



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Tema:

Efecto del ozono gaseoso sobre la calidad microbiológica de moras de Castilla
(*Rubus glaucus* Benth)

Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Trabajo de Titulación parte del Proyecto de investigación “Desarrollo de nuevas tecnologías de acondicionamiento postcosecha para berries”, aprobado por el Honorable Consejo Universitario y financiado por el Centro de Investigación de la Universidad Técnica de Ambato. Resolución 1302-CP-U-P-2015. Coordinado por Ph.D. Sandra Horvitz.

Autora: Evelyn Yajaira Barrionuevo Terán

Tutora: Dra. Mirari Yosune Arancibia Soria

Ambato – Ecuador

Octubre – 2018

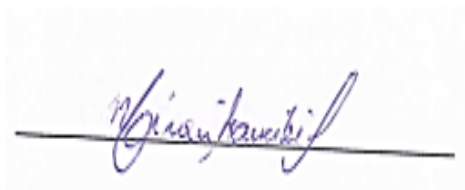
APROBACIÓN DEL TUTOR

Dra. Mirari Yosune Arancibia Soria

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 06 de septiembre de 2018



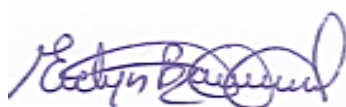
Dra. Mirari Yosune Arancibia Soria

C.I: 1802142461

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo Evelyn Yajaira Barrionuevo Terán, declaro que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales; exceptuando las citas.



Evelyn Yajaira Barrionuevo Terán

1804416897

AUTORA

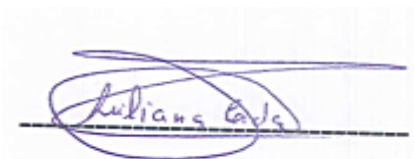
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

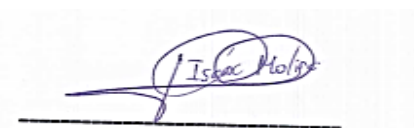
A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Liliana Cerda', written over a horizontal line.

Presidente del Tribunal

A handwritten signature in blue ink, 'Liliana Cerda', written over a horizontal line.

Ph.D. Liliana Alexandra Cerda Mejía

C.I. 1804148086

A handwritten signature in blue ink, 'Isaac Molina', written over a horizontal line.

MSc. Molina Sánchez José Isaác

C.I. 1803752300

Ambato, 26 de septiembre de 2018

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, como un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto de Investigación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Evelyn Yajaira Barrionuevo Terán

1804416897

AUTORA

DEDICATORIA

A mis padres Edgar y Marlene, y su esfuerzo incansable por hacer de mis hermanos y mí mejores personas a nivel profesional y personal. Quiero retribuir todos esos años de trabajo y sacrificio; es apenas el inicio de un largo camino que recorreré gracias a sus enseñanzas y amor desinteresado.

A mis hermanos Orlando y Alejandro, gracias por estar siempre pendientes de mí, fueron, son y serán mi ejemplo a seguir.

A mi tío Enrique, porque me ha enseñado que las dificultades nos hacen personas fuertes, es para mí la representación de humildad, trabajo y sacrificio, gracias por su amor infinito.

Es este el fruto de su apoyo incondicional y su amor por mí.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento infinito a Dios pues ha sido el gestor de este triunfo en mi vida.

A mi familia, quien fue y será la razón de mi esfuerzo y dedicación. Su confianza y amor por mí muchas veces proporcionaron el apoyo necesario para continuar cada día.

A la doctora Sandra Horvitz por su dedicación, tiempo y paciencia, los que permitieron la culminación de este trabajo y además incentivaron el espíritu de investigación dentro de un margen de honestidad y veracidad. A la doctora Mirari Arancibia por su valiosa aportación con el proyecto al compartir su experiencia y amor por la investigación. Fue un honor aprender de las mejores.

A mis amigas Pame, Dianita y Estefi por haber hecho de la universidad una de las mejores etapas, les agradezco por su paciencia y tantas experiencias juntas. A mis compañeros de aula y amigos, por cada día vivido, a David, por ser mi apoyo siempre. A mi amiga y compañera de tesis Erika, por el compromiso que le atribuimos a este trabajo. A la Ing. Dolores Robalino, Ing. Luis Marcial, a mis calificadores, Dra. Liliana Cerda e Ing. Isaác Molina, por su predisposición y colaboración durante este proceso.

Agradezco a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, por estos cinco años de experiencias enriquecedoras de la mano de talento humano de calidad.

¡GRACIAS A TODOS!

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I EL PROBLEMA

1.1	Tema.....	3
1.2	Justificación.....	3
1.3	Objetivos	4
1.3.1	Objetivo general	4
1.3.2	Objetivos específicos	4

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1	Antecedentes investigativos	5
2.2	Hipótesis	9
2.3	Señalamiento de variables de la hipótesis	10

CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	Materiales y métodos.....	11
3.1.1	Materia prima	11
3.1.2	Envasado y almacenamiento	11
3.1.3	Reactivos	11
3.1.4	Inoculación de patógenos	12
3.1.5	Aplicación de ozono gaseoso	12
3.1.6	Actividad antimicrobiana del O ₃	12
3.1.7	Diseño experimental.....	13
3.2	Análisis estadístico	13

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Actividad antimicrobiana de ozono gaseoso frente a microflora nativa	14
4.2	Estudio de la actividad antimicrobiana del ozono gaseoso frente a bacterias patógenas	17
4.3	Actividad antifúngica del ozono gaseoso	20
4.4	Verificación de hipótesis	22

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1	Conclusiones	23
5.2	Recomendaciones	23
Bibliografía		25
Anexos		31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mora de Castilla para comercialización	6
Figura 2. Acción del ozono sobre la pared celular bacteriana.	8
Figura 3. Mora de Castilla sana, sin defectos y sin pedicelos.....	11
Figura 4. Recuentos microbianos de microflora nativa	15
Figura 5. Colonias de mohos y levaduras.	31
Figura 6. Colonias de psicrótrofos	31
Figura 7. Colonias de aerobios mesófilos.	31
Figura 8. Modificación del pH de pulpa de mora de Castilla	32
Figura 9. Colonias de <i>S. enterica</i> en pulpa de mora de pH modificado.....	32
Figura 10. Colonias de <i>E. coli</i> inoculadas en pulpa de mora con pH modificado	32
Figura 11. Secado de moras de Castilla previa a la inoculación con <i>B. cinerea</i>	33
Figura 12. Desarrollo de <i>B. cinerea</i> en envases PET	33
Figura 13. Colonias de <i>B. cinerea</i> inoculadas en pulpa de mora con pH modificado	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Recuentos microbianos de <i>S. enterica</i> y <i>E. coli</i> en pulpa en mora control (sin aplicación de ozono) y tratada con 0,4 y 0,6 ppm de O ₃ , y almacenada durante 10 días a 6 ± 1 °C, sin control de la humedad relativa	19
Tabla 2. Recuentos de <i>B. cinerea</i> en mora control (sin aplicación de ozono) y tratada con 0,4 y 0,6 ppm de O ₃ , y almacenada durante 10 días a 6 ± 1 °C, sin control de la humedad relativa	20

RESUMEN

La mora de Castilla es una fruta desprovista de una capa externa que la proteja de daños físicos, mecánicos y microbiológicos. El ataque de microorganismos en esta fruta genera altos porcentajes de pérdidas y siendo Tungurahua una provincia con alta capacidad productiva de mora de Castilla se plantea la necesidad de estudiar el efecto antimicrobiano del ozono gaseoso (O₃) (0,4 y 0,6 ppm) en la calidad microbiológica de la misma. El efecto antimicrobiano se evaluó en microflora nativa (mohos y levaduras, psicrótrofos y aerobios mesófilos), mohos (*Botrytis cinerea*) y bacterias (*S. aureus*, *S. enterica* y *E.coli*). Los resultados muestran la efectividad antimicrobiana del O₃ al disminuir 1,64; 1,15 y 0,64 unidades logarítmicas de mohos y levaduras, psicrótrofos y aerobios mesófilos respectivamente. Para las dos bacterias Gram – (*S. enterica* y *E.coli*), se empleó jugo de mora con pH modificado obteniéndose reducciones de 1,08 (con 0,6 ppm de O₃) y 0,54 (con 0,4 ppm de O₃) unidades logarítmicas. Para el caso de *B. cinerea*, se observa la reducción de 0,25 unidades logarítmicas en el día diez luego de haber aplicado 0,6 ppm de O₃. Con respecto a *S. aureus* (bacteria Gram +) no se observó crecimiento, esto pudo haber ocurrido por la presencia de compuestos característicos de las moras, como por ejemplo flavonoides, que tienen poder antibacteriano.

Palabras clave: ozono gaseoso, mora de Castilla, *Rubus galucus* Benth, bacterias patógenas, actividad antifúngica.

ABSTRACT

Castilla blackberry is a fruit without external layer that protects it from physical, mechanical and microbiological damages. The attack of microorganisms in this fruit generates high percentages of losses and being Tungurahua a province with high Castilla blackberry productive capacity, it is necessary to study the antimicrobial effect of ozone gas (O₃) (0,4 and 0,6 ppm) in the microbiological quality of this fruit. The antimicrobial effect was evaluated in native microflora (molds and yeasts, psychrotrophs and aerobic mesophiles), molds (*Botrytis cinerea*) and bacteria (*S. aureus*, *S. enterica* and *E. coli*). The results show the antimicrobial effectiveness of O₃ by decreasing 1,64, 1,15 and 0,64 log units of molds and yeasts, psychrotrophs and mesophilic aerobic, respectively. For the two Gram (-) bacteria (*S. enterica* and *E. coli*), blackberry juice with modified pH was used, obtaining reductions of 1.08 (with 0.6 ppm of O₃) and 0.54 (with 0,4 ppm of O₃) log units. In the case of *B. cinerea*, the reduction of 0,25 log units was observed on day ten after having applied 0,6 ppm of O₃. With respect to *S. aureus* (Gram + bacteria) no growth was observed, this could have occurred due to the presence of characteristic compounds of blackberries, such as flavonoids, which have antibacterial power.

