



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



Efecto de la aplicación postcosecha de ozono gaseoso sobre la tasa respiratoria y la calidad microbiológica de mora de Castilla (*Rubus glaucus Benth*)

Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, previa 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, financiado por el Centro de Investigación de la Universidad Técnica de Ambato (Resolución 1302-CP-U-P-2015) y coordinado por la PhD. Sandra Horvitz

Autora: Erika Brigitte Chonata Jiménez

Tutora: Ph.D. Mirari Yosune Arancibia Soria

Ambato – Ecuador

Noviembre - 2018

APROBACIÓN DEL TUTOR

Ph.D. Mirari Yosune Arancibia Soria

CERTIFICA:

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

Ambato, 6 de septiembre del 2018



Ph.D. Mirari Yosune Arancibia Soria

C.I: 1802142461

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Erika Brigitte Chonata Jiménez, manifiesto 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; a excepción de las citas.



Erika Brigitte Chonata Jiménez

180539665-0

AUTORA

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE 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:



Presidente del Tribunal



Lic. M.Sc. Paulo Santiago Baquero Icaza
C.I. 180323354-1



Ph.D. Verónica Alejandra García Ibarra
C.I. 171472560-1

Ambato, 7 de noviembre del 2018

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, 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, 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.

A handwritten signature in blue ink, reading "Erika Brigitte Chonata Jiménez", is written over a horizontal line.

Erika Brigitte Chonata Jiménez

180539665-0

AUTORA

DEDICATORIA

A mi ángel en el cielo, mi mami Celita, quien fue mi ejemplo e inspiración, cada día me brindó su amor incondicional, apoyo y paciencia, quien me inspira a realizar mis sueños y a ser mejor día a día
Con amor, Eri

AGRADECIMIENTO

A Dios por cada bendición recibida, por la familia que tengo y por los logros alcanzados.

A mi familia por ser mi apoyo y mi soporte, por todo el cariño brindado y por ser ejemplo de unión, lucha y fortaleza, gracias por siempre cuidarme y querer lo mejor para mí, todos mis logros van dedicados a ustedes. A mi mami Normi por todo su amor, apoyo confianza y a mi ñaño Polo por apoyarme en cada uno de mis sueños brindándome su amor, paciencia y sabiduría. A mi hermano y primos, por alegrar mis días y ser luz en mi vida.

A la doctora Sandra Horvitz, por su total compromiso, dedicación y apoyo durante la realización de este trabajo, ha sido un privilegio conocerla, gracias por todas sus enseñanzas. A la doctora Mirari Arancibia por transmitirnos su conocimiento y brindarnos su apoyo en la investigación.

A mis amigas por brindarme su amistad sincera, por el apoyo, las alegrías y aventuras durante el tiempo compartido, siempre estarán en mi corazón. A mi compañera de tesis Evelyn por su confianza, ayuda en el desarrollo de esta investigación y por convertirse en una amiga.

A los docentes de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos quienes supieron transmitir sus conocimientos para formar profesionales capaces en el área.

A todas las personas que de una u otra manera han sido claves para alcanzar este logro.

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
2.1.1. Factores que afectan la calidad postcosecha de la mora de Castilla.....	5
2.1.2. Microorganismos causantes de daños a frutas	6
2.1.3. Alternativas de control de contaminación microbiana	6
2.2. Hipótesis.....	10
2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis	10

CAPÍTULO II 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 microorganismos patógenos	11
3.1.5. Aplicación de ozono	12
3.1.6. Análisis microbiológicos	12
3.1.6.1. Microorganismos nativos.....	12
3.1.6.2. Microorganismos patógenos	13
3.1.7. Tasa respiratoria	13
3.1.8. Diseño experimental y análisis estadístico	14

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Actividad antimicrobiana del ozono gaseoso sobre la microbiota nativa de mora de Castilla	15
4.2. Actividad antimicrobiana del ozono gaseoso en patógenos inoculados en mora de Castilla	20
4.3. Análisis de la tasa respiratoria de moras de Castilla expuestas a ozono gaseoso	26
4.4. Verificación de hipótesis.....	27

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones	28
5.2. Recomendaciones.....	28
Referencias bibliográficas	30
Anexos	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Recuentos de aerobios mesófilos en muestras de mora de Castilla, almacenadas durante 10 días a $6 \pm 1^\circ\text{C}$	15
Figura 2. Recuentos de mohos y levaduras en muestras de mora, almacenadas durante 10 días a $6 \pm 1^\circ\text{C}$	18
Figura 3. Crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> en muestras de mora control (A), expuestas a 0,5 ppm O_3 (B) y 0,7 ppm O_3 (C)	21
Figura 4. Recuentos microbiológicos de <i>E. coli</i> en muestras de mora, almacenadas durante 10 días a $6 \pm 1^\circ\text{C}$	23
Figura 5. Comportamiento de la tasa respiratoria de moras de Castilla control y expuestas a concentraciones de ozono de 0,5 y 0,7 ppm, almacenadas en refrigeración a $6 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 días.	26
Figura 6. Envasado de la fruta en envases PET	38
Figura 7. Placas Petri con medio de cultivo para siembra de microorganismos.....	38
Figura 8. Medición de la concentración gaseosa para la determinación de la tasa respiratoria.....	38
Figura 9. Ajuste de pH en pulpa de mora para la inoculación de <i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i> y <i>S. aureus</i>	39
Figura 10. Colonias de aerobios mesófilos en placas control (A), expuestas a 0,5 (B) y 0,7 (C) ppm de ozono gaseoso	39
Figura 11. Colonias de mohos y levaduras	39
Figura 12 Colonias de <i>Salmonella enterica</i>	40

Figura 13. Colonias de <i>Escherichia coli</i>	40
---	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Recuentos de microorganismos psicrótrofos en muestras de mora, almacenadas durante 10 días a $6 \pm 1^{\circ}\text{C}$	17
--	----

Tabla 2. Recuentos de <i>Botrytis cinerea</i> en muestras de mora, almacenadas durante 10 días a $6 \pm 1^{\circ}\text{C}$	20
---	----

Tabla 3. Recuentos de <i>Salmonella enterica</i> en muestras de mora, almacenadas durante 10 días a $6 \pm 1^{\circ}\text{C}$	24
--	----

