadante se pasó a un vial de 3 ml y se centrifugó por 30 min a 13300 rpm (LABNET 24D, USA).
- **Medición.** Se tomaron 100 µl del extracto y se aforó con oxalato/tampón a 25 ml. La medición se realizó en cubetas de cuarzo a 260 nm utilizando un espectrofotómetro (FISHER SCIENTIFIC, USA). La medición de la muestra se realizó del mismo modo en lugar de poner los 100 µl del **EXTRACTO** se coloca 100 µl de cada dilución.
- **Cálculos.** Para los cálculos se utilizó una curva estándar de ácido ascórbico con diluciones de 0 a 2,5 mg/ml, en un volumen final de 100 ml. La medición se realizó del mismo modo que las muestras.
- **Expresión de resultados.** El contenido de ácido ascórbico se expresó en mg/100g de materia fresca (MF).

Actividad Antioxidante. Se usó el método descrito por Brand-Williams, Cuvelier y Berset (1995), mediante inhibición del radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrilhydrazyl).

- **Extracción.** Se pesaron 0,5 g de muestra liofilizada y se añadieron 10 ml de etanol/agua (50:50, v:v). Las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm por 15 min en una centrifuga (ROTINA 380, ALEMANIA). Se repitió el procedimiento, se combinaron los sobrenadantes y se aforó a un volumen de 25 ml con etanol/agua (50:50, v:v). Para

la medición se realizó una dilución 1:9 con etanol/agua (50:50; v:v).

- **Medición.** Se usó una placa de 96 pocillos (400 µl) de fondo plano (Nunc), se le añadieron 20 µl de agua ultra pura en los pocillos para el Blanco y el Blanco de Reactivo, 20 µl de muestra en los pocillos correspondientes, 180 µl de metanol al 80% en los pocillos donde va el Blanco y 180 µl de DPPH en el resto de pocillos. Luego se realizó una agitación media de 5 s, se incubó la muestra en oscuridad y a temperatura ambiente durante 40 minutos, y se procedió a la medición de la absorbancia a 515 nm (FISHER SCIENTIFIC, USA), siguiendo los métodos de Fukumoto & Mazza (2000), Al-Duais (2009) y Brand-Williams (1995).
- **Cálculos.** El porcentaje de inhibición de DPPH se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = (1 - (\text{Abs}_{\text{muestra}} / \text{Abs}_{\text{BR}})) * 100$$

Donde

Abs_{muestra} = abs a 515 nm tras 40 minutos en oscuridad, de la muestra.

Abs_{BR} = abs a 515 nm tras 40 minutos del blanco de Reactivo.

Los resultados se expresaron como equivalentes µM trolox/100g MF.

Polifenoles totales. Se realizó de acuerdo al método de Folin - Ciocalteu descrito por Goulas & Manganaris (2011).

- **Extracción.** Para la medición de polifenoles totales se siguió el mismo procedimiento de preparación de los extractos que para la actividad antioxidante.
- **Medición.** La medición de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro (FISHER SCIENTIFIC, USA) a una longitud de onda 750 nm. Se realizó una curva de calibración de ácido gálico (AG) con diluciones de 10 a 200 mg AG/L. Los resultados se expresaron como equivalentes mg ácido gálico/100g de materia fresca.

Antocianinas. Se realizó de acuerdo al método de pH diferencial descrito por Anisimoviene et al. (2013).

- **Extracción.** Se pesaron 0,5 g de muestra liofilizada y se añadieron 10 ml de etanol/agua (80:20, v:v), se centrifugó a 4000 rpm por 10 min en una centrífuga (ROTINA 380, ALEMANIA) y el sobrenadante se aforó a 25 ml con etanol/agua (80:20, v:v). Se prepararon buffers de pH 1 y pH 4,5: para el primero se tomaron 25 ml de ClK (0,2N) y se añadieron 22 ml de HCl y se midió el pH hasta llegar a 1. Para el buffer de pH 4,5 se tomaron 50 ml de acetato de sodio y se añadieron 137,5 ml de HCl (0,2N) y se midió el pH hasta llegar a 4,5.
- **Medición.** La absorbancia de los extractos se midió con un espectrofotómetro (FISHER SCIENTIFIC, USA) en 2 longitudes de onda (510 y 700 nm) por cada buffer utilizado y con estas mediciones se calculó el contenido de antocianinas totales.
- **Cálculos.** Para el cálculo de la absorbancia se aplicó la siguiente fórmula:

$$\Delta \text{ absorbancia} = (\text{Abs pH } 1_{510} - \text{Abs pH } 1_{700}) - (\text{Abs pH } 4.5_{510} - \text{Abs pH } 4.5_{700})$$

Dónde

Abs pH 1₅₁₀: absorbancia del extracto con adición del buffer 1 a 510 nm.

Abs pH 1₇₀₀: absorbancia del extracto con adición del buffer 1 a 700 nm.

Abs pH 4,5₅₁₀: absorbancia del extracto con adición del buffer 4,5 a 510 nm.