Key words: gaseous ozone, Castilla blackberry, *Rubus galucus* Benth, pathogenic bacteria, antifungal activity.

INTRODUCCIÓN

La mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) es considerada una fruta de importancia comercial ya que numerosas familias ecuatorianas se dedican a cultivarla, constituyendo su medio de subsistencia. En el país se cultivan 5200 hectáreas de mora, lo que equivale a una producción de entre 12 y 14 t/ha al año (**Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, 2013**). Además, tiene importancia nutricional por su alto contenido en vitaminas, minerales y compuestos bioactivos (**Ayala, Valenzuela y Bohórquez, 2013**). Por otro lado, su vida útil es muy corta debido a su susceptibilidad a los daños mecánicos, fisiológicos y microbiológicos. A pesar de esto, han sido pocos los estudios relacionados con los procesos de cultivo y el mantenimiento postcosecha de esta fruta (**Herforth, Theuvsen, Vásquez y Wollni, 2015**).

Las pérdidas postcosecha por daños microbiológicos en mora se deben principalmente al moho gris, causado por *Botrytis cinerea*, que genera pudrición en el fruto. Los conidios de este moho se diseminan por el aire y se alojan en tejidos vegetales, ocasionando lesiones que resultan en podredumbre, antes o después de la etapa de cosecha (**Arévalo, Díaz, Galindo y Rivero Cruz, 2011**). Además, la incorrecta manipulación del fruto por parte de los agricultores incrementa el riesgo de contaminación por patógenos a niveles tales que puede significar un riesgo para la salud de quienes lo consumen. Los principales reportes por intoxicación alimentaria están asociados a la presencia de *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Staphylococcus aureus*, microorganismos causantes de enfermedades gastroenterológicas y empleados como indicadores de calidad sanitaria en alimentos (**Food and Drug Administration FDA, 2014; Jara, 2016**).

Frente a esto y ante la necesidad de los consumidores por obtener productos alimenticios de calidad y con el mínimo procesamiento para su conservación, aparece la búsqueda de alternativas eficientes, no contaminantes. El ozono constituye una de estas alternativas ya que fue reconocido como seguro para el tratamiento de alimentos desde 1997 (GRAS: por sus siglas en inglés Generally recognised as safe) (**FDA, 2014; Glowacz, Colgan y Rees, 2014**).

Ante la presencia de microorganismos es común aplicar agentes químicos, aunque su uso puede generar residuos perjudiciales para quienes los consumen y, además, resistencia por parte de los microorganismos. Una de estas sustancias es el cloro, empleado en la industria alimentaria para la desinfección de frutas y hortalizas. Sin embargo, su uso genera productos carcinogénicos (trihalometanos y ácidos haloacéticos) que aparecen una vez que reacciona con materia orgánica (**Bessi, Debbabi, Grissa y Bellagha, 2014**). Además, en el caso específico de berries, no se utiliza el proceso de lavado previo a la comercialización ya que genera lesiones a sus tejidos y posterior ataque microbiano (**Karaca y Velioglu, 2007; Spotts y Cervantes, 1992**).

La aplicación de ozono en estado gaseoso o acuoso a bajas concentraciones y por periodos cortos de tiempo inhibe bacterias, mohos, levaduras y virus, extendiendo la vida útil de los alimentos tratados. Destruye la envoltura celular de estos microorganismos por la presencia de radicales hidroxilo y además no genera residuos tóxicos, lo que lo convierte en una alternativa amigable con el medio ambiente (**Guzel-Seydim, Greene, y Seydim, 2004; Horvitz y Cantalejo, 2014; Tzortzakis, Singleton y Barnes, 2007**). Pero, la efectividad del ozono dependerá, entre otros factores, de la superficie de contacto y la concentración de ozono (**Pérez, Sanz, Ríos, Olías y Olías, 1999**).

El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto antimicrobiano del ozono gaseoso sobre la microflora nativa (mohos y levaduras, psicrótrofos y aerobios mesófilos) e inoculada (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* y *Botrytis cinerea*) en moras de Castilla (*Rubus glaucus* Benth).

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 Tema

Efecto del ozono gaseoso sobre la calidad microbiológica de moras de Castilla (*Rubus glaucus* Benth).

1.2 Justificación

Tungurahua tiene la producción más alta de entre todas las provincias productoras de mora del callejón Interandino en Ecuador, aunque presenta un 30% de pérdidas del producto en etapas postcosecha, lo cual impide su exportación (**Mosquera et al., 2017**). Estas pérdidas ocurren principalmente debido al enmohecimiento de la fruta a causa de *B. cinerea*. Adicionalmente, la incorrecta manipulación de los productos alimenticios ocasiona intoxicaciones en quienes los consumen y según la FDA, los principales reportes por intoxicación se asocian a la presencia de *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Staphylococcus aureus*, cuyos síntomas más frecuentes son vómito, náuseas y diarreas sangrantes (**Arévalo Peñaranda et al., 2011; Cabezas, 2017; FDA, 2014; Jara, 2016; Lavigne, Tiene, Jeandrot y Lechiche, 2008**).

Una opción que manejan los agricultores es el uso de agroquímicos para el control de enfermedades en sus cultivos, pero lo hacen de forma indiscriminada. Esto resulta perjudicial para los consumidores principalmente por la presencia de sustancias tóxicas con características cancerígenas. Entonces, es necesaria la búsqueda de alternativas emergentes que al mismo tiempo que disminuyan la carga microbiana en frutas, conserven sus características organolépticas y permitan prolongar su vida de anaquel (**Khadre y Yousef, 2001; Mahapatra, Muthukumarappan y Julson, 2005**).

Con respecto a lo expuesto, se conoce que el ozono se ha empleado de forma segura como agente antimicrobiano en el tratamiento de productos alimenticios debido a su acción rápida y la ausencia de subproductos tóxicos. Es considerado un agente

antimicrobiano de amplio espectro ya que elimina eficientemente microorganismos patógenos y esporulantes (Mari, Bertolini y Pratella, 2003).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

- Estudiar el efecto del ozono gaseoso sobre la calidad microbiológica de moras de Castilla (*Rubus glaucus* Benth).

1.3.2 Objetivos específicos

- Evaluar la actividad antimicrobiana del ozono gaseoso frente a la microflora nativa (aerobios mesófilos, psicrótrofos y mohos y levaduras) de la mora de Castilla.
- Evaluar la actividad del ozono gaseoso frente a bacterias patógenas (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*).
- Evaluar la actividad antifúngica del ozono gaseoso frente a *Botrytis cinerea*.

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes investigativos

2.1.1 MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus* Benth)

2.1.1.1 Situación de la mora de Castilla en Ecuador

La producción y comercialización de mora de Castilla en Ecuador constituye una estrategia económica para la supervivencia de entre 15000 y 20000 pequeños agricultores que se dedican a esta actividad. La mayor producción se localiza en la región Interandina en las provincias de Tungurahua, Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha, Imbabura y Carchi. Tungurahua aporta el 41% de la producción total de la fruta (**Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca, 2014**).

2.1.1.2 Factores que afectan la vida útil de la mora de Castilla

Este fruto y otras berries a diferencia de algunas frutas son altamente perecederas, pues carecen de una capa externa (epicarpio) que las proteja de daños físicos, mecánicos y microbiológicos. Además, están consideradas dentro del grupo de “frutas pequeñas” que presentan vida corta de anaquel debido a la gran superficie expuesta en relación a su volumen, lo cual favorece la deshidratación, los daños físicos y mecánicos y los ataques microbiológicos (**Barth, Zhou, Mercier y Payne, 1995; Calero, 2010; Horvitz y Cantalejo, 2014**). De hecho, la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2427, establece que, la mora de Castilla para comercialización no debe presentar cambios en sus cualidades luego de su recolección, esto quiere decir que debe estar en un estado de madurez entre 3 y 5 (color rojo brillante a rojo intenso) y libre de agentes microbianos (**Figura 1**) (**INEN 2427, 2010**).



Figura 1. Mora de Castilla para comercialización (**Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2010**).

Según **Ayala, Valenzuela y Bohórquez (2013)**, cualquier daño antes mencionado genera cambios fisicoquímicos en el fruto, con lo cual disminuye su aceptabilidad en el mercado y por ende genera pérdidas económicas.

2.1.2 Métodos alternativos para la desinfección de frutas y hortalizas

La industria alimenticia emplea diferentes métodos para controlar el deterioro de los productos y prolongar su vida útil, dentro de los cuales se encuentran las atmósferas controladas y modificadas y el uso de agentes químicos como los compuestos clorados. Sin embargo, debido a los inconvenientes ya mencionados de generación de residuos nocivos para quienes consumen estos alimentos y la resistencia de los microorganismos frente a los productos químicos, se buscan alternativas efectivas, no contaminantes y que contribuyan al control microbiológico en alimentos. Una de estas alternativas es el uso de ozono, aplicado en forma gaseosa o en el agua de lavado (**Glowacz et al., 2014; Xu, 1999**).