RESUMEN

La estructura frágil de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) incide en un tiempo de vida útil relativamente corto y limitado por la contaminación microbiana. El objetivo de la presente investigación fue estudiar el efecto de la aplicación postcosecha de ozono gaseoso (0,5 y 0,7 ppm) sobre la tasa respiratoria y la actividad de microorganismos nativos (aerobios mesófilos, psicrótrofos, mohos y levaduras) y patógenos inoculados (*Botrytis cinerea*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*). Los resultados muestran que el tratamiento con ozono no afectó la tasa respiratoria de las moras. Además, se observó un efecto antimicrobiano del ozono en aerobios mesófilos, psicrótrofos y mohos y levaduras con disminuciones de hasta 0,75; 1,9 y 2,25 unidades logarítmicas respectivamente. Con respecto a los microorganismos inoculados, la máxima inhibición en el crecimiento de *B. cinerea* fue de 0,69 unidades logarítmicas con la concentración de 0,5 ppm O₃. En el caso de las bacterias *E. coli* y *S. enterica* se trabajó con pulpa de mora con el pH modificado a valores óptimos para el crecimiento de cada bacteria, existiendo una escasa reducción de la carga microbiana debido a la acción superficial del ozono. Finalmente, no existió crecimiento de *S. aureus* por factores ajenos a la acción del ozono.

Palabras clave: Actividad antimicrobiana, aplicación postcosecha, calidad microbiológica, mora de Castilla, ozonificación

ABSTRACT

The fragile structure of Andean blackberries (*Rubus glaucus* Benth) influences in a relatively short shelf-life and limited by the microbial contamination. The aim of the present investigation was to study the effect of the postharvest application of gaseous ozone (0.5 and 0.7 ppm) on the respiratory rate and the activity of native microorganisms (aerobic mesophiles, psychotrophs, molds and yeasts) and inoculated pathogens (*Botrytis cinerea*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*). The results show that the treatment with ozone did not affect the respiratory rate of the berries. In addition, an antimicrobial effect of ozone was observed in aerobic mesophiles, psychotrophs and molds and yeasts with growth inhibition of up to 0,75; 1,9 y 2,25 logarithmic units respectively. Regarding to the inoculated microorganisms, the maximum growth inhibition of *B. cinerea* was 0.69 logarithmic units with the concentration of 0.5 ppm O₃. In the case of *E. coli* and *S. enterica*, we worked with blackberry pulp, with adjusted pH at optimum values for the growth of each bacterium, and there was limited reduction of the microbial load due to the surface action of the ozone. Finally, there was no growth of *S. aureus* due to factors other than the ozone action.

Keywords: Andean blackberries, antimicrobial activity, microbial quality, ozonation, postharvest application

INTRODUCCIÓN

La mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) es la especie de mora de mayor importancia comercial y la más cultivada en el Ecuador, con una superficie que asciende a 5200 hectáreas plantadas y 11777 T producidas anualmente (INEC, 2001). Tungurahua es la segunda provincia productora de mora en el país, representando el 41 % de cultivo de la producción nacional, además de tener el rendimiento más alto entre las provincias productoras (INIAP, 2016; Mejía, 2011).

Al ser frutas con alto contenido de antioxidantes como antocianinas, carotenoides y vitamina C, su ingesta potencia el sistema inmunológico previniendo enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes y cáncer (Beattie, Crozier, & Duthie, 2005; Tavares et al., 2012).

No obstante, la mora de Castilla se considera uno de los frutos más percederos debido a su estructura morfológica extremadamente frágil y a su alta tasa de respiración, que la hacen susceptible a daños mecánicos y deterioro fisiológico (Ayala, Valenzuela, & Bohórquez, 2015). Dichos daños exponen a los tejidos afectados al ataque de bacterias como *Erwinia*, *Pseudomonas* y hongos como *Penicillium*, *Botrytis*, *Aspergillus* y *Fusarium*, que son los principales microorganismos causantes de pudrición (Ramírez, Aristizabal, & Restrepo, 2013). De la misma manera, las moras de Castilla son susceptibles a la infección por bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus* que pueden constituir problemas de seguridad alimentaria en los consumidores (Cabezas, 2017).

Como medida preventiva ante el ataque de microorganismos, los agricultores aplican tratamientos químicos; sin embargo, existe una creciente preocupación sobre su uso, debido a los efectos nocivos sobre la salud del consumidor y a la resistencia que pueden generar los microorganismos contra dichas sustancias (Giuggioli, Briano, Girgenti, & Peano, 2015; Schirra et al., 2002). En otras frutas se han obtenido buenos resultados al aplicar soluciones de cloro o bicarbonato de sodio para su desinfección, pero

las moras no se lavan antes de su venta, ya que sufren daños mecánicos y el agua libre que queda en su superficie potencia el riesgo de infecciones por microorganismos **(Di Renzo, Altieri, D'erchia, Lanza, & Strano, 2005; Horvitz, 2017)**.

El ozono puede ser una alternativa para garantizar la seguridad microbiológica de productos alimenticios gracias a su capacidad oxidante, penetrabilidad y eficacia contra la mayoría de microorganismos **(Prez, Sanz, Ros, Olas, & Olas, 1999)**. Concentraciones relativamente bajas de ozono y tiempos de contacto mínimos son suficientes para inactivar bacterias, mohos, levaduras, parásitos y virus y extender la vida útil de los productos tratados **(Guzel-Seydim, Greene, & Seydim, 2004; Kim, Yousef, & Dave, 1999)**. El mecanismo de acción consiste en la producción de radicales hidroxilo y otros radicales libres que destruyen la membrana celular de dichos microorganismos o causan daños a su material genético **(Tzortzakis, Singleton, & Barnes, 2007)**.

Además, la reacción oxidativa del ozono no deja residuos tóxicos, ya que rápidamente se disocia a oxígeno **(Singh, Singh, Bhunia, & Stroshine, 2002)**. Por otro lado, el pH, la pérdida de peso y la tasa de respiración de diferentes frutas y hortalizas no se vieron afectados después del tratamiento con ozono **(Aguayo, Escalona, & Artés, 2006; Horvitz & Cantalejo, 2010)**.

Con respecto a la efectividad antimicrobiana, las tasas de inactivación son mayores en los sistemas libres de demanda de ozono que cuando el medio contiene sustancias orgánicas oxidables. Además de las características de los microorganismos, la concentración de ozono, el pH del medio, el tiempo de exposición, la humedad relativa y el material de la superficie son variables influyentes en la supervivencia de microorganismos **(Horvitz & Cantalejo, 2014; Li & Wang, 2003)**.

El objetivo de la presente investigación fue estudiar el efecto de la aplicación postcosecha de ozono gaseoso sobre la tasa respiratoria y la calidad microbiológica de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth).