Abs pH 4,5₇₀₀: absorbancia del extracto con adición del buffer 4,5 a 700 nm.

Para la determinación del contenido de antocianinas presentes en la fruta se realizó el siguiente cálculo:

$$\frac{\text{g Cy - 3 - rutinosido}}{\text{kg MF}} = \frac{(\Delta \text{ absorbancia} * \text{PM} * \text{dilución} * 0.025)}{\epsilon * 1 * \text{peso muestra}}$$

Donde:

Δ absorbancia: diferencia de pH a 510 y 700 nm

PM: peso molecular cianidina-3-rutinosido: 630,97 g/mol

Dilución: 30

ϵ : coeficiente de extinción cianidina-3-rutinosido: 28800 L/mol

Peso muestra: gramos de muestra liofilizada utilizada

Los resultados se expresaron en mg/100g materia fresca

Contenido de glucosa/fructosa/sacarosa

- **Extracción.** 0,5 g de muestra liofilizada se homogenizaron con 13 ml de etanol al 80% y se llevaron a un baño termostático (WISE BATH, COREA) a 80 °C durante 15 minutos. Posteriormente, se llevó a 50 ml con agua destilada y se centrifugó 30 minutos a 5000 rpm en una centrifuga (ROTINA 380, ALEMANIA), a continuación se filtró el sobrenadante y se realizó una dilución 1/50.
- El contenido de sacarosa, fructosa y glucosa se determinó por triplicado con un kit comercial (sucrose, d-fructose and d-glucose, Megazyme), utilizando un método UV y midiendo la absorbancia en una longitud de onda de 340 nm en espectrofotómetro (FISHER SCIENTIFIC, USA). Los resultados se expresaron en mg de cada uno de los azúcares/100g de materia fresca.

3.7. Plan de procesamiento de la información

Los datos fueron procesados y analizados con el programa estadístico IBM SPSS Statistics Versión 21, empleando la prueba ANOVA de un solo factor y cuando este fue significativo, la comparación de las medias fue realizada mediante el test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Análisis e interpretación de resultados

4.1.1. Ácido ascórbico

Es un antioxidante utilizado en la industria alimentaria como conservante. Además, ejerce actividades terapéuticas en patologías como el cáncer y la enfermedad coronaria al fortalecer los procesos inmunológicos (García, Bravo, García, Ruiz, & Budovalchew, 2015).

En la tabla 3 se observa la evolución del ácido ascórbico de las moras de Castilla control y tratadas con diferentes concentraciones de ozono gaseoso, durante 10 días de almacenamiento en refrigeración (6 ± 1 °C).

Tabla 3. Contenido de ácido ascórbico (mg/100 MF) en moras de Castilla control y tratadas con ozono durante 10 días de almacenamiento refrigerado (6 ± 1 °C)

Días	Ácido ascórbico (mg/100 MF)				
	Control	0,4 ppm O ₃	0,5 ppm O ₃	0,6 ppm O ₃	0,7 ppm O ₃
1	19,77 ± 1,52 Aa	11,32 ± 2,86 Ba	26,56 ± 1,00 Ca	20,06 ± 2,92 Aab	19,61 ± 2,30 Aa
4	22,02 ± 0,76 Aa	15,61 ± 2,52 Aa	20,14 ± 2,04 Ab	18,66 ± 3,14 Aa	14,43 ± 4,50 Aa
7	18,60 ± 0,50 Aa	17,43 ± 2,62 Aab	20,46 ± 0,40 ABb	22,87 ± 1,27 Bab	11,30 ± 0,77 Ca
10	24,32 ± 4,72 Aa	24,83 ± 4,23 Ab	27,08 ± 1,48 Aa	25,06 ± 1,86 Ab	13,87 ± 5,26 Ba

Los valores mostrados corresponden al promedio de 3 mediciones ± la desviación estándar. Letras mayúsculas diferentes indican, para cada día de evaluación, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos. Diferentes letras minúsculas indican, para cada tratamiento, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las fechas de evaluación.

Como se puede observar, en las muestras tratadas con ozono existió un incremento del contenido de ácido ascórbico durante el almacenamiento excepto en la concentración de 0,7 ppm O₃ que registró concentraciones más bajas en relación al control. Estos resultados son similares a los reportados por (García et al., 2015) quienes en un estudio realizado en moras cultivadas y silvestres encontraron un aumento significativo del ácido L-ascórbico en estado de madurez 4. Este aumento pudo deberse a la presencia de la enzima L-gluconalactona oxidasa que actúa transformando la 2-cetoglucona-lactona proveniente del metabolismo de la glucosa en ácido L-ascórbico. Por otro lado, la disminución del ácido L-ascórbico en la fruta tratada con la mayor dosis de ozono, pudo deberse al proceso de descomposición oxidativa de la materia orgánica.

4.1.2. Antocianinas

Son sustancias importantes en la industria de alimentos ya que podrían ser utilizadas como sustitutos de los colorantes sintéticos en la alimentación humana. Además, son consideradas como una fuente natural de sustancias antioxidantes que previenen diversas enfermedades degenerativas (Oliveira, Rosa, Kwiatkowski, & Clemente, 2013).