2.1.2.1 Ozono

Su estructura triatómica de alta energía le confiere mayor efectividad antimicrobiana en comparación al uso de desinfectantes comunes (es 1,5 veces más efectivo que el cloro). A nivel industrial se promueve su aplicación debido a su elevada capacidad oxidativa, la rápida acción a bajas concentraciones, la ausencia de residuos tóxicos (se descompone rápidamente a O_2) y el bajo costo (**Horvitz y Cantalejo, 2014; Pérez, Sanz, Ríos, Olías y Olías, 1999; Xu,**

1999). Adicionalmente, tiene la capacidad de destruir pesticidas y residuos químicos (Langlais, Reckhow y Brink, 1991).

Por otro lado, se menciona como desventaja su alta inestabilidad (la vida media del ozono en agua destilada a 20°C es de alrededor de 20 a 30 min) (Khadre y Yousef, 2001), por lo cual es necesario generarlo en el lugar donde se requiere la aplicación, ya que no es posible almacenarlo (Horvitz y Cantalejo, 2014; Salama, 2002). Además, al ser un oxidante fuerte, el ozono puede reaccionar con el tejido humano, por lo que el límite de exposición a corto plazo determinado por la Administración de Seguridad y Salud Ocupacional de los Estados Unidos (US-OSHA) para una jornada de trabajo de 8 horas/día corresponde a 0,1 ppm sin sufrir afecciones graves en la salud, mientras que concentraciones superiores (\geq a 50 ppm) pueden llegar a ser letales (Mahapatra, Muthukumarappan y Julson, 2005).

2.1.2.2 Formas de aplicación del ozono

El ozono puede ser empleado tanto en forma gaseosa como acuosa. El tratamiento a aplicar dependerá del producto a tratar y, en el caso de frutos, las consideraciones varían con su tipo e incluso según la especie dentro de un grupo determinado. De manera general, ambos tratamientos resultan efectivos al momento de reducir la carga microbiana natural o inoculada y la dosis aplicada será proporcional a la dosis de inóculo empleada, considerando que dosis muy bajas no logran una reducción de los recuentos microbianos y, por el contrario, dosis elevadas generan daños fisiológicos al producto tratado (Daş, Gürakan y Bayindirli, 2006; Horvitz y Cantalejo, 2014; Rojas, 2011).

- El ozono gaseoso tiene una vida media más larga, alto poder inhibitorio contra varios microorganismos y sustancias como el etileno, pero como desventaja se menciona su baja eficiencia contra esporas.
- El O₃ acuoso es usado como alternativa a soluciones cloradas (agente sanitizante comercial) para la desinfección de frutas y hortalizas, con la

diferencia que no afecta la calidad de la fruta ni a quienes la consumen. Por otro lado, una desventaja es la baja estabilidad de la molécula en el agua, pues la presencia de sustancias orgánicas o variaciones de pH aceleran su descomposición a oxígeno (Bessi, Debbabi, Grissa, y Bellagha, 2014; Horvitz y Cantalejo, 2014).

2.1.2.3 Acción antimicrobiana del ozono

El O_3 oxida inicialmente los componentes de la pared celular microbiana para luego oxidar lípidos, proteínas, enzimas y ácidos nucleicos. Genera cambios en la permeabilidad de las membranas celulares y la posterior muerte celular (Figura 2) (Daş, Gürakan y Bayindirli, 2006). La presencia de virus, bacterias u hongos genera estrés celular, lo cual cambia la electronegatividad de la célula y el ozono posee un tercer átomo de oxígeno (es decir tiene una carga eléctrica libre) que busca equilibrarse eléctricamente con otro material con una carga desequilibrada. Las células enfermas, los virus, las bacterias dañinas y otros patógenos presentan esa carga y atraen al O_3 mientras que las células sanas normales no pueden reaccionar con el ozono o sus subproductos, pues su carga eléctrica no se ha visto desequilibrada y además presenta un potente sistema enzimático (Mahapatra et al., 2005).

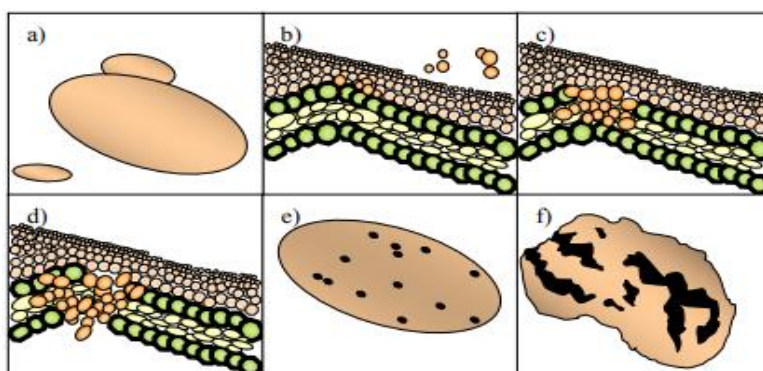


Figura 2. Acción del ozono sobre la pared celular bacteriana: a) El ozono ataca directamente a la pared celular; continúa con b) glicoproteínas, glucolípidos o aminoácidos, c) como la acción es rápida pronto se observan poros en la pared celular, d) la descomposición celular continúa, e) hasta

ocasionar varias perforaciones en la membrana, para finalmente; f) desintegrar a la célula generando lisis (**Rojas, 2011**).

Además, la efectividad del ozono dependerá de factores como la temperatura, la humedad relativa, el pH y, sobre todo, de la superficie de aplicación y del microorganismo al que se pretende inhibir (**Pérez, Sanz, Ríos, Olías, y Olías, 1999**). Existe una relación inversa entre temperatura y estabilidad de la molécula de ozono: a bajas temperaturas la molécula es más estable y existen reportes sobre su efectividad a 5 °C, temperatura ideal para prevenir esporulación de mohos en cítricos (**Palou, Crisosto, Smilanick, Adaskaveg y Zoffoli, 2002**).

Una de las causas del alto porcentaje de pérdidas postcosecha de mora es la proliferación de microorganismos sobre tejido vegetal dañado. En este sentido, se ha intensificado el estudio de la actividad antimicrobiana del ozono contra hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea*, *Mucor piriformis*, *Penicillium expansum* (**Spotts y Cervantes, 1992**), *Lasiodiplodia sp* (**Whangchai, Saengnil y Uthaibutra, 2006**), *Cladosporium sp*, y *Aspergillus niger* (**Fan, Song, Hildebrand y Forney, 2001**). Asimismo, se reportan resultados sobre inhibición en bacterias como *E. coli*, *B. cereus* (**Akbas y Murat, 2008**), *S. enteritidis* (**Daş, Gürakan y Bayindirli, 2006**), *S. aureus* y *L. monocytogenes* (**Yuk et al., 2006**), bacterias relacionadas generalmente con enfermedades infectocontagiosas que resultan, en algunos casos, letales para el hombre.

2.2 Hipótesis

Hipótesis nula

La aplicación de ozono gaseoso no afecta la calidad microbiológica de moras de Castilla (*Rubus glaucus* Benth).

Hipótesis alternativa

La aplicación de ozono gaseoso afecta la calidad microbiológica de moras de Castilla (*Rubus glaucus* Benth).

2.3 Señalamiento de variables de la hipótesis

Variable independiente

Concentración de ozono gaseoso.

Variable dependiente

Crecimiento de aerobios mesófilos, psicrótrofos, mohos y levaduras, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* y *Botrytis cinerea*.

CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Materia prima

Se emplearon 15 kg de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) adquiridos en un mercado local. Para el estudio se utilizó solo fruta sana y sin defectos a la que se le eliminaron los pedicelos (**Figura 3**). La fruta se dividió en tres grupos: T1: control (sin tratamiento de ozono), T2: aplicación de 0,4 ppm de O₃ gaseoso durante 3 min y T3: aplicación de 0,6 ppm de O₃ gaseoso durante 3 min.



Figura 3. Mora de Castilla sana, sin defectos y sin pedicelos.

3.1.2 Envasado y Almacenamiento

Las moras de cada grupo (control, 0,4 y 0,6 ppm de O₃ gaseoso) fueron colocadas en envases de tereftalato de polietileno (PET) (100 ± 10 g/envase) y almacenadas durante 10 días a 6 ± 1°C, sin control de la humedad relativa.

3.1.3 Reactivos

- Agua de peptona tamponada (Difco, Francia)
- Medios de cultivo:
 - Plate Count Agar (PCA) (Difco, Francia)
 - Agar Sabouraud dextrosa con cloramfenicol (Acumedia, USA)
 - Agar Eosina azul de metileno, levine (Acumedia, USA)

- Agar Baird Parker (Acumedia, USA) suplementado con Telurito
- Bacto® agar SS (Becton Dickinson and Company, USA)

3.1.4 Inoculación de patógenos

Las moras colocadas en envases de PET se dividieron en tres grupos para la inoculación con 10^4 ufc•g⁻¹ de *E. coli* (ATCC 25922, USA), *S. entérica* (ATCC 9842, USA) y *S. aureus* (ATCC 25923, USA) y con 10^4 conidios•ml⁻¹ de *B. cinerea* (Bioseb Organics Cía. Ltda., Ecuador), considerando una relación de 100 µl de suspensión de microorganismo por cada 10 g de fruta. Antes de la inoculación con *Botrytis cinerea*, la fruta se desinfectó con etanol al 70 % (p/v) por 10 segundos, se lavó con agua destilada estéril y se secó a temperatura ambiente. La inoculación se realizó 24 h antes de la aplicación del tratamiento con ozono gaseoso.