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1. Tema

Efecto de la aplicación postcosecha de ozono gaseoso sobre la tasa respiratoria y la calidad microbiológica de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth)

1.2. Justificación

La mora es una fruta de gran interés comercial en Ecuador, ya que su cultivo genera empleo e ingresos económicos para agricultores durante todo el año, especialmente en Tungurahua, provincia con el mayor rendimiento en su producción (**Calero, 2010; Farinango, 2010**).

Sin embargo, la carencia de una estructura protectora y la alta tasa de respiración de esta fruta la hacen susceptible a daños mecánicos, fisiológicos y ambientales que aceleran su deterioro y la hacen más propensa a la contaminación microbiana (**Doyle & Erickson, 2008; Guedes et al., 2013**). Las medidas empleadas tradicionalmente por los agricultores para prevenir enfermedades en sus cultivos incluyen tratamientos con agroquímicos. No obstante, su uso podría resultar en la formación de subproductos tóxicos o cancerígenos, además del surgimiento de patógenos resistentes a dichos compuestos (**Kim, Yousef, & Khadre, 2003; Previdi, Fiori, Dallacasa, Fortini, & Franceschini, 2016; Schirra et al., 2002**).

Por tanto, es necesario buscar tecnologías alternativas que garanticen eficiencia en el control de la contaminación microbiana y en la extensión de la vida útil de la fruta, sin afectar sus propiedades físicas, nutricionales y sensoriales (**Barrera et al., 2017**). En este sentido, el ozono puede inhibir microorganismos patógenos y reducir la descomposición de productos frescos. Además, es reconocido como seguro en aplicaciones sobre alimentos por su descomposición espontánea en productos no tóxicos (**Tanimura, Hirotsuji, & Tanaka, 1998**) y se ha demostrado su eficacia contra una amplia gama de

bacterias Gram positivas y Gram negativas, mohos y levaduras causantes de daños biológicos en frutas (**Bataller-Venta, Cruz-Broche, & García-Pérez, 2010; Khadre, Yousef, & Kim, 2001**). Sin embargo, no se ha encontrado información sobre sus efectos sobre los microorganismos que afectan la calidad de la mora de Castilla.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

- Estudiar el efecto de la aplicación postcosecha de ozono gaseoso sobre la tasa respiratoria y la calidad microbiológica de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth).

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar el comportamiento de microorganismos nativos (aerobios mesófilos totales, psicrótrofos, mohos y levaduras) en moras de Castilla ante la exposición a diferentes concentraciones de ozono gaseoso.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del ozono gaseoso frente a *Botrytis cinerea*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*.
- Determinar el efecto de la aplicación de ozono gaseoso en la tasa respiratoria de las moras.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos

La mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) es apreciada por su sabor único y su alto contenido de compuestos antioxidantes y bioactivos (**Horvitz, 2017**).

Al ser una fruta no climatérica, que una vez separada de la planta su proceso de maduración se detiene, se debe tener en cuenta el momento apropiado para su cosecha, debido a que dicho factor se verá reflejado en su vida útil e incidirá en el desarrollo, el valor nutricional y la adquisición de sabor y coloración adecuados (**Alzate, Mayor, & Montoya, 2010**).

2.1.1. Factores que afectan la calidad postcosecha de la mora de Castilla

Por sus características fisicoquímicas, morfológicas y fisiológicas es susceptible a lesiones mecánicas, deterioro fisiológico, pérdida de agua e infección por microorganismos (**Bataller-Venta et al., 2010**). El manejo de factores ambientales (temperatura, humedad relativa, composición y concentración de los gases de la atmósfera alrededor del producto), fisiológicos (producción de etileno, velocidad de respiración, tasa de transpiración) y biológicos (enfermedades causadas por bacterias y hongos), pueden controlar dentro de ciertos límites, el proceso de pérdida de calidad (**Cañet, Gordillo, Vega, & Pérez, 2004**).

La manipulación incorrecta en los procesos de almacenamiento, transporte y comercialización conlleva, además de generar pérdidas económicas, el riesgo de los consumidores a contraer enfermedades transmitidas por fruta contaminada. Según **Painter et al. (2013)** la contaminación microbiana de frutas y verduras es responsable del 2-8 % de todos los casos confirmados de enfermedades derivadas de los alimentos.

Según datos publicados por el **Ministerio de Salud Pública del Ecuador, (2018)** en el “Anuario de Vigilancia Epidemiológica 1994 – 2017” los casos de enfermedades transmitidas por agua y alimentos han ido en aumento desde el año 2014, alcanzando una cifra de 11907 casos en el año 2017.

2.1.2. Microorganismos causantes de daños a frutas

Los principales microorganismos responsables de pérdidas postcosecha de frutas y vegetales son hongos como *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Monilinia* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., y *Sclerotinia* spp (**Barth, Zhou, Mercier, & Payne, 1995; Tzortzakis, 2015**) y bacterias como *Erwinia* spp. y *Pseudomonas* spp (**Wani, Barnes, & Singleton, 2016**). De la misma forma patógenos como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus* han sido considerados los principales microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (**Alwi & Ali, 2014; Bialka & Demirci, 2007a**).

Según **Miller, Silva, & Brandão (2013)** el alto nivel de azúcar y otros nutrientes presentes en la mora y el bajo pH de estos frutos favorecen el crecimiento de hongos en comparación con bacterias. La proliferación de *Botrytis cinerea* penetra el tejido vegetal a través de heridas o aberturas naturales causando, posteriormente, la pudrición del fruto (**Tournas & Katsoudas, 2005**).

2.1.3. Alternativas de control de contaminación microbiana

La contaminación microbiana en frutas es comúnmente controlada con desinfectantes a base de cloro o bromo, aplicación de fungicidas o mediante modificación del ambiente de almacenamiento y transporte (temperatura, humedad relativa). No obstante, se ha observado que no controlan adecuadamente los microorganismos comunes causantes de descomposición ni los posibles patógenos humanos potencialmente dañinos (**Tzortzakis, 2015**).

En la búsqueda de tecnologías alternativas para controlar afecciones microbiológicas y mantener la calidad en postcosecha, se encontró al ozono como una opción efectiva, debido a su alta capacidad oxidante y de inactivación de microorganismos **(Bataller-Venta et al., 2010)**. Desde el siglo XX el ozono ha sido usado como agente antimicrobiano en el tratamiento de aguas residuales y purificación de agua potable, y en el 2001, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (U.S. FDA) aprobó al ozono como sustancia GRAS (Generalmente Reconocida como Segura) para el contacto directo con alimentos **(Rice, 1999)**.