En la figura 3 se muestran las concentraciones de antocianinas totales halladas en las moras de Castilla durante los 10 días de almacenamiento refrigerado (6 ± 1 °C).

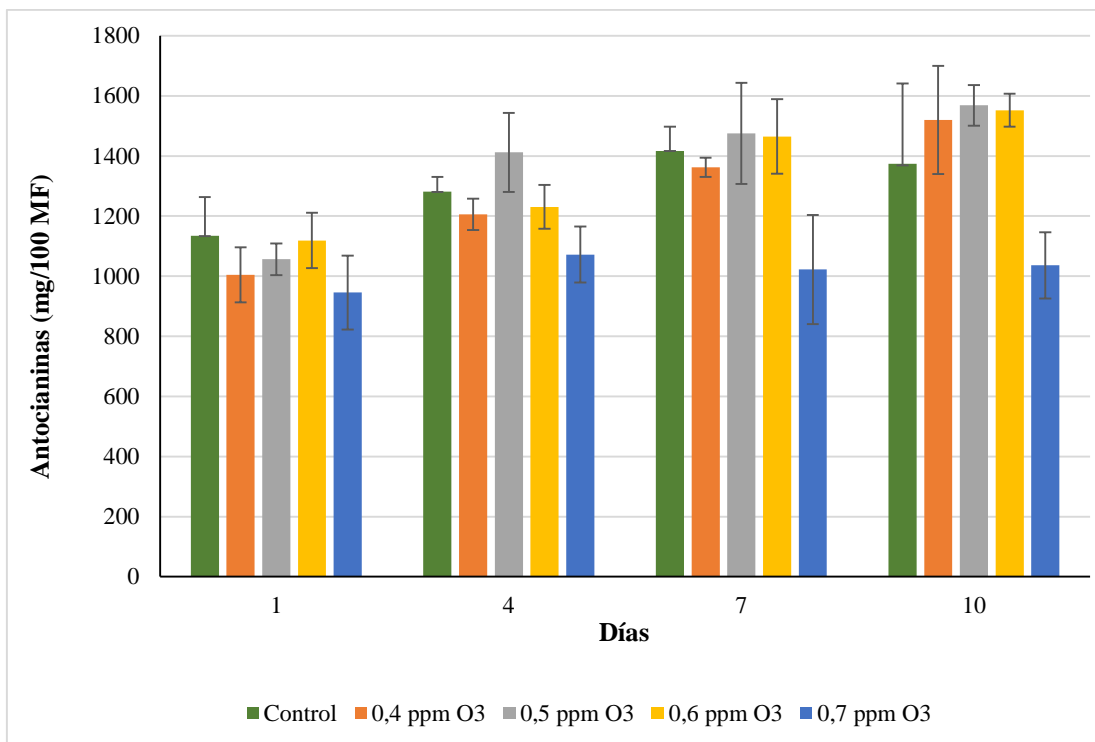


Figura 3. Antocianinas (mg/100 MF) de moras de Castilla control y tratadas con ozono durante 10 días de almacenamiento refrigerado (6 ± 1 °C)

Los valores representan el promedio de 3 mediciones \pm el intervalo de confianza del 95% de la media

En la figura 3 se observa un aumento significativo del contenido de antocianinas de los tratamientos entre días de evaluación a excepción de la concentración 0,7 ppm de ozono que se mantuvo estable durante el almacenamiento. Estos resultados son similares a los reportados por (Prez et al., 2009) en un estudio realizado en fresas. Estos autores encontraron que el contenido de antocianinas de fruta tratada con ozono y almacenada a 20 °C registró un ligero aumento y además, también encontraron resultados similares en zarzamoras almacenadas a 2 °C en una atmósfera modificada que contenía 0,3 ppm de ozono.

4.1.3. Azúcares

En la tabla 4 se presenta la evolución de los azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) de las moras de Castilla cosechadas en estado de madurez 4, control y tratadas con ozono y almacenadas en refrigeración (6 ± 1 °C).

Tabla 4. Contenido de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) en moras de Castilla control y tratadas con 0,4; 0,5; 0,6 y 0,7 ppm de ozono