3.1.5 Aplicación de ozono gaseoso

Pasadas 24 horas de la inoculación con patógenos se aplicaron 0,4 y 0,6 ppm de ozono gaseoso por un período de tres minutos en una cámara hermética (PRECISION, USA). Se utilizó 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).

3.1.6 Actividad antimicrobiana del O₃

Diariamente se controlaron los envases de forma visual para detectar la aparición de síntomas de desarrollo microbiano. Además, el día 1 y cada 3 días durante el almacenamiento se realizaron recuentos de microorganismos aerobios mesófilos (norma INEN 1529-5:2006 (INEN, 2006), psicrótrofos (ICMSF, 1982) y de mohos y levaduras (norma INEN 1529-10:2013, 2013)). Para los análisis, se homogeneizaron 5 g de muestra y 45 ml de agua de peptona estéril durante 2 minutos a 200 rpm (Stomacher 400, Seward, Inglaterra) y se realizaron diluciones seriadas. La siembra para el recuento de aerobios mesófilos y psicrótrofos se realizó en profundidad con agar PCA (Difco, Francia). Las placas de Petri fueron incubadas

durante 48 horas a 35°C para aerobios mesófilos y durante 7 días a 7°C para psicrótrofos (ICMSF, 1982).

En el caso de mohos y levaduras el medio de cultivo fue Agar Sabouraud dextrosa con cloranfenicol (Acumedia, USA). La siembra se realizó en superficie y las placas se incubaron durante 5 días a 25°C.

Además, se sembraron en superficie 100 µl de cada dilución en los siguientes medios de cultivo: Eosina azul de metileno, levine (Acumedia, USA) (*E. coli*), Agar Baird Parker suplementado con telurito (Acumedia, USA) (*S. aureus*), Agar Sabouraud dextrosa con cloramfenicol (Acumedia, USA) (*B.cinerea*), Bacto® agar SS (Becton Dickinson and Company, USA) (*S. enterica*).

Las muestras inoculadas con *E. coli*, *S. enterica* y *S. aureus* se incubaron a 37 °C durante 48 h y las muestras inoculadas con *B. cinerea* se incubaron a 25°C durante 5 días.

3.1.7 Diseño experimental

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con tres réplicas por tratamiento y por microorganismo estudiado, considerando cada envase como la unidad experimental.

3.2 Análisis estadístico

Los resultados fueron comparados mediante análisis de varianza y test de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0,05$), utilizando el programa estadístico IBM SPSS Statics Version 24.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Actividad antimicrobiana de ozono gaseoso frente a microflora nativa

La microflora nativa o conjunto de microorganismos presentes de manera natural en la mora de Castilla son de tipo aerobios mesófilos, psicrotrofos y mohos y levaduras. Su presencia determina la calidad sanitaria del producto y la manipulación a la que ha sido sometido (**Zaragoza y Derrickson, 2011**).

En la **Figura 4** se muestran los recuentos microbianos ($\log(\text{ufc}\cdot\text{g}^{-1})$) de microflora nativa durante los 10 días de evaluación en moras de Castilla control (sin aplicación de ozono) y tratada con 0,4 y 0,6 ppm de O_3 .

En todos los grupos estudiados se observó crecimiento microbiano. Sin embargo, para el caso de mohos y levaduras (**Figura 4a**) la reducción de carga microbiana entre días y entre tratamientos en los grupos tratados con ozono fue mayor en comparación con el control. La **Figura 4a** muestra que para los días 4 y 10 la concentración de 0,4 ppm de O_3 logró una mayor reducción de carga microbiana comprendida entre 0,63 a 1,29 unidades logarítmicas, mientras que para los días 1 y 10, la concentración de 0,6 ppm de O_3 logró un efecto similar con reducciones mínima y máxima de 0,07 y 1,64 unidades logarítmicas respectivamente, en comparación al control.

Los resultados evidenciaron la efectividad antimicrobiana del ozono, lo cual coincide con los resultados obtenidos por **Pretell, Marquez, y Siche (2016)**, en granada, quienes indicaron que luego de la aplicación de ozono gaseoso (30-60 días con aplicaciones de entre 30-72 ppm de O_3) los conteos de mohos y levaduras se redujeron en 1 unidad logarítmica. En adición, **Lombardo et al., (2015)**, mencionaron la importancia de la relación inversa existente entre el tiempo de aplicación y la concentración de ozono para el caso específico de mohos y levaduras en alcachofas y reportaron la disminución de 0,21 unidades logarítmicas luego de aplicar 2 ppm de O_3 por 11 h a 4 °C.

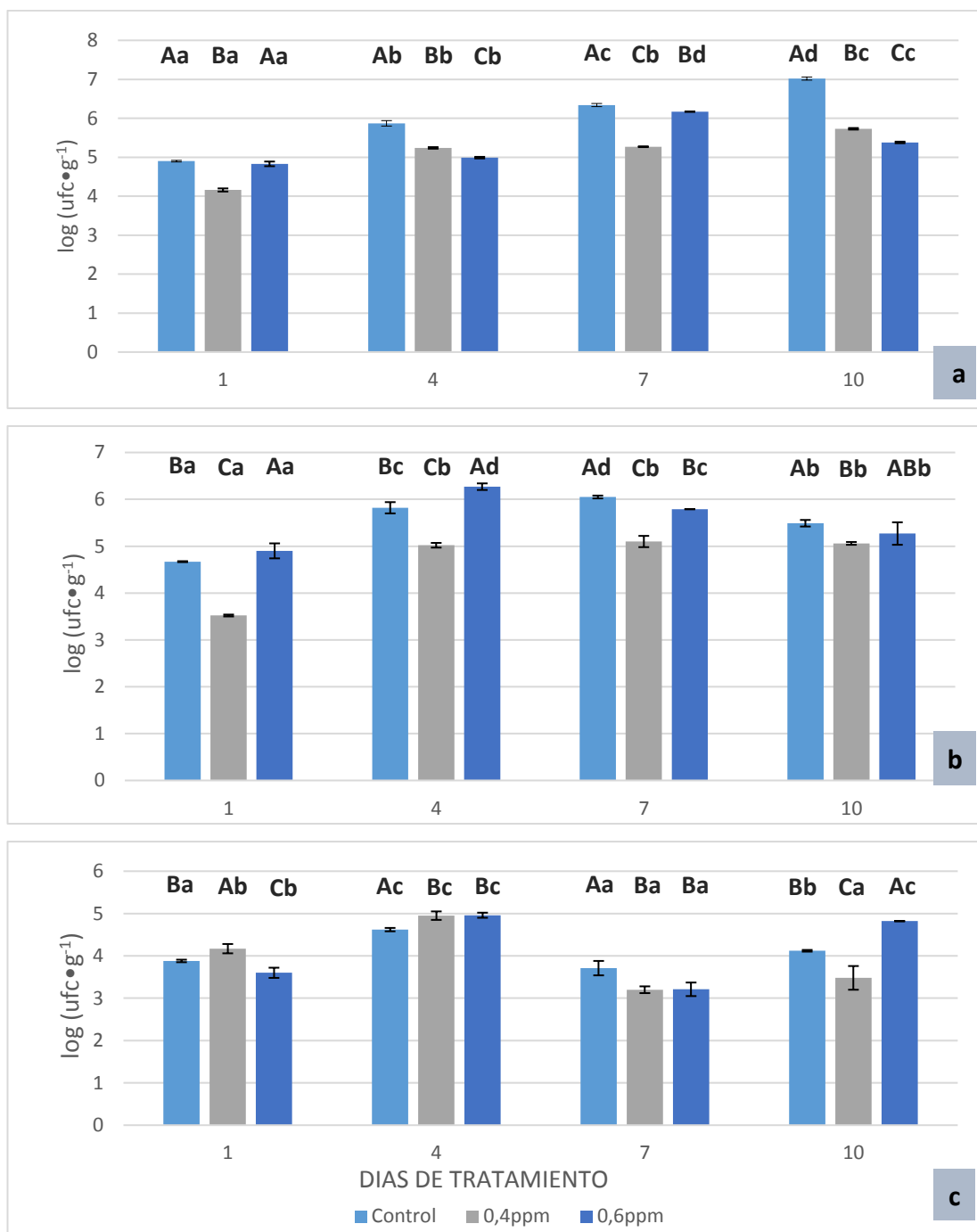


Figura 4. Recuentos microbianos de microflora nativa (a) mohos y levaduras (b) psicrótrofos y (c) aerobios mesófilos) en mora de Castilla control (sin aplicación de ozono) y tratada con 0,4 y 0,6 ppm de O₃ y almacenada durante 10 días a 6 ± 1°C.

Nota: Los valores representan la media (n=3) del log (ufc•g⁻¹). Las barras de error representan el IC (95%) de la media. Letras mayúsculas diferentes representan, para cada día, diferencias significativas (p < 0,05) entre los tratamientos. Letras minúsculas diferentes indican, para cada tratamiento, diferencias significativas (p < 0,05) entre los días de evaluación.

Asimismo, el crecimiento microbiano para psicrótrofos difirió con respecto al control y a los tratamientos con ozono entre días y entre tratamientos (**Figura 4b**). La concentración de 0,4 ppm de O₃ presentó mejor actividad antimicrobiana, reduciendo la población de estos microorganismos en 1,15 unidades logarítmicas con respecto al control, lo cual coincide con un estudio realizado sobre pimiento rojo cortado al aire libre, en donde luego de aplicar 0,7 ppm de O₃ por 3 min se redujo la población de psicrótrofos en 3,3 unidades logarítmicas (**Horvitz y Cantalejo, 2012**). De la misma forma **Selma, Beltrán, Chacón-Vera y Gil (2006)**, reportaron la disminución de 0,7 unidades logarítmicas en la población de psicrótrofos en patatas luego de aplicar 5 ppm de O₃ por 1 min.