2.1.3.1. El ozono

El ozono es un compuesto inestable que se descompone espontáneamente, produciendo radicales hidroxilo y otras especies de radicales libres **(Prez et al., 1999)**. Además de su descomposición a oxígeno sin generar subproductos de reacción indeseables y su actividad antimicrobiana contra una amplia gama de microorganismos, el ozono puede destruir pesticidas y residuos químicos **(Horvitz & Cantalejo, 2014)** lo que ha favorecido un rápido crecimiento en el uso de este gas para aplicaciones en la industria alimenticia.

El ozono se forma mediante un aporte de alta energía que divide el oxígeno molecular en dos átomos de O que se combinan rápidamente con O₂ disponible para formar O₃. La fuente de alta energía puede ser electroquímica, radiación ultravioleta o descarga eléctrica (corona). Sin embargo, los dos primeros métodos no son usados debido a altos costos y bajos rendimientos **(Miller et al., 2013)**. Por tanto, el método comercialmente más usado para su generación es la descarga de corona.

Una vez producido el ozono, los tratamientos pueden aplicarse en dos formas: gaseosa, agregando este compuesto de manera continua o intermitente a una atmósfera donde se almacena el producto, o acuosa, por inmersión del producto en agua que contenga ozono **(Perry & Yousef, 2011)**.

Los lavados con ozono son principalmente tratamientos superficiales por lo que no son efectivos para reducir la descomposición de la fruta con heridas, residuos o cualquier material orgánico, que proteja a los microorganismos de su inactivación con ozono **(Horvitz & Cantalejo, 2014)**. Además, el ozono es relativamente estable en el aire pero muy inestable en el agua, descomponiéndose en poco tiempo (20 minutos a 20 °C), por lo que no se puede almacenar y debe generarse continuamente **(Karaca & Velioglu, 2007)**.

Por otro lado, el ozono tiene una vida media más larga en forma gaseosa, alrededor de 12 horas **(Suslow, 1998)**. Además de su acción antimicrobiana, el ozono ha sido usado para reducir el nivel de etileno en el aire y retrasar el proceso de maduración **(Rice, 1999)**. Al aplicar el gas a concentraciones adecuadas en la atmósfera de almacenamiento, se puede prolongar el tiempo de vida útil de frutas y hortalizas al protegerlas del ataque de microorganismos, con mínimo daño fisiológico **(Horvitz & Cantalejo, 2014)**.

En altas concentraciones, puede afectar la salud humana, por lo que la Administración de Seguridad y Salud Ocupacional de los Estados Unidos (U.S. OSHA) estableció un Valor Límite Umbral para Exposición a Corto Plazo (TLV-STEL) de 0,25 ppm para ozono gaseoso. A esta concentración un individuo puede estar expuesto por 15 minutos sin sufrir efectos de irritación u otros efectos adversos **(Palou, Crisosto, Smilanick, Adaskaveg, & Zoffoli, 2002)**.

El mecanismo de acción microbicida del ozono es un proceso complejo, ya que el ozono ataca proteínas, lípidos insaturados y enzimas respiratorias en las membranas celulares, peptidoglicanos en paredes celulares, enzimas y ácidos nucleicos en el citoplasma y proteínas y peptidoglicanos en capas de esporas y cápsides de virus **(Khadre & Yousef, 2001)**. Algunos autores concluyeron que el ozono molecular es el inactivador principal de los microorganismos, mientras que otros enfatizan la actividad antimicrobiana de los subproductos reactivos de la descomposición del ozono tales como OH, O₂⁻ y HO₃ **(Khadre et al., 2001)**.

La eficacia del tratamiento con gas ozono para inactivar microorganismos depende de factores como la temperatura y humedad relativa del ambiente, el tipo de producto, las

características morfológicas del microorganismo, el nivel de carga microbiana inicial, los iones presente en el aire, la concentración de ozono y el tiempo de exposición (**Horvitz & Cantalejo, 2014**). Las bajas temperaturas y una alta humedad favorecen la estabilidad del ozono y su efectividad (**Bataller-Venta et al., 2010**).

Con respecto a la sensibilidad al ozono se plantea el siguiente orden descendente de resistencia al ozono: protozoos, hongos, bacterias esporuladas, bacterias no esporuladas y virus (**Pérez-Rey, Chávez, & Baluja, 1995**). El ozono acuoso ha demostrado eficacia en la inactivación de bacterias en diferentes frutas y hortalizas, por ejemplo en zanahorias y lechugas inoculadas con *Escherichia coli* (**Singh et al., 2002**). En cuanto a la disminución de recuentos microbiológicos por exposición a ozono gaseoso se han realizado estudios que corroboran su efectividad antimicrobiana como el realizado por **Moore, Griffith, & Peters (2000)** en el que lograron reducir hasta 7,5 unidades logarítmicas de la población total de bacterias.

De la misma manera, **Selma, Ibáñez, Cantwell, & Suslow (2008)** aplicaron ozono gaseoso durante el almacenamiento de manzanas y moras mostrando una reducción del crecimiento fúngico y un incremento en su vida de anaquel; estos resultados coinciden con los reportados por **Tzortzakis, Singleton, & Barnes (2008)** en tomates, fresas, uvas y ciruelas inoculados con *Botrytis cinerea* y almacenados en refrigeración y en una atmósfera enriquecida con bajas concentraciones de ozono, obteniendo como resultado una disminución sustancial en la producción de esporas en todas las frutas tratadas. Con respecto a otros géneros de hongos, **Palou, Smilanick, Crisosto, & Mansour (2001)** obtuvieron una reducción del crecimiento microbiano en melocotones inoculados con *Monilinia fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Mucor piriformis* y *Penicillium expansum*.

Es importante mencionar también que el tratamiento con ozono ha logrado reducir el riesgo a la salud humana asociado con patógenos alimentarios como *Escherichia coli* (**Emer, Akbas, & Ozdemir, 2008**), *Listeria monocytogenes* (**Rahman, Ding, & Deog-Hwan, 2010**) y *Salmonella enterica* (**Bialka & Demirci, 2007a**).

Sin embargo, otros autores (**Glowacz, Colgan, & Rees, 2014**) no observaron reducciones de la carga microbiana en respuesta al tratamiento con ozono. Esto podría deberse a diferentes dosis de ozono y tiempos de exposición, ya sea bajos que no lograron afectar los componentes de las células microbianas, o dosis altas que pudieron dañar el tejido de la fruta o verdura tratada.