Días	GLUCOSA (g/100g MF)				
	Control	0,4 ppm O ₃	0,5 ppm O ₃	0,6 ppm O ₃	0,7 ppm O ₃
1	436,10 ± 24,55 Aa	478,74 ± 91,04 Aa	412,25 ± 49,58 Aa	444,83 ± 15,21 Aa	344,77 ± 92,26 Aa
4	478,48 ± 69,07 Aa	399,10 ± 61,22 Aa	454,77 ± 79,31 Aa	362,33 ± 2,56 Aa	364,51 ± 31,88 Aa
7	389,71 ± 12,13 Aab	431,36 ± 131,57 Aa	454,75 ± 118,32 Aa	482,34 ± 147,39 Aa	456,94 ± 160,66 Aa
10	320,70 ± 27,57 Ab	324,85 ± 25,86 Aa	439,53 ± 192,78 Aa	283,36 ± 62,62 Aa	356,84 ± 66,10 Aa
FRUCTOSA (g/100g MF)					
1	414,18 ± 42,18 Aab	591,10 ± 191,64 Aa	449,18 ± 119,05 Aa	558,38 ± 142,15 Aa	458,94 ± 127,56 Aa
4	586,03 ± 192,56 Ab	333,60 ± 14,24 Aa	450,03 ± 91,97 Aa	344,04 ± 26,19 Aa	336,90 ± 39,21 Aa
7	438,64 ± 30,00 Aab	411,70 ± 136,93 Aa	579,29 ± 327,85 Aa	437,06 ± 158,60 Aa	545,24 ± 152,72 Aa
10	311,00 ± 5,66 Ab	375,96 ± 52,55 Aa	479,35 ± 221,87 Aa	302,93 ± 60,04 Aa	373,56 ± 61,86 Aa
SACAROSA (g/100g MF)					
1	240,40 ± 104,77 ABa	114,28 ± 6,99 Aa	404,41 ± 134,33 Ba	242,16 ± 155,62 ABa	348,70 ± 60,20 Aba
4	158,81 ± 52,44 Aa	157,50 ± 32,15 Aab	150,99 ± 66,92 Aa	158,96 ± 75,51 Aa	123,03 ± 13,53 Ab
7	204,75 ± 12,49 Aa	195,32 ± 3,76 Ab	294,56 ± 188,47 Aa	235,40 ± 268,63 Aa	230,66 ± 35,80 Aab
10	129,60 ± 28,76 Aa	157,55 ± 0,00 Aab	197,00 ± 167,77 Aa	129,46 ± 52,57 Aa	187,00 ± 93,86 Ab

Los valores mostrados corresponden al promedio de 3 mediciones ± la desviación estándar

Letras mayúsculas diferentes indican, para cada día de evaluación, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

Diferentes letras minúsculas indican, para cada tratamiento, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las fechas de evaluación.

En el caso de glucosa y fructosa se observó una tendencia a una disminución en sus contenidos pero no fue significativo en ninguno de los tratamientos en estudio. Por el contrario, en el caso de la sacarosa se evidenció un incremento significativo en las moras tratadas con 0,5 y 0,7 ppm de O₃ en el día 1 y para los otros días tendió a disminuir, mientras que, en las moras tratadas con 0,4 ppm O₃ se registró un aumento no significativo de sacarosa durante el tiempo de almacenamiento.

La baja sacarosa, glucosa y el contenido de fructosa podría ser debido a una activación de otras vías de degradación de sacarosa en respuesta al estrés oxidativo causado por el ozono (Prez et al., 2009).

La reducción de los niveles de sólidos solubles se produce porque los azúcares y los ácidos son usados como sustrato respiratorios (Oliveira et al., 2013).

4.1.4. Polifenoles y actividad antioxidante

Los polifenoles se caracterizan por sus propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas y neuroprotectoras y por la actividad antioxidante que disminuyen el riesgo de enfermedades degenerativas (Paredes-López, Cervantes-Ceja, Vigna-Pérez, & Hernández-Pérez, 2010).

En la tabla 5 se muestra el efecto del tratamiento con diferentes concentraciones de ozono gaseoso sobre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante de moras de Castilla almacenadas durante 10 días en refrigeración.

Tabla 5. Polifenoles y actividad antioxidante en moras de Castilla control y tratadas con 0,4; 0,5; 0,6 y 0,7 ppm de ozono

Día	Polifenoles (equivalentes ácido gálico/100 g materia fresca)				
	Control	0,4 ppm O ₃	0,5 ppm O ₃	0,6 ppm O ₃	0,7 ppm O ₃
1	2641,16 ± 76,28 Aab	1368,38 ± 248,55 Ca	3242,26 ± 386,39 Bab	2249,1 ± 168,60 Aa	2546,18 ± 338,86 Aba
4	2998,54 ± 824,96 Aab	1824,73 ± 686,12 Aa	2938,09 ± 444,81 Aa	2460,82 ± 442,84 Aa	1673,23 ± 610,02 Aab
7	2932,44 ± 204,36 Aab	2703,26 ± 440,39 Aab	3923,31 ± 47,48 Bbc	3340,13 ± 256,30 Aab	1253,27 ± 219,97 Cb
10	3790 ± 195,85 Aab	3502,57 ± 564,39 Ab	4568,89 ± 227,15 Bc	4443,40 ± 299,52 Bc	1679,63 ± 285,98 Cab
Día	Actividad antioxidante (equivalentes μM trolox/100g materia fresca)				
	Control	0,4 ppm O ₃	0,5 ppm O ₃	0,6 ppm O ₃	0,7 ppm O ₃
1	833,31 ± 63,61 Aa	356,60 ± 41,94 Ba	965,26 ± 110,10 Aa	686,93 ± 133,73 Aa	691,76 ± 159,79 Aa
4	820,77 ± 60,16 Aa	589,57 ± 130,33 Aab	765,05 ± 19,07 Aab	643,19 ± 100,37 Aa	514,76 ± 224,74 Aa
7	783,61 ± 33,63 Aba	649,95 ± 32,95 Ab	906,79 ± 87,05 Bb	865,77 ± 55,08 Bab	382,57 ± 30,27 Ca
10	1017,42 ± 284,09 Aa	1150,78 ± 157,77 Ac	1284,74 ± 19,40 Ac	1047,64 ± 78,32 Ab	526,78 ± 231,77 Ba