En microorganismos aerobios mesófilos el crecimiento fue evidente en todos los días y tratamientos (**Figura 4c**). Con 0,6 ppm de ozono en los días 1 y 7, se lograron reducciones microbianas significativas de 0,28 y 0,5 unidades logarítmicas respectivamente y, a los días 7 y 10, 0,4 ppm también logró reducir recuentos microbianos comprendidos entre 0,51 y 0,64 unidades logarítmicas con respecto al control, lo cual coincide con estudios realizados por **Horvitz y Cantalejo (2007, 2012)**, quienes reportaron la disminución de aproximadamente 1 unidad logarítmica para aerobios mesófilos en pimiento rojo mínimamente procesado luego de aplicar 0,3 ppm de O₃ por 30 min, mientras que al aumentar la dosis (0,7 ppm de O₃ por 3 min) obtuvieron reducciones logarítmicas de 2,5 con respecto al control.

En los días 1 y 4 para psicrótrofos y 4 y 10 para aerobios mesófilos el tratamiento de 0,6 ppm proporciona recuentos microbianos mayores al control, asimismo ocurre con la concentración de 0,4 ppm en los días 1 y 4 de aerobios mesófilos. Esto pudo deberse a que la temperatura de almacenamiento para los análisis ($6 \pm 1^\circ\text{C}$) benefició el crecimiento de psicrótrofos, pues se desarrollan a menos de 7°C (**Novoa y Restrepo, 2007**) y, a que el O₂ que se generó luego de la descomposición de la molécula de ozono posiblemente promovió el crecimiento de aerobios mesófilos que requieren de este compuesto para su crecimiento. Estos resultados coinciden con los reportados por **Zorlugenç, Kiroğlu Zorlugenç, Öztekin y Evliya (2008)**, quienes no observaron inactivación de aerobios mesófilos en higos secos luego de aplicar $13,8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ y $1,7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de ozono gaseoso y acuoso respectivamente durante 7,5 minutos.

4.2 Estudio de la actividad antimicrobiana del ozono gaseoso frente a bacterias patógenas

Para el crecimiento de bacterias patógenas fue necesario ajustar las condiciones experimentales debido a que el pH de la mora de Castilla no supera el valor de 3 y, por lo tanto, es inferior a los valores mínimos de pH para el crecimiento de *E.coli*, *S. aureus*, y *S. enterica* (4,4; 4 y 3,8 respectivamente (**Chanaguano, 2016; Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2013a, 2013b, 2013c**)). Por esto, para verificar el crecimiento de estos microorganismos sin interferencia del pH se trituró la mora y se modificó el pH de la pulpa obtenida hasta $4,5 \pm 0,1$ con hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 M. Además, se realizaron pruebas de crecimiento en mora entera, en la pulpa sin modificar el pH y en la pulpa con pH modificado y solo se observó crecimiento en el último tratamiento. La pulpa de mora con pH de 4,5 e inoculada con 10^4 ufc•ml⁻¹ con los microorganismos mencionados se colocó en frascos estériles para la aplicación de los tratamientos de ozono correspondientes (0 (control), 0,4 y 0,6 ppm de O₃).

El ozono tiene la capacidad de oxidar las paredes celulares de bacterias Gram negativas (*S. enterica*, *E. coli*) así como de bacterias Gram positivas (*S. aureus*) y, de esta manera, inhibe el crecimiento de estos microorganismos (**Horvitz y Cantalejo, 2014**). En el estudio realizado no hubo crecimiento de *S. aureus* en ninguno de los tratamientos y en ninguna fecha de evaluación. Esto podría deberse a los flavonoides propios de la mora que, según **Alcaráz, Blanco, Puig, Tomás y Ferretti (2000)**, lograron inhibir el crecimiento de *S. aureus* en un 96,86%. Este efecto antibacteriano fue descrito también por **Soto (2014)**, quien empleó extractos de mora para inhibir el crecimiento de esta bacteria.

Por otro lado, en todos los tratamientos se observó crecimiento tanto de *E. coli* como de *S. enterica* (**Tabla 1**). Para *S. enterica* en los días 1, 4 y 7 el crecimiento microbiano fue mayor en los tratamientos con ozono. Mientras que, para el día 10 en los tratamientos con ozono (0,4 y 0,6 ppm de O₃) se obtuvieron reducciones de 0,63 y 1,08 unidades logarítmicas respectivamente con respecto al control.

Para *E. coli* los resultados fueron significativos en el último día de evaluación, donde se obtuvieron disminuciones logarítmicas de 0,54 y 0,45 para 0,4 y 0,6 ppm de O₃ con respecto al control respectivamente.

La efectividad del ozono frente a estas mismas bacterias fue reportada por **Bialka y Demirci (2007)**, con disminuciones en fresas de 2,60 y 2,96 unidades logarítmicas para *Salmonella* y *E. coli* respectivamente y la reducción de 3,55 y 3,75 unidades logarítmicas para los mismos microorganismos en frambuesas luego de aplicar ozono de forma continua y presurizado (5% w/w) durante 64 minutos.

Desde el punto de vista bioquímico, las paredes celulares de estas dos bacterias (Gram negativas) son ricas en compuestos lipídicos (lipoproteínas y ácidos grasos) lo cual debió beneficiar la acción del ozono que oxida toda materia orgánica interfiriendo así en el metabolismo bacteriano (**Lillard, 2004**).

Sin embargo, la variación en los resultados pudo deberse a la superficie expuesta para la aplicación del ozono en los frascos PET para la pulpa de mora, pues la estructura de estos frascos no permitió que el O₃ incida en la totalidad de la pulpa de mora y según **Mahapatra, Muthukumarappan y Julson (2005)**, el ozono actúa eficientemente contra los microorganismos que se hallan expuestos, es decir, en contacto directo con el gas, pues este se descompone en cuestión de segundos.

Tabla 1. Recuentos microbianos de *S. enterica* y *E. coli* en pulpa en mora control (sin aplicación de ozono) y tratada con 0,4 y 0,6 ppm de O₃, y almacenada durante 10 días a 6 ± 1°C, sin control de la humedad relativa.

Día	Recuentos microbianos (log (ufc·ml ⁻¹))					
	<i>S. enterica</i>			<i>E. coli</i>		
	Control	0,4 ppm	0,6 ppm	Control	0,4 ppm	0,6 ppm
1	5,48 ± 0,01 A b	5,47 ± 0,12 A b	5,88 ± 0,02 B b	4,23 ± 0,13 A a	4,27 ± 0,08 A a	4,36 ± 0,06 A a
4	6,50 ± 0,08 A a	6,40 ± 0,04 A d	6,80 ± 0,12 B a	4,20 ± 0,07 A a	4,30 ± 0,03 A a	4,20 ± 0,04 A a
7	4,65 ± 0,06 A c	5,75 ± 0,06 C c	5,49 ± 0,20 B c	3,99 ± 0,02 A b	3,95 ± 0,04 A b	3,65 ± 0,11 B b
10	4,08 ± 0,14 A d	3,45 ± 0,17 B a	3,00 ± 0,00 C d	3,50 ± 0,08 A c	2,96 ± 0,14 B c	3,05 ± 0,12 B c

Nota: Los valores mostrados corresponden a la media ± la desviación estándar(n=3).

Letras mayúsculas diferentes representan, para cada día, diferencias significativas (p < 0,05) entre los tratamientos

Letras minúsculas diferentes indican, para cada tratamiento, diferencias significativas (p < 0,05) entre los días de evaluación.

4.3 Actividad antifúngica del ozono gaseoso

El potencial antifúngico del ozono ha sido ampliamente estudiado en varios productos hortofrutícolas, reportándose disminución de desarrollo fúngico en: zanahorias (Sharpe et al., 2009), tomates (Tzortzakis et al., 2011), limones, toronjas y naranjas (Smilanick, Margosan y Mlikota Gabler, 2002), fresas (Pérez, Sanz, Ríos, Olías y Olías, 1999), moras (Barth, Zhou, Mercier y Payne, 1995) y kiwi, entre otros (Minas, Karaoglanidis, Manganaris y Vasilakakis, 2010).

Los resultados de actividad antifúngica del ozono para los tres tratamientos en estudio se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Recuentos de *B. cinerea* en mora control (sin aplicación de ozono) y tratada con 0,4 y 0,6 ppm de O₃, y almacenada durante 10 días a 6 ± 1 °C, sin control de la humedad relativa.

Día	Recuentos microbianos (log (ufc•g ⁻¹))		
	Control	0,4 ppm	0,6 ppm
1	5,02 ± 0,11 A ab	5,45 ± 0,09 B a	5,36 ± 0,06 B a
4	4,79 ± 0,06 A ac	5,03 ± 0,08 B b	4,81 ± 0,06 A b
7	5,23 ± 0,16 A a	5,12 ± 0,10 A b	5,17 ± 0,15 A a
10	4,87 ± 0,04 A bc	5,01 ± 0,13 A b	4,62 ± 0,12 B b

Nota: Los valores mostrados corresponden a la media ± la desviación estándar(n=3).