2.2. Hipótesis

Hipótesis nula

La aplicación postcosecha de ozono gaseoso no influye sobre la tasa respiratoria ni la calidad microbiológica de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth).

Hipotesis alternativa

La aplicación postcosecha de ozono gaseoso influye sobre la tasa respiratoria y la calidad microbiológica de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth).

2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis

2.3.1. Variable independiente

- Concentración de ozono gaseoso

2.3.2. Variables dependientes

- Tasa respiratoria
- Calidad microbiológica

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales y Métodos

3.1.1. Materia prima

Se adquirieron 20 kg de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) en un mercado de la ciudad de Ambato, se retiraron los pedúnculos y se desechó la fruta en mal estado.

3.1.2. Envasado y almacenamiento

Se distribuyeron 100 ± 10 g de fruta en envases de tereftalato de polietileno (PET). Se consideraron tres tratamientos: sin tratamiento (control), concentración 0,5 ppm O₃ y concentración 0,7 ppm O₃ y cinco tipos de microorganismos (nativos, *B. cinerea*, *E. coli*, *S. enterica* y *S. aureus*). Las moras se almacenaron en refrigeración a una temperatura de 6 ± 1 °C y los análisis se realizaron los días 1, 4, 7 y 10 de almacenamiento.

3.1.3. Reactivos

Agua de peptona tamponada (Merck KGaA, Alemania)

Medios de cultivo:

PCA (Plate count agar) (Difco, Francia)

Agar Sabouraud dextrosa con cloranfenicol (Acumedia, USA)

Agar Eosina levin azul de metileno (Acumedia, USA)

Bacto® agar SS (Becton Dickinson and Company, USA)

Agar Baird Parker (Acumedia, USA)

3.1.4. Inoculación de microorganismos patógenos

En las cajas en las que se evaluaron microorganismos patógenos, las moras de Castilla fueron inoculadas con suspensiones de 10^4 conidios/ml de *Botrytis cinerea* (Bioseb Organics Cía. Ltda., Ecuador) y 10^4 UFC/g de las bacterias en estudio: *Escherichia coli* (ATCC 25922, USA), *Salmonella enterica* (ATCC 9842, USA), *Staphylococcus aureus*

(ATCC 25923, USA), con una relación de 100 µl de suspensión de microorganismo por cada 10 g de fruta.

Antes de la inoculación con *B. cinerea*, las moras fueron desinfectadas en una solución de etanol al 70 % (v/v) durante 10 segundos, lavadas con agua destilada estéril y secadas a temperatura ambiente, para asegurar que el crecimiento fuera solo del microorganismo inoculado y no de mohos y levaduras nativos de la mora.

3.1.5. Aplicación de ozono

24 horas después de la inoculación con los microorganismos patógenos, las moras fueron expuestas durante 3 minutos a 0,5 y 0,7 ppm de ozono en una cámara hermética (PRECISION, Estados Unidos) utilizando un generador de ozono (ANSEROS MONITOR MP, Alemania). La concentración del gas dentro de la cámara se midió en forma continua con un analizador de ozono (ANSEROS MONITOR MP, Alemania).

3.1.6. Análisis microbiológicos

El día 1 y los días 4, 7 y 10 de almacenamiento se sembraron por triplicado microorganismos nativos (aerobios mesófilos, psicrótrofos y mohos y levaduras) y patógenos (*B. cinerea*, *E. coli*, *S. enterica* y *S. aureus*).

3.1.6.1. Microorganismos nativos

Se colocaron 5 g de mora de cada tratamiento y 45 ml de agua de peptona estéril en una bolsa, se homogeneizaron durante 2 minutos a 200 rpm en un homogeneizador Stomacher® 400 circulator (Seward, UK) y se realizaron diluciones seriadas a partir de esta mezcla.

Se sembraron en profundidad 1000 µl de cada dilución para el recuento de aerobios mesófilos y psicrótrofos en agar PCA. Las placas Petri fueron incubadas durante 48 horas a 35 °C y durante 7 días a 7 °C para aerobios mesófilos y psicrótrofos, respectivamente.

En el caso de mohos y levaduras se utilizó el medio de cultivo Agar Sabouraud dextrosa con cloranfenicol y se sembraron en superficie 100 µl de cada dilución. Las placas se incubaron durante 5 días a 25 °C.

3.1.6.2. Microorganismos patógenos

El día inicial de evaluación se realizó la activación de las cepas de *B. cinerea*, *E. coli*, *S. enterica* y *S. aureus*. Posteriormente se homogeneizaron en una bolsa estéril 5 g de mora de Castilla de cada tratamiento en 45 ml de agua de peptona estéril a 200 rpm por 2 min usando un homogeneizador Stomacher® (Seward, UK). Se realizaron diluciones seriadas a partir de dicha dilución.

Posteriormente, 100 µl de cada dilución fueron sembrados en superficie en los siguientes medios de cultivo: Sabouraud dextrosa con cloranfenicol, agar Eosina levin azul de metileno, Salmonella Shigella y Baird Parker para *B. cinerea*, *E. coli*, *S. enterica* y *S. aureus*, respectivamente.

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* a 25 °C durante 5 días.

3.1.7. Tasa respiratoria

Tres réplicas de 100 ± 10 g de mora de cada tratamiento se colocaron en frascos de sellado hermético abiertos y se almacenaron a 6 ± 1 °C. Durante el almacenamiento, y en forma diaria, los frascos se cerraron durante 10 horas, al cabo de las cuales se midió la concentración interna de O₂ y CO₂ con un analizador de gases de espacio de cabeza MAPY 4.0 LE SP O₂/CO₂ (WITT Gasetechnik, Alemania).