Los valores mostrados corresponden al promedio de 3 mediciones ± la desviación estándar

Letras mayúsculas diferentes indican, para cada día de evaluación, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

Diferentes letras minúsculas indican, para cada tratamiento, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las fechas de evaluación.

Durante el almacenamiento, el contenido de polifenoles aumentó en todos los tratamientos, excepto cuando se utilizó la mayor dosis de ozono. En efecto, las moras tratadas con 0,7 ppm de ozono mostraron una disminución significativa en la concentración de polifenoles. Esta reducción del contenido de polifenoles podría estar relacionada con la síntesis de antocianinas que consume un porcentaje de ácidos polifenólicos presentes en la fruta más madura (Bernal-Roa & Daz-Moreno, 2011).

En la tabla 5 se puede apreciar también la actividad antioxidante de la mora de Castilla durante el almacenamiento. Esta actividad se incrementó de manera significativa al pasar los días en la fruta de todos los tratamientos, a excepción de las muestras tratadas con 0,7 ppm O₃ que tuvieron un comportamiento contrario, ya que la actividad antioxidante tendió a disminuir en estas moras debido a que las concentraciones altas de ozono aceleraron el proceso de senescencia.

4.2. Verificación de hipótesis

4.2.1. Modelo Lógico

- **Hi:** El uso de ozono gaseoso afecta la actividad antioxidante y el contenido de azúcares y compuestos bioactivos de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth)
- **Ho:** El uso de ozono gaseoso no afecta la actividad antioxidante ni el contenido de azúcares y compuestos bioactivos de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth)

4.2.2. Modelo Matemático

$$\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

$$\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$$

4.2.3. Modelo Estadístico

- **Elección de la prueba:** para la verificación de la hipótesis se seleccionó la Prueba ANOVA de un factor y el test Tukey para contrastar las medias experimentales; de las concentraciones de azúcares y compuestos bioactivos de la mora de Castilla.
- **Nivel de significancia:** se utilizó un nivel de confianza del 95% (0,95), y un nivel de riesgo o error de 5% (0,05).
- **Regla de decisión:** si el valor de p es menor o igual al nivel de significancia, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna o de investigación; mientras que si el valor de p es mayor al nivel de significancia, se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alterna.

4.2.4. Conclusión

El valor de p obtenido en la prueba estadística ANOVA para contrastar la igualdad de las medias experimentales fue significativa ($p < 0,05$), en relación a las medias de las concentraciones en estudio comparadas con el control.

Se observaron diferencias significativas entre las concentraciones control, 0,4; 0,5; 0,6 y 0,7 ppm. De manera general se encontró significancia en la dosis de 0,7 ppm de O₃ en relación al control por lo que se confirma que fue la que obtuvo mayores diferencias en cuanto al contenido de azúcares y compuestos bioactivos de las moras.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Independientemente de las concentraciones utilizadas, el tratamiento postcosecha con ozono gaseoso afectó de manera positiva y negativa debido que en algunos casos se observó incremento y en otros reducción de la actividad antioxidante, los azúcares y los compuestos bioactivos de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth).
- La concentración de 0,7 ppm O₃ afectó de manera negativa la actividad antioxidante, los azúcares y los compuestos bioactivos de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth).
- Las moras tratadas con 0,5ppm O₃ afecta de manera positiva y equilibrada al transcurrir los días de almacenamiento ya que permite el incremento de la actividad antioxidante, los azúcares y los compuestos bioactivos de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth).

5.2. Recomendaciones

De acuerdo a los resultados obtenidos durante la investigación sobre el efecto del ozono gaseoso sobre la actividad antioxidante, los azúcares y los compuestos bioactivos de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth), se recomienda utilizar concentraciones de 0,5ppm de ozono debido a que al transcurrir los días de almacenamiento mantiene un comportamiento de incremento equilibrado en cuanto a su composición en relación al control. Por otro lado, al aplicar concentraciones más bajas o más altas se afectó de forma negativa o positiva pero de una manera irregular.