Letras mayúsculas diferentes representan, para cada día, diferencias significativas (p < 0,05) entre los tratamientos. Letras minúsculas diferentes indican, para cada tratamiento, diferencias significativas (p < 0,05) entre los días de evaluación.

En los días 1 y 4, la actividad antifúngica del ozono en la mora de Castilla resultó no significativa, pues se observó un mayor crecimiento en los tratamientos con ozono respecto al control. En el día 7, se observó disminución de crecimiento microbiano en la fruta tratada con ozono y a el día 10, la dosis de 0,6 ppm de O₃ fue la que permitió obtener una mayor reducción microbiana (0,25 unidades logarítmicas) con respecto al control.

La aplicación de 0,4 y 0,6 ppm de ozono no proporcionó resultados significativos en contra de *B. cinerea* en mora, pero en estudios similares (**Barth, Zhou, Mercier y Payne, 1995**) indicaron la eficiencia del O₃ frente a este moho (flujo constante de 0,1 y 0,3 ppm de O₃ a 2 °C durante 12 días). Estas diferencias en los resultados pueden deberse a las condiciones en las que se ejecutaron los análisis, temperatura y la frecuencia de aplicación del gas.

Adicionalmente, la superficie irregular de esta fruta dificultó la acción del ozono. Según **Glowacz, Colgan y Rees (2014)**, un factor que incide sobre la efectividad del O₃ es la superficie de contacto, pues una superficie porosa permite el alojamiento del microorganismo y lo protege de la acción del ozono. De la misma manera, se debe considerar que la eficacia del O₃ varía de acuerdo a la concentración de inóculo inicial y dosis de O₃ aplicado (concentración y tiempo) (**Glowacz et al., 2014**).

Así lo demuestran ensayos realizados sobre tomates, fresas, uvas de mesa y ciruelas inoculadas con concentraciones específicas de *B. cinerea* en donde luego de aplicar 0,1 ppm de O₃ (a 13 °C, 95% de humedad relativa y 13 días de almacenamiento) los investigadores reportaron variación en la efectividad del ozono debida al producto tratado (**Tzortzakis, Singleton, y Barnes, 2007**). De igual forma, **Palou, Crisosto, Smilanick, Adaskaveg y Zoffoli, (2002)**, concluyeron que 0,3 ppm de ozono no resultaron efectivas para reducir el crecimiento de este mismo moho sobre uvas de mesa, mientras que a altas concentración (>3 ppm) redujeron recuentos fúngicos y además levaduras (**Valdiviezo, Pretell y Marquez, 2016**).

Sin embargo, **Tzortzakis et al., (2011)**, manifestaron que no siempre la dosis más alta de ozono resulta en la eliminación de microorganismos, al contrario, podría ocasionar lesiones en la epidermis de la fruta y contribuir a la proliferación de hongos, lo cual pudo ocurrir durante el análisis, pues se observó un aumento de recuentos fúngicos en los tratamientos con ozono en comparación al control.

Los resultados obtenidos coinciden con investigaciones realizadas sobre la efectividad del ozono frente a bacterias y hongos, donde **Margulis, Gómez y Dante (2011)** y **Pontón (2008)**, manifestaron que se requiere de una mayor concentración de

ozono para inhibir hongos que para inhibir bacterias ($60 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$ durante 5 minutos inhibieron el 100% de bacterias y la misma dosis durante 10 minutos inhibió el 91% de esporas fúngicas).

Esto debido a que, por bibliografía se conoció que la pared celular de mohos está compuesta por glucanos, glucosamina, glicoproteínas y quitina, esta última (además es componente de exoesqueletos de insectos) ocupa entre el 10 y 20% de la pared celular fúngica lo que hace que se requiera de una dosis mayor de O_3 o mayor tiempo de exposición para generar la des N-des acetilación de la quitina (**Kabal et al., 2001**).

4.4 Verificación de hipótesis

Según los resultados obtenidos se acepta la hipótesis alternativa mostrando que el ozono gaseoso afectó la calidad microbiológica de moras de Castilla (*Rubus glaucus* Benth).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- La efectividad antimicrobiana del ozono gaseoso fue estudiada frente a microflora nativa de moras de Castilla, es así que 0,4 ppm del gas proporcionaron reducciones evidentes, durante los últimos días de evaluación, en el crecimiento de mohos y levaduras, psicrótrofos y aerobios mesófilos.
- Se evaluó la actividad antibacterial del ozono frente a *E. coli* y *S. enterica*, para ambos casos, luego de la modificación del pH, 0,4 y 0,6 ppm de O₃ fueron efectivos al momento de inhibir el crecimiento de estos microorganismos.
- La concentración de 0,6 ppm de O₃ lograron la reducción en el crecimiento microbiano de *B. cinerea* en moras de Castilla, esto se evidenció en los dos últimos días de tratamiento.
- Se destaca la eficiencia y simplicidad del tratamiento con ozono gaseoso, además de la ausencia de residuos tóxicos una vez finalizado el tratamiento.

5.2 Recomendaciones

- Estudiar el efecto antimicrobiano de los componentes propios de la mora de Castilla, dado que no se encontró crecimiento bacteriano de *S. aureus*.
- Comprobar el efecto antimicrobiano del ozono sobre productos hortofrutícolas autóctonos susceptibles a ataques microbiológicos.

- Ensayar diferentes dosis y formas de aplicación del ozono (gaseoso o acuoso) sobre la misma fruta para determinar la incidencia de estas variaciones.
- Implementar un método que contribuya a mantener la estabilidad de la molécula de ozono (control de la temperatura y humedad relativa) y comprobar la incidencia que estas variantes tienen sobre los resultados.
- Evaluar la acción fungicida o fungistática del ozono frente a productos hortofrutícolas autóctonos.
- Realizar estudios moleculares para determinar la incidencia del O₃ en la presencia de sustancias relacionadas con la expresión de genes implicados en la transducción de señales y con vías de defensa de productos hortofrutícolas.

Bibliografía

- Akbas, M. Y. y Murat, O. (2008). Effect of gaseous ozone on microbial inactivation and sensory of flaked red peppers. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 1657–1662.
- Alcaráz, L. E., Blanco, S. E., Puig, O. N., Tomás, F., y Ferretti, F. H. (2000). Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Theoretical Biology*, 205(2), 231–240.
- Arévalo Peñaranda, E., Díaz Jiménez, A. L., Galindo Álvarez, J. R., y Rivero Cruz, M. R. (2011). Manejo fitosanitario del cultivo del mora (*Rubus glaucus* Benth) Medidas para la temporada invernal. *Ica*, 32.
- Ayala, L. C., Valenzuela, C. P., y Bohórquez, Y. (2013). Caracterización fisicoquímica de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) en seis estados de madurez. *Bioteología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(2), 10–18.
- Barth, M. M., Zhou, C., Mercier, J., y Payne, F. A. (1995). Ozone storage effects on anthocyanin content and fungal growth in blackberries. *Journal of Food Science*, 60(6), 1286–1288.
- Bessi, H., Debbabi, H., Grissa, K., y Bellagha, S. (2014). Microbial reduction and quality of stored date fruits treated by electrolyzed water. *Journal of Food Quality*, 37(1), 42–49.
- Bialka, K. L., y Demirci, A. (2007). Utilization of gaseous ozone for the decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on raspberries and strawberries. *Journal of Food Protection*, 70(5), 1093–1098.
- Cabezas, S. (2017). *Actividad antimicrobiana de recurimientos de Quitosano y Polilisina en mora inoculadas con Escherichia coli, Salmonella enterica y Botrytis cinerea*. (Tesis de grado). Universidad Técnica Ambato. 52 páginas.
- Calero Cortez, V. (2010). *Estudio de prefactibilidad para la producción de mora (Rubus lanciniatus) variedad brazos, en Atuntaqui, Imbabura* (Tesis de grado). Universidad San Francisco de Quito. 78 páginas.
- Chanaguano, D. (2016). *Estudio de la calidad y comportamiento postcosecha de dos variedades de mora (Rubus glaucus Benth) cosechadas en los estados de madurez 3 y 5* (Tesis de grado). Universidad Técnica de Ambato. 95 páginas.
- Daş, E., Gürakan, G. C., y Bayindirli, A. (2006). Effect of controlled atmosphere

- storage, modified atmosphere packaging and gaseous ozone treatment on the survival of *Salmonella enteritidis* on cherry tomatoes. *Food Microbiology*, 23(5), 430–438.
- Fan, L. ., Song, J., Hildebrand, P. D., y Forney, C. F. (2001). Corona discharge reduces mold on commercially stored onions. *Agriculture and Agri-Food Canada*, (553), 427–428.
- Food and Drug Administration (FDA). (2014). Health Educators - Seguridad alimentaria para futuras mamás: Profesionales de la medicina - Los 14 patógenos principales transmitidos por los alimentos.
- Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. (2013a). *Escherichia coli*. *Elika*, 1–5.
- Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. (2013b). *Salmonella*. *Fundación Vasca Para La Seguridad Alimentaria*, 2(4), 1–6.
- Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. (2013c). *Staphylococcus Aureus*. *Elika*, 1–4.
- Gibson, D. G., Glass, J. I., Lartigue, C., Noskov, V. N., Chuang, R.-Y., Algire, M. A., Venter, J. C. (2010). Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5987), 52–56.
- Glowacz, M., Colgan, R., y Rees, D. (2014). The use of ozone to extend the shelf-life and maintain quality of fresh produce. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(4), 662–671.
- Guzel-Seydim, Z. B., Greene, A. K., y Seydim, A. C. (2004). Use of ozone in the food industry. *LWT - Food Science and Technology*, 37(4), 453–460.
- Herforth, N., Theuvsen, L., Vásquez, W., y Wollni, M. (2015). *Understanding participation in modern supply chains under a social network perspective - evidence from blackberry farmers in the Ecuadorian Andes* (No. 57). Quito.
- Horvitz, S., y Cantalejo, M. J. (2007). Efecto del ozono sobre la calidad de pimiento rojo cv. *Lamuyo* mínimamente procesado. In *V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones* (pp. 878–884). Pamplona, España.
- Horvitz, S., y Cantalejo, M. J. (2012). Effects of ozone and chlorine postharvest treatments on quality of fresh-cut red bell peppers. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(9), 1935–1943.