La cantidad de CO₂ producido se calculó en forma volumétrica en base a la ecuación 1.

$$RCO_2 = \frac{(y^{t_f} CO_2 - y^{t_i} CO_2) \times V}{100 \times M \times (t_f - t_i)} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

RCO₂: producción de CO₂ (L·kg⁻¹·h⁻¹)

t_f-t_i: intervalo de tiempo entre los muestreos (h)

V: volumen libre del envase (L)

M: masa del producto (kg)

y_i : concentración volumétrica inicial de gas (%)

y_f : concentración volumétrica final de gas (%)

Se expresó en mg la concentración de CO₂:

$$\frac{\text{mg CO}_2}{\text{kg}\cdot\text{h}} = \left(\frac{P_{\text{atm}} \times R_{\text{CO}_2}}{R \times T} \times \text{PM} \right) \times 1000 \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

P_{atm}: presión atmosférica de Ambato a 2500 m.s.n.m (atm)

R: constante de los gases (atm·L·mol⁻¹·K⁻¹)

T: temperatura de almacenamiento (K)

PM: peso molecular CO₂ (g·mol⁻¹)

3.1.8. Diseño experimental y análisis estadístico

Se realizó un diseño completamente aleatorizado, con tres réplicas por cada combinación de factores (concentración de ozono y día de ensayo), teniendo como variables los microorganismos nativos y patógenos. Los datos fueron analizados con el programa estadístico IBM SPSS Statistics Version 24 mediante análisis de varianza y cuando este fue significativo se utilizó el test de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0,05$).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Actividad antimicrobiana del ozono gaseoso sobre la microbiota nativa de mora de Castilla

En el grupo de los microorganismos aerobios mesófilos se encuentran las bacterias, mohos y levaduras capaces de desarrollarse a 35 ± 2 °C. Un recuento bajo no asegura la ausencia de patógenos de la misma manera que un recuento elevado no significa presencia de flora patógena (Campuzano, Mejía, Madero, & Pabón, 2015). En la figura 1 se muestran los recuentos microbiológicos ($\log(\text{ufc}\cdot\text{g}^{-1})$) de aerobios mesófilos durante el almacenamiento en moras de Castilla control y expuestas a concentraciones de 0,5 ppm y 0,7 ppm de ozono en aire.

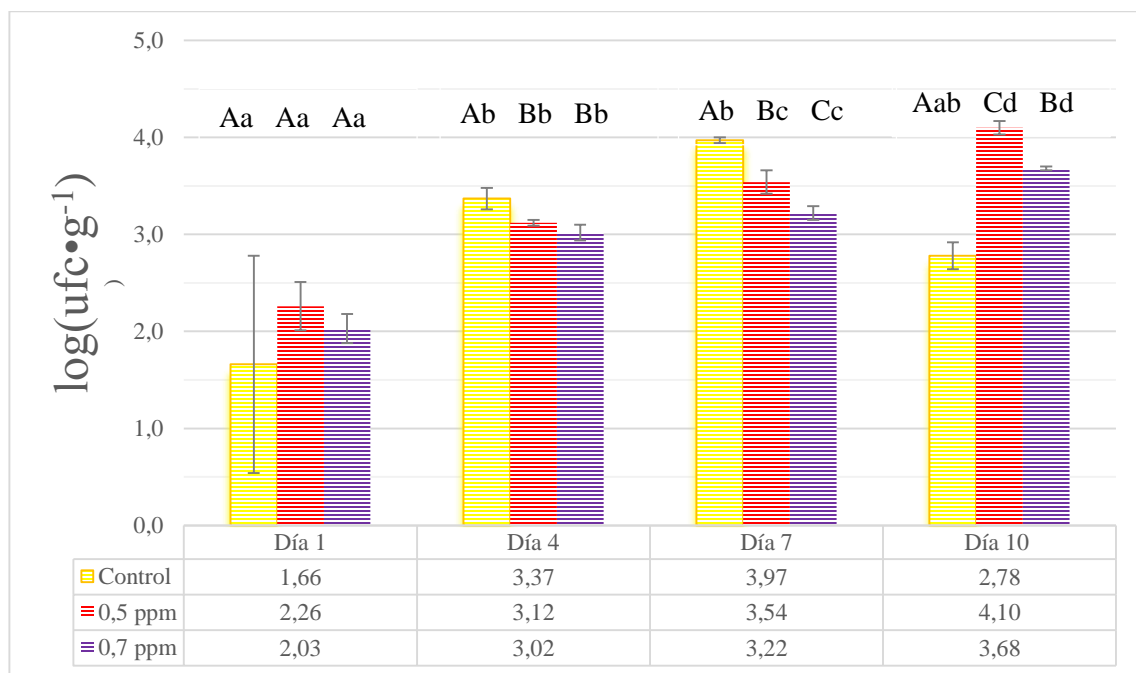


Figura 1. Recuentos de aerobios mesófilos en muestras de mora de Castilla, almacenadas durante 10 días a 6 ± 1 °C

Los valores corresponden a la media \pm la desviación estándar de tres réplicas.

Las letras minúsculas indican para cada tratamiento, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los días de evaluación.

Las letras mayúsculas indican para cada día, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos aplicados a las moras de Castilla.

Durante el tiempo de almacenamiento la población incrementó en todos los tratamientos con respecto al primer día de evaluación. Además en los días de evaluación 4 y 7 se evidenciaron disminuciones de 0,35 y 0,75 unidades logarítmicas en la población microbiana de moras tratadas con una concentración de 0,7 ppm de ozono con respecto al control. En el caso de la concentración de 0,5 ppm de ozono se obtuvieron disminuciones de 0,25 y 0,43 unidades logarítmicas para los días 4 y 7 respectivamente.

Estos resultados son similares a los reportados por **Renumarn, Srilaong, Uthairatanakij, Kanlayanarat, & Jitareerat (2014)**, quienes observaron una disminución en 1,22 unidades logarítmicas de aerobios mesófilos en brocoli sumergido por 5 minutos en agua ozonizada con una concentración de 1,6 ppm. De la misma manera, **Horvitz & Cantalejo (2012)** al tratar muestras de pimientos mínimamente procesados con ozono gaseoso a una concentración de 0,7 ppm obtuvieron una disminución de hasta 2,6 unidades logarítmicas con respecto a su control.

Por el contrario, en el primer y último día de evaluación se observó un aumento de la población microbiana de moras tratadas con ozono en relación al control, **Tzortzakis & Chrysargyris (2017)** manifiestan que al mismo tiempo que el gas elimina la microbiota competitiva, el ozono se degrada continuamente a O₂, aumentando el recuento de microorganismos aerobios, es así que esta pudo ser una causa de la mayor cantidad de microorganismos en las muestras expuestas a ozono.

En la tabla 1 se presentan los resultados promedio de recuentos microbiológicos de psicrótrofos en moras de Castilla tratadas con ozono y control, observando diferencias significativas tanto entre tratamientos como entre días de evaluación.