CAPÍTULO VI LA PROPUESTA

Tema:

“APLICACIÓN DE OZONO PARA EXTENDER LA VIDA ÚTIL Y REDUCIR LA PÉRDIDA DE ANTIOXIDANTES, LOS AZÚCARES Y LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus* Benth)”

6.1. Datos Informativos

- **Institución:** Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos
- **Cantón:** Ambato
- **Parroquia:** Huachi Chico
- **Zona:** 3 – Provincia de Tungurahua
- **Beneficiarios:** Centros de investigación Científica, productores de moras, comerciantes y procesadores
- **Periodo:** Abril – Junio 2018
- **Responsables:** Rodolfo López
- **Beneficiarios:** Agricultores productores de mora de Tungurahua
- **Costo:** 10000 dólares

6.2. Antecedentes de la propuesta

El ozono es un agente oxidativo, con mayor efectividad que el cloro como agente desinfectante. El ozono elimina bacterias como *Escherichia coli*, Listeria y otros patógenos con mayor rapidez que los desinfectantes usados tradicionalmente (Xu, 2008).

El ozono (O₃) se ha utilizado durante décadas como agente desinfectante en plantas de tratamiento de agua en Europa y hoy en día se usa también como gas o agua ozonizada para tratamientos postcosecha de frutas y hortalizas. Asimismo, es utilizado en el almacenamiento de alimentos para evitar la proliferación de agentes microbianos (Pérez et al., 1999).

6.3. Justificación

Esta investigación es de importancia ya que no se han realizado estudios en moras en la provincia de Tungurahua a pesar de ser una de las provincias con mayores producciones de mora del país. Con esto se pretende contribuir con resultados a nivel experimental que se aprovechen de base para escalar a nivel industrial y de esta manera incentivar la utilización de ozono en tratamientos postcosecha con la finalidad de eliminar microorganismos presentes en la fruta que pueden contribuir al deterioro de la misma y reducir su tiempo de vida útil. La investigación es original y ofrece la posibilidad de aprovechar conocimientos científicos sobre el efecto del uso del ozono gaseoso sobre la actividad antioxidante, compuestos bioactivos y los azúcares, compuestos de gran importancia para la industria alimentaria y farmacéutica. La investigación está respaldada por bibliografía actualizada y puede usarse como guía de consulta y análisis de resultados y es asequible económicamente por su presupuesto relativamente bajo.

6.4. Objetivos

6.4.1. Objetivo General

Diseñar e implementar un sistema de tratamiento postcosecha de ozono en moras.

6.4.2. Objetivos Específicos

- Adquirir un generador y medidor de ozono para escala de planta piloto
- Optimizar las condiciones operacionales en planta piloto para la generación de

ozono y su aplicación en mora

- Validar la eficiencia del proceso a escala piloto por medio de análisis químicos.

6.5. Análisis de la factibilidad

Esta investigación es prototipo tecnológico, que se puede plasmar como una nueva tecnología para la conservación de moras y la evaluación de su actividad antioxidante y compuestos bioactivos y los azúcares. El estudio de factibilidad tiene carácter sociológico, debido a que contribuye con estudio investigativo y se puede ejecutar con datos expuestos en este trabajo y serán de gran ayuda para tratamientos postcosecha en moras.

Tabla 6. Costos de investigación

DETALLE	VALOR \$
Graduando	700
Tutor	300
Materiales, equipos, reactivos	8 000
Subtotal	9 000
Imprevistos	1 000
TOTAL	10 000

6.6. Fundamentación científico técnica

Los objetivos principales de aplicar técnicas de postcosecha son mantener la calidad y reducir las pérdidas entre la recolección y el consumo. Frente a la peligrosidad de los agentes químicos utilizados habitualmente, el ozono ofrece una serie de ventajas: gran capacidad desinfectante, uso autorizado en alimentos, extensión de la vida útil en alimentos y ausencia de impacto ambiental (Pérez et al., 1999).

El ozono en agua es usado como alternativa al hipoclorito como desinfectante con ventajas significativa ya que se descompone rápidamente en presencia de oxígeno, sin dejar

residuos y es más eficaz contra las bacterias, los quistes de protozoarios, virus y esporas de hongos que el hipoclorito (Renzo & Lanza, 2005)

Los resultados publicados por Renzo y Lanza (2005) mostraron que el uso de aire ozonizado durante el período de almacenamiento de frutos reduce la afectación por mohos. El ozono (O_3) se ha utilizado durante décadas como agente desinfectante en plantas de tratamiento de agua en Europa y hoy en día se usa también como gas o agua ozonizada para tratamientos postcosecha de frutas y hortalizas. Asimismo, es utilizado en el almacenamiento de alimentos para evitar la proliferación de agentes microbianos (Pérez et al., 1999).

En postcosecha, el ozono se puede aplicar en forma gaseosa o disuelta en agua. Los principales efectos de la aplicación de ozono son la inactivación de crecimiento microbiano, destrucción de pesticidas y residuos químicos y el control de plagas de almacenamiento (Öztekin et al., 2006).

6.7. Metodología

Para realizar el escalamiento a planta piloto en las instalaciones de la facultad de alimentos de la UTA. Lo primero que realizaremos es la adecuación de un cuarto frío con capacidad de almacenamiento de 500 kg el mismo que contara con generador de ozono, regulador y analizador de ozono. La información se recolectará por el método de observación directa y se menciona a continuación.