- Horvitz, S., y Cantalejo, M. J. (2014). Application of ozone for the postharvest treatment of fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(3), 312–339.
- ICMSF. (1982). *Microorganismos de los alimentos. Su significado y métodos de enumeración* (Acribia). Zaragoza.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2010). *FRUTAS FRESCAS. MORA. REQUISITOS. Norma Técnica Ecuatoriana Nte Inen 2427:2010* (Vol. 2165).
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2006). INEN 1529-5:2006. Control Microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2013). INEN 1529-10:2013. Control microbiológico de los alimentos. Mohos y levaduras viables. Recuento en placa por siembra en profundidad.
- Jara Santamaría, V. (2016). *Efecto antibacteriano del agua de plata sobre cuatro cafeterías de un centro de educación superior* (Tesis de grado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 144 páginas.
- Kabal, N. N., Murinov, K. Y., Mullagaliev, I. R., Krasnogorskaya, N. N., Shereshovets, V. V., Monakov, Y. B., y Zaikov, G. E. (2001). Oxidative destruction of chitosan under the effect of ozone and hydrogen peroxide. *Journal of Applied Polymer Science*, 81(4), 875–881.
- Karaca, H., y Velioglu, Y. S. (2007). Ozone applications in fruit and vegetable processing. *Food Reviews International*, 23(1), 91–106.
- Khadre, M. A., y Yousef, A. E. (2001). Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. *International Journal of Food Microbiology*, 71(2–3), 131–138.
- Langlais, B., Reckhow, D., y Brink, D. (1991). Ozone in water treatment processes. Application and Engineering. *Process Technologies for Water Treatment*, 145–157.
- Lavigne, J. P., Tiene, B., Jeandrot, A., y Lechiche, C. (2008). Sección permanente latinoamericana Toxiinfecciones alimentarias colectivas (TIAC). *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, pp. 79–87.
- Lillard, S. (2004). How ozone affects bacteria, fungus, molds and viruses, (October), 3–5.

- Lombardo, S., Restuccia, C., Pandino, G., Licciardello, F., Muratore, G., y Mauromicale, G. (2015). Influence of an O₃-atmosphere storage on microbial growth and antioxidant contents of globe artichoke as affected by genotype and harvest time. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 27, 121–128.
- Mahapatra, A. K., Muthukumarappan, K., y Julson, J. L. (2005). Applications of ozone, bacteriocins and irradiation in food processing: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(6), 447–461.
- Margulis, J., Gómez, S., y Dante, J. (2011). Efecto del ozono sobre el crecimiento de bacterias y hongos de importancia avícola. *Engormix*.
- Mari, M., Bertolini, P., y Pratella, G. C. (2003). Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. *Journal of Applied Microbiology*, 94(5), 761–766.
- Minas, I. S., Karaoglanidis, G. S., Manganaris, G. A., y Vasilakakis, M. (2010). Effect of ozone application during cold storage of kiwifruit on the development of stem-end rot caused by *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology*, 58(3), 203–210.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. (2014). Zonificación Agroecológica Económica del cultivo de mora (*Rubus glaucus*) en el Ecuador a escala 1:250.000.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. (2013). Día de campo en mora de Castilla organiza el INIAP – Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2–5.
- Mosquera, V. B., Alwang, J., Andrango, G., Domínguez, J., Escudero, L., y Martínez, A. (2017). Tipificación de los productores de mora de Ecuador para optimizar sus estrategias de medios de vida, 1–23.
- Novoa, C., y Restrepo, L. (2007). Influence of psychrotrophic bacteria in proteolytic activity of milk. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria Y de Zootecnia*, 54, 9–16.
- Palou, L., Crisosto, C. H., Smilanick, J. L., Adaskaveg, J. E., y Zoffoli, J. P. (2002). Effects of continuous 0.3 ppm ozone exposure on decay development and physiological responses of peaches and table grapes in cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 24(1), 39–48.

- Pérez, A. G., Sanz, C., Ríos, J. J., Olías, R., y Olías, J. M. (1999). Effects of ozone treatment on postharvest strawberry quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1652–1656.
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 78–82.
- Pretell, C., Marquez, L., y Siche, R. (2016). Effect of gaseous ozone on physicochemical characteristics, microbiological and general appearance of fresh wonderful *Punica granatum* L. *Scientia Agropecuaria*, 7(3), 173–180.
- Rojas, M., (2011). Research on ozone application as disinfectant and action mechanisms on wastewater microorganisms. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, (December 2011), 263–271.
- Salama, A. (2002). Ozone technology and applications.
- Selma, M., Beltrán, D., Chacón-Vera, E., y Gil, M. (2006). Effect of ozone on the inactivation of *Yersinia enterocolitica* and the reduction of natural flora on potatoes. *Journal of Food Protection*, 69(10), 2357–63.
- Sharpe, D., Fan, L., McRae, K., Walker, B., MacKay, R., y Doucette, C. (2009). Effects of ozone treatment on *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* in relation to horticultural product quality. *Journal of Food Science*, 74(6).
- Smilanick, J. L., Margosan, D. M., y Mlikota Gabler, F. (2002). Impact of ozonated water on the quality and shelf-life of fresh citrus fruit , stone fruit , and table grapes. *Ozone: Science y Engineering: The Journal of the International Ozone Association*, 24:5(October 2014), 343–356.
- Soto, M. P. (2014). *Efecto antibacteriano y antifúngico comparativo de los extractos acuosos del Zea Mays L. (maíz morado), Rubus glaucus (mora andina); Opuntia soherensii (ayrampo) y diseño de un gel de limpieza cutánea* (Tesis de grado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima- Perú. 89 páginas.
- Spotts, R. A., y Cervantes, L. A. (1992). Effect of ozonated water on postharvest pathogens of pear in laboratory and packinghouse test. *Plant Dis*, 76, 256–259.
- Tzortzakis, N., Singleton, I., y Barnes, J. (2007). Deployment of low-level ozone-enrichment for the preservation of chilled fresh produce. *Postharvest Biology and Technology*, 43(2), 261–270.
- Tzortzakis, N., Taybi, T., Roberts, R., Singleton, I., Borland, A., y Barnes, J. (2011).

- Low-level atmospheric ozone exposure induces protection against *Botrytis cinerea* with down-regulation of ethylene-, jasmonate- and pathogenesis-related genes in tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 61(2–3), 152–159.
- Valdiviezo, B., Pretell, C., y Marquez, L. (2016). Effect of gaseous ozone concentration on physicochemical, microbiological characteristics and general appearance in red globe variety grape (*Vitis vinifera* L.). *Agroindustrial Science*, 1(1), 7–15.
- Whangchai, K., Saengnil, K., y Uthaibutra, J. (2006). Effect of ozone in combination with some organic acids on the control of postharvest decay and pericarp browning of longan fruit. *Crop Protection*, 25(8), 821–825.
- Xu, L. (1999). Use of ozone to improve the safety of fresh fruits and vegetables. *Food Technology*, 53(10), 58–61.
- Yuk, H. G., Yoo, M. Y., Yoon, J. W., Moon, K. D., Marshall, D. L., y Oh, D. H. (2006). Effect of combined ozone and organic acid treatment for control of *Escherichia coli* O157 : H7 and *Listeria monocytogenes* on lettuce. *Journal Of Food Science*, 71(3), M83–M87.
- Zaragoza, N., y Derrickson, B. (2011). Análisis microbiológico de los alimentos. *Anmat*, 5(6), 1–175.
- Zorlugenç, B., Kiroğlu Zorlugenç, F., Öztekin, S., y Evliya, I. B. (2008). The influence of gaseous ozone and ozonated water on microbial flora and degradation of aflatoxin B1 in dried figs. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), 3593–3597.

Anexos

Anexo 1. ACCIÓN DEL OZONO FRENTE A MICROFLORA NATIVA

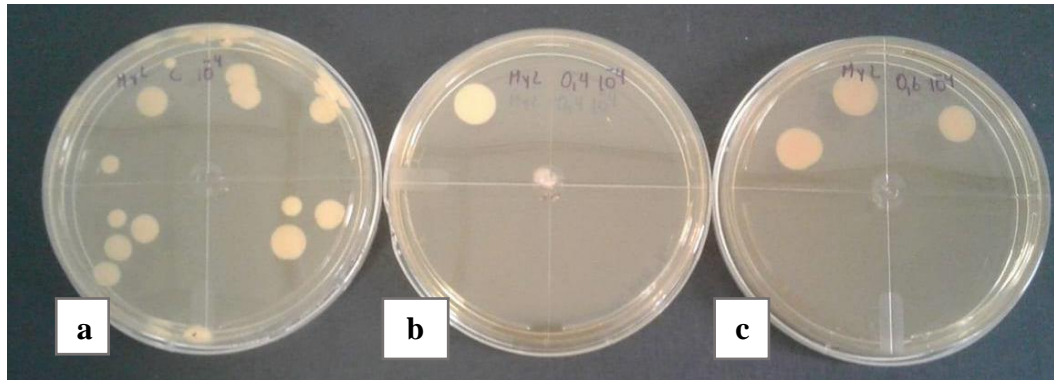


Figura 5. Colonias de mohos y levaduras (en mora de Castilla **a**) control y tratada con **b**) 0,4 ppm y **c**) 0,6 ppm de O₃).