Tabla 1. Recuentos de microorganismos psicrótrofos en muestras de mora, almacenadas durante 10 días a $6 \pm 1^\circ\text{C}$

Día	Recuentos microbiológicos ($\log(\text{ufc}\cdot\text{g}^{-1})$)		
	Control	0,5 ppm	0,7 ppm
1	$5,40 \pm 0,16$ B b	$5,73 \pm 0,03$ A a	$4,96 \pm 0,01$ C b
4	$7,13 \pm 0,06$ A a	$5,23 \pm 0,00$ C b	$5,84 \pm 0,06$ B a
7	$4,58 \pm 0,02$ A d	$3,50 \pm 0,06$ B d	$4,41 \pm 0,27$ A c
10	$4,83 \pm 0,17$ A c	$4,67 \pm 0,03$ A c	$3,65 \pm 0,01$ B d

Los valores corresponden a la media \pm la desviación estándar de tres réplicas.

Las letras minúsculas indican para cada tratamiento, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los días de evaluación. Las letras mayúsculas indican para cada día, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos aplicados a las moras de Castilla.

La eficiencia del tratamiento con ozono gaseoso fue más evidente en los días 4 y 10 con reducciones de 1,9 y 1,18 unidades logarítmicas en muestras de mora tratada con 0,5 ppm de ozono gaseoso. Con respecto, a los días 1 y 7 se obtuvieron reducciones más significativas al aplicar la concentración de 0,7 ppm de ozono gaseoso, obteniendo valores de 0,44 y 1,08 unidades logarítmicas. Asimismo **Horvitz & Cantalejo (2012)**, obtuvieron reducciones de 0,7 unidades logarítmicas en bacterias psicrótrofas de pimientos mínimamente procesados, expuestos a ozono acuoso (1 mg/L) o gaseoso (0,7 ppm) por 1 minuto.

De la misma forma, **Selma, Beltrán, Chacón, & Gil (2006)** al estudiar la reducción de microbiota nativa (bacterias mesófilas y psicrótrofas) en papas utilizando una concentración más alta (5 ppm) de agua ozonizada por 1 minuto, obtuvieron una reducción de 0,7 unidades logarítmicas de psicrótrofos y no lograron reducciones adicionales en los grupos microbianos cuando el tiempo de exposición aumentó de 1 a 7 minutos.

Por otro lado, **Allende, Marín, Tomás-Barberán, & Gil (2007)** identificaron que el almacenamiento de fresas durante 12 días en una atmósfera con 5000 mg/L O_3 no incidió en una disminución de bacterias psicrótrofas, mesófilas ni mohos y levaduras

comparado con frutas no tratadas a pesar de la alta dosis aplicada. Según **Tzortzakis & Chrysargyris (2017)** una exposición prolongada a ozono puede causar daño al tejido de la fruta, haciendo que esta sea más susceptible a la contaminación microbiana en un periodo de tiempo más corto.

La actividad antifúngica del ozono fue evaluada en mohos y levaduras nativos de moras control y tratadas con ozono y almacenadas durante 10 días a $6 \pm 1^\circ\text{C}$ como se presenta en la figura 2.

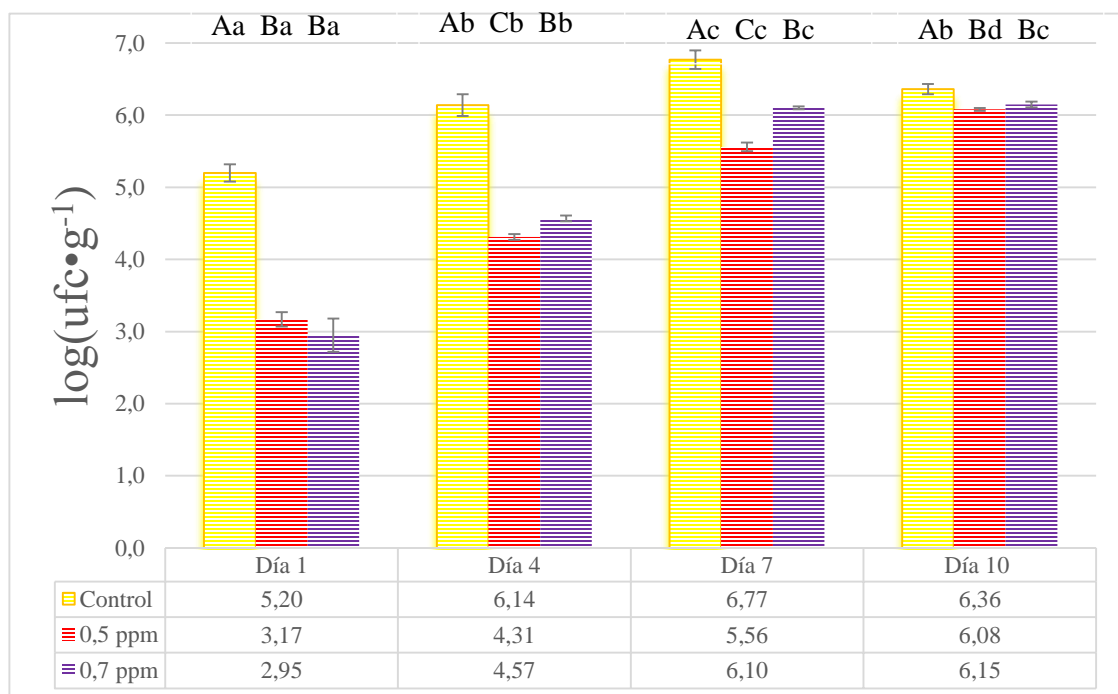


Figura 2. Recuentos de mohos y levaduras en muestras de mora, almacenadas durante 10 días a $6 \pm 1^\circ\text{C}$

Los valores corresponden a la media \pm la desviación estándar de tres réplicas.

Las letras minúsculas indican para cada tratamiento, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los días de evaluación.

Las letras mayúsculas indican para cada día, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos aplicados a las moras de Castilla.

Según **Horvitz, Chanaguano, & Arozarena (2017)**, el elevado contenido de agua, azúcares y otros nutrientes, junto con un pH bajo de las moras de Castilla, favorecen el crecimiento fúngico en estas frutas, pues a diferencia de bacterias, los conidios de los

mohos germinan en medios ácidos de pH entre 3,0 y 7,0 (**Cabezas, 2017**). Es así que en los resultados obtenidos se observan aumentos significativos en los recuentos microbiológicos de mohos y levaduras en el transcurso de los días de evaluación.