- **Materia prima.** Se utilizarán moras de Castilla cosechadas en estado de madurez 4, acorde a la carta de color de la NTE INEN 2427 que establece los requisitos de la mora.
- **Tratamiento con ozono.** El O_3 se aplicará en concentraciones de 0,5 ppm que fue uno de los mejores tratamientos en laboratorio por un período de tres minutos. La

aplicación se realizará en un cuarto frío previamente adecuado para inyectar ozono gaseoso empleando un generador de ozono (ANSEROS MONITOR MP, Alemania) y la concentración del gas dentro de la cámara se medirá en forma continua mediante un analizador de ozono (ANSEROS MONITOR MP, Alemania).

- **Empaque y almacenamiento.** Para el envasado se utilizarán envases de tereftalato de polietileno (PET) en los que se colocarán 200 ± 10 g de moras y se almacenarán a una temperatura de 6 ± 1 °C, sin control de la humedad relativa. Los análisis se realizarán por triplicado los días 1, 4, 7 y 10 de almacenamiento para verificar resultados con respecto a los resultados obtenidos en el laboratorio utilizando muestras previamente liofilizadas.
- **Análisis de actividad antioxidante.** Se realizará por el método DPPH (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini-Filho, & Fett, 2005) que se fundamenta en la disminución de la absorbancia medida a 515 nm del radical DPPH[•], por antioxidantes. La concentración de DPPH[•] en el medio de reacción se deduce a partir de una curva de calibrado adquirida por regresión lineal.
- **Determinación del contenido de antocianinas.** Para determinar el contenido de antocianinas totales (AT) se utilizará el método diferencial de pH (Kuskoski et al., 2005).
- **Determinación del contenido de polifenoles.** Se realizara de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu descrito por Goulas & Manganaris (2011).
- **Contenido de glucosa /fructosa/sacarosa.** El contenido de sacarosa, fructosa y glucosa se determinará por triplicado con un kit comercial Megazyme (sucrose,d-fructose and d-glucose), utilizando un método UV y midiendo la absorbancia en una longitud de onda de 340nm en espectrofotómetro (THERMO SCIENTIFIC, Estados Unidos).

6.8. Modelo Operativo de la propuesta

Tabla 7. Modelo Operativo de la propuesta

Fases	Metas	Actividades	Responsables	Recursos	Presupuesto (USD)	Tiempo (meses)
Formulación de la propuesta	Evaluar la eficacia de la concentración de ozono a escala planta piloto	Revisión bibliográfica			200	1
Desarrollo preliminar de la propuesta	Cronograma de la propuesta	Pruebas preliminares			500	2
Implementación de la propuesta	Ejecución de la propuesta	Determinar pérdida de compuestos bioactivos y poder antioxidante y los azúcares de la mora	Investigador Investigador	Humanos Teóricos Económicos	7800	2
Evaluación de la propuesta	Comprobación del proceso	Análisis Químicos			500	1

6.9. Administración de la propuesta

La ejecución de la propuesta estará coordinada por el investigador responsable del proyecto. Ing. Rodolfo López.

Tabla 8. Administración de la propuesta

Indicadores a mejorar	Situación actual	Resultados esperados	Actividades	Responsable
Implementación de un nuevo método de conservación de moras de Castilla	Falta de información sobre uso de ozono en moras	Mantener las características de la mora de Castilla	<ul style="list-style-type: none">• Adecuación de cuarto frío con ozono.• Colocar moras en la cámara e inyectar gas en la dosis establecida.• Realizar análisis químicos respectivos para verificación de resultados	Ing. Rodolfo López

6.10. Previsión de la evaluación de la propuesta

Tabla 9. Previsión de la evaluación de la propuesta

Preguntas básicas	Explicación
¿Quiénes solicitan evaluar?	Centros de investigación científica Organizaciones no gubernamentales Estudiantes de ingeniería de alimentos e ingeniería bioquímica
¿Por qué evaluar?	Implementación de nuevas tecnologías
¿Para qué evaluar?	Determinar metodología adecuada para el tratamiento postcosecha de mora
¿Qué evaluar?	Metodología Materia prima
¿Quién evalúa?	Tutor Calificadores
¿Cuándo evaluar?	Todo el tiempo
¿Cómo evaluar?	Utilizando equipos e instrumentos de evaluación