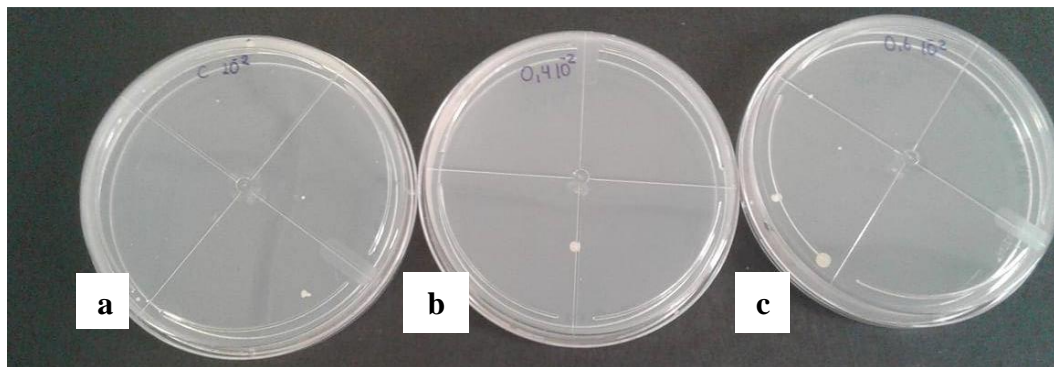


Figura 6. Colonias de psicrótrofos (en mora de Castilla **a**) control y tratada con **b**) 0,4 ppm y **c**) 0,6 ppm de O₃).

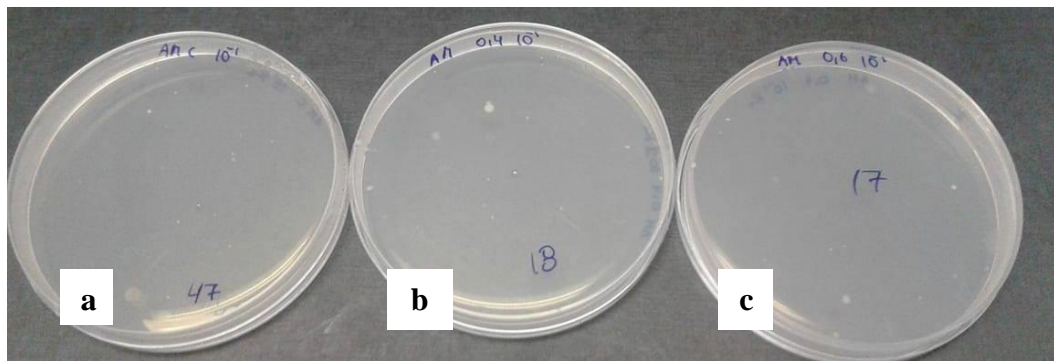


Figura 7. Colonias de aerobios mesófilos (en mora de Castilla **a**) control y tratada con **b**) 0,4 ppm y **c**) 0,6 ppm de O₃).

Anexo 2. ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DEL OZONO



Figura 8. Modificación del pH de pulpa de mora de Castilla.

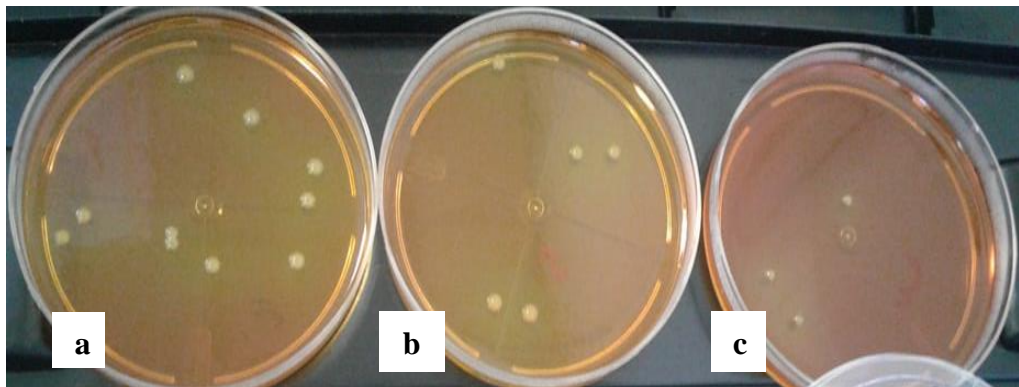


Figura 9. Colonias de *S. enterica* en pulpa de mora de pH modificado (a) control y tratada con b) 0,4 ppm y c) 0,6 ppm de O₃).

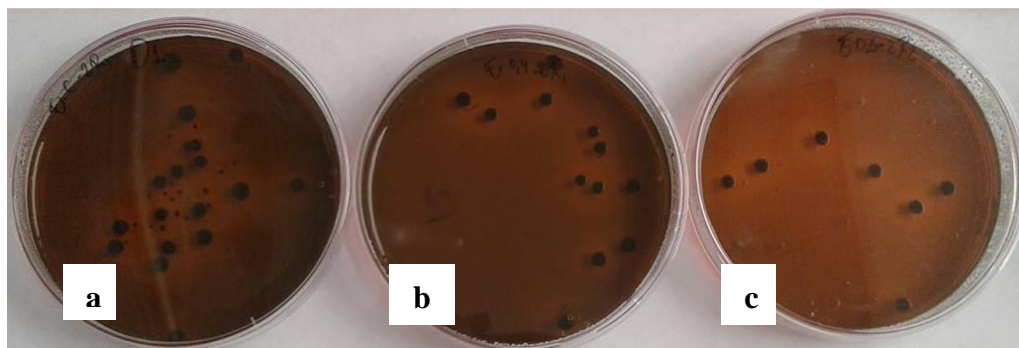


Figura 10. Colonias de *E. coli* inoculadas en pulpa de mora con pH modificado (a) control y tratada con b) 0,4 ppm y c) 0,6 ppm de O₃).

Anexo 3. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL OZONO



Figura 11. Secado de moras de Castilla previa a la inoculación con *B. cinerea*.

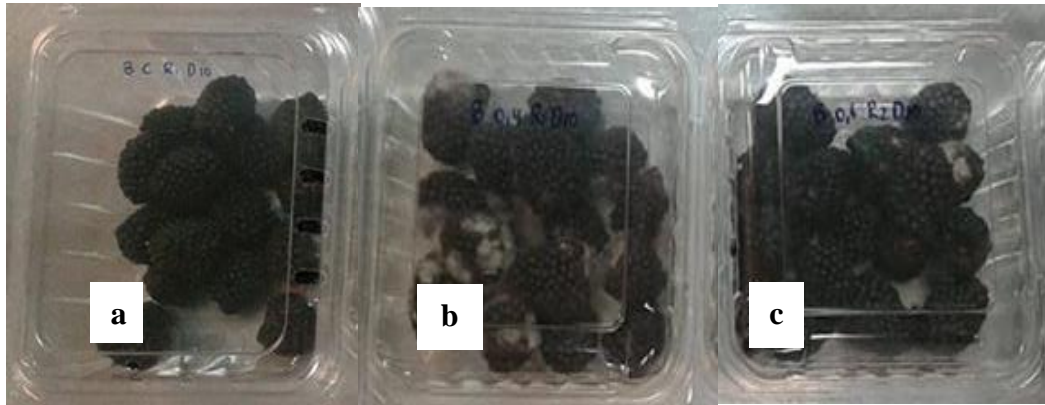


Figura 11. Desarrollo de *B. cinerea* en envases PET (en mora de Castilla **a**) control y tratada con **b**) 0,4 ppm y **c**) 0,6 ppm de O₃).

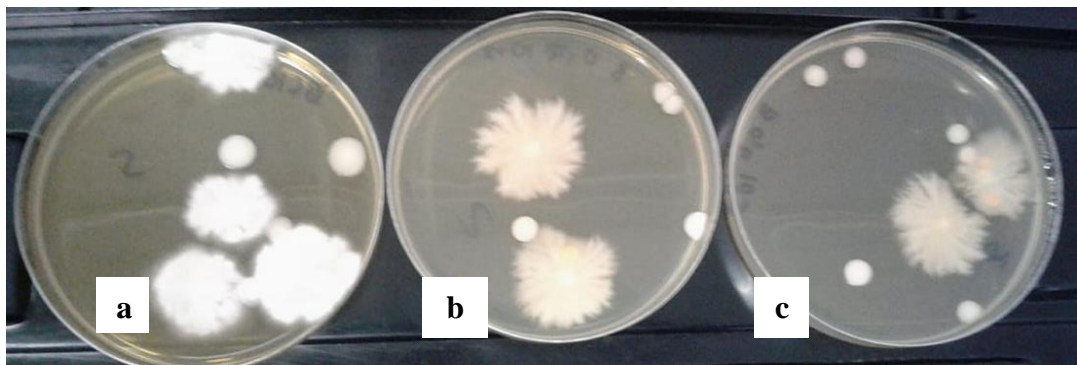


Figura 12. Colonias de *B. cinerea* inoculadas en pulpa de mora con pH modificado (**a**) control y tratada con **b**) 0,4 ppm y **c**) 0,6 ppm de O₃).