MATERIALES DE REFERENCIA

- Acosta-Montoya, Ó., Vaillant, F., Cozzano, S., Mertz, C., Pérez, A. M., & Castro, M. V. (2010). Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schldl.) during three edible maturity stages. *Food Chemistry*, *119*(4), 1497–1501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.032>
- Ali, L., Svensson, B., Alsanius, B. W., & Olsson, M. E. (2011). Late season harvest and storage of Rubus berries-Major antioxidant and sugar levels. *Scientia Horticulturae*, *129*(3), 376–381. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.03.047>
- Bernal-Roa, L. J., & Díaz-Moreno, C. (2011). Análisis de la capacidad antioxidante en frutos rojos durante el proceso de obtención de pulpa-Antioxidant capacity analysis of red fruits during the pulp process. *II International Conference on Postharvest and Quality Management of Horticultural Products of Interest for Tropical Regions 1016*, 103–108.
- Brito Grandes, B., Montalvo Vargas, D. A., Freire Salazar, V. H., Vásquez C., W., Viteri D., P., Martínez, A., & Jácome, R. (2016). *Calidad en la cosecha, poscosecha y comercialización*. Ecuador: Quito, EC: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Programa Nacional de Fruticultura, 2016. Retrieved from <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/4070>
- Clark, J. R., & Finn, C. E. (2014). Blackberry Cultivation in the World. *Revista Brasileira de Fruticultura*, *36*(1), 46–57. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-445/13>
- Damely, A., & Méndez, G. (2008). Tecnología IV gama frutos de moras (*Rubus glaucus*).
- García, M., Bravo, A., García, A., Ruiz, A., & Budovalchew, I. (2015). Contenido de vitamina C en dos variedades de moras durante la etapa de maduración. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, *49*(3), 329–334. Retrieved from http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572015000300006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- GC Renzo, & Lanza, L. G. (2005). Efectos de la exposición al ozono gaseoso en frío almacenado Fruta de la naranja. *Symp Postcosecha. Eds. F.*, 5.
- Horvitz, S., Chanaguano, D., & Arozarena, I. (2017). Andean blackberries (*Rubus glaucus*)

- Benth) quality as affected by harvest maturity and storage conditions. *Scientia Horticulturae*, 226(September), 293–301.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.09.002>
- Joshiyura, K. J., Hu, F. B., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Rimm, E. B., Speizer, F. E., ... Willett, W. C. (2001). The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Annals of Internal Medicine*, 134(12), 1106–1114+I.
[https://doi.org/10.1016/S0011-5029\(01\)70029-6](https://doi.org/10.1016/S0011-5029(01)70029-6)
- Kaume, L., Howard, L. R., & Devareddy, L. (2012). The blackberry fruit: a review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. *J Agric Food Chem*, 60(23), 5716–5727. <https://doi.org/10.1021/jf203318p>
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 25(4), 726–732.
<https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>
- MAGAP. (2013). Manual El cultivo de la mora. *MAGAP*.
- NTE INEN, 2427. (2010). *E P U. Norma Técnica Ecuatoriana Nte Inen 2 165:99* (Vol. 2165).
- Oliveira, D. M., Rosa, C. I. L. F., Kwiatkowski, A., & Clemente, E. (2013). Biodegradable coatings on the postharvest of blackberry stored under refrigeration. *Revista Ciencia Agronomica*, 44(2), 302–309.
- Paredes-López, O., Cervantes-Ceja, M. L., Vigna-Pérez, M., & Hernández-Pérez, T. (2010). Berries: Improving Human Health and Healthy Aging, and Promoting Quality Life-A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(3), 299–308.
<https://doi.org/10.1007/s11130-010-0177-1>
- Pérez, A. G., Sanz, C., Ríos, J. J., Olías, R., & Olías, J. M. (1999). Effects of Ozone Treatment on Postharvest Strawberry Quality. *J Agric Food Chem*, 47(4), 1652–1656.
<https://doi.org/10.1021/jf9808291>
- Prez, A. G., Sanz, C., Ros, J. J., Olas, R., Olas, J. M., Pérez, A. G., ... Ri, J. J. (2009). Efectos del tratamiento de ozono en postcosecha fresa Calidad, 47(4), 1652–1656.
- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., Patras, A., Brunton, N., & Cullen, P. J. (2009). Effect of

ozone processing on anthocyanins and ascorbic acid degradation of strawberry juice.
Food Chemistry, 113(4), 1119–1126. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.085>

Xu, L. (2008). Uso de Ozono para Mejorar la Seguridad de Frutas y Vegetales Frescos.
Mundo Alimentario, 7–13. Retrieved from <http://www.ozonoalbacete.es/wp-content/uploads/2011/08/frutas-y-verduras.pdf>

ANEXOS

Anexo 1. Fotografías del trabajo experimental de laboratorio

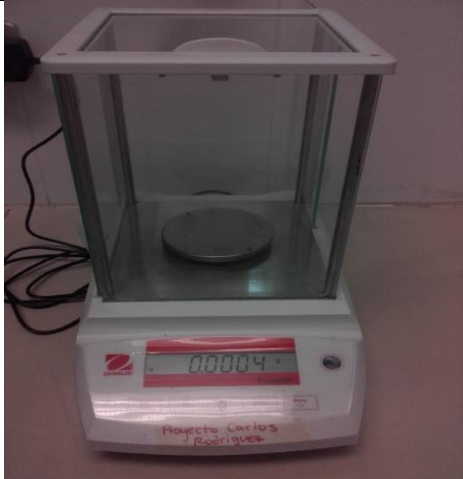
Espectrofotómetro para determinación de ácido ascórbico, antocianinas, azúcares, polifenoles y actividad antioxidante



Preparación de extractos



Balanza analítica



Agitador orbital



Centrífuga



Baño maría