Por otro lado, en los dos tratamientos con ozono gaseoso y en todos los días de evaluación, existieron disminuciones en los recuentos de mohos y levaduras, con una reducción máxima de 2,25 unidades logarítmicas en el día 1. Estos resultados son similares a los reportados por **Crowe, Bushway, & Davis-Dentici, (2012)** quienes evaluaron la efectividad antimicrobiana de agua ozonizada (1 mg/L) en arándanos almacenados a -18 °C durante 12 meses, observando disminuciones significativas en los conteos de mohos y levaduras. Sin embargo, en el estudio realizado por **Smilanick, Crisosto, & Mlikota (1999)**, con fresas almacenadas durante 2 días a 6 °C, se determinó que la carga microbiana de mohos y levaduras disminuyó hasta en un 15% pero después del cambio de las muestras ozonizadas a una temperatura de 20 °C, la carga microbiana de mohos y levaduras aumentó.

Bataller-Venta et al. (2010) mencionan que las bajas temperaturas y la alta humedad favorecen la estabilidad del ozono y su efectividad. Por tanto un tratamiento con ozono en contraste con un almacenamiento a bajas temperaturas resultó efectivo en la disminución de la carga microbiana.

En el caso del día 10 aunque existieron diferencias significativas entre el control y los tratamientos con ozono, los valores de reducción fueron mínimos. Dichos resultados concuerdan con los reportados por **Sharpe et al. (2009)** en su estudio realizado en arándanos para evaluar el efecto del ozono gaseoso sobre *B. cinerea*, en donde no existió una inhibición significativa por el tratamiento con ozono gaseoso, que podría atribuirse a una infección latente ocurrida en la etapa de crecimiento de la fruta, en donde el ozono no pudo penetrar el tejido de la fruta para matar los hongos.

Otra razón del escaso efecto del ozono en mohos y levaduras es debido a la estructura celular de estos microorganismos, ya que la pared celular de hongos está compuesta además de glucanos, glucosamina y glicoproteínas, por quitina, misma que también es un componente de exoesqueletos de insectos y ocupa entre el 10 y 20% de la pared celular fúngica, lo que hace que se requiera de una dosis mayor de O₃ o mayor tiempo de exposición para generar la des N-des acetilación de la quitina (**Kabal et al., 2001**).

4.2. Actividad antimicrobiana del ozono gaseoso en patógenos inoculados en mora de Castilla

En la tabla 2 se presenta la evolución de los recuentos microbiológicos de *Botrytis cinerea* durante el almacenamiento refrigerado en moras control y tratadas con ozono gaseoso.

Tabla 2. Recuentos de *Botrytis cinerea* en muestras de mora, almacenadas durante 10 días a 6 ± 1°C

Día	Recuentos microbiológicos (log(ufc·g ⁻¹))		
	Control	0,5 ppm	0,7 ppm
1	5,02 ± 0,11 B bc	4,33 ± 0,04 A a	5,42 ± 0,07 C a
4	4,79 ± 0,06 A a	4,74 ± 0,15 A b	4,77 ± 0,03 A b
7	5,23 ± 0,16 A c	5,28 ± 0,12 A c	5,30 ± 0,11 A a
10	4,87 ± 0,04 A ab	4,46 ± 0,04 C a	4,72 ± 0,05 B b

Los valores corresponden a la media ± la desviación estándar de tres réplicas.

Las letras minúsculas indican para cada tratamiento, diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) entre los días de evaluación. Las letras mayúsculas indican para cada día, diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) entre los tratamientos aplicados a las moras de Castilla.

En los días 1 y 10 se observan diferencias significativas entre los tratamientos con ozono con relación al control, observando un mayor poder antifúngico en la concentración 0,5 ppm con una reducción de hasta 0,69 unidades logarítmicas en el primer día de evaluación. Además, no existieron diferencias significativas de la acción antimicrobiana del tratamiento entre las concentraciones de 0,5 ppm y 0,7 ppm (Figura 3).

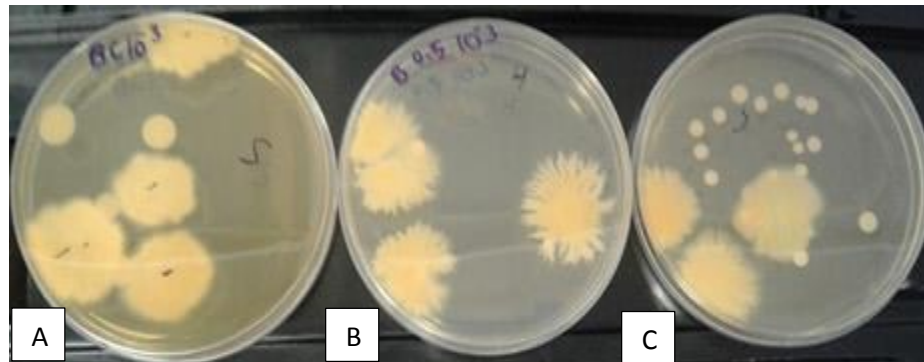


Figura 3. Crecimiento de *Botrytis cinerea* en muestras de mora control (A), expuestas a 0,5 ppm O₃ (B) y 0,7 ppm O₃ (C)

De la misma manera, **Sarig, Zutkhi, Monjauze, Lisker, & Ben-Arie (1997)** comprobaron que la exposición al ozono (8 mg O₃/minuto) es una buena alternativa para controlar la proliferación en *B. cinerea* en uvas de mesa y además, observaron que el ozono provocó la producción de fitoalexinas como resveratrol y pterostilbena, que son polifenoles naturales sintetizados ante la presencia de factores estresantes, como la contaminación fúngica (**Gambini et al., 2012**). Por tanto, la acción oxidante del ozono sumado con la producción de dichos compuestos incidieron en la eliminación de microorganismos causantes de deterioro.

Además, **Krause & Weidensaul (1978)** realizaron estudios *in vivo* e *in vitro* y determinaron que 0,3 µL/L de exposición a ozono en dos periodos de seis horas cada uno inhibieron la germinación y esporulación de *B. cinerea*, contrastando con **Glowacz et al. (2014)**, quienes observaron que la incidencia de la enfermedad conocida como podredumbre gris causada por *B. cinerea* no siempre se puede reducir en los productos tratados con ozono; sin embargo, la exposición al ozono reduce la propagación de la enfermedad por reducción de la producción y la viabilidad de las esporas.

Por el contrario, en el día 7 no se evidenció una disminución de la carga microbiana como respuesta al tratamiento con ozono gaseoso. La forma irregular de la mora, pudo hacer que las esporas de *B. cinerea* se alojaran en los espacios entre bayas, haciendo difícil el acceso a la oxidación. **Daş, Gürakan, & Bayındırh, (2006)** determinaron que el nivel de reducción de los recuentos microbianos en zanahorias y lechuga fue menor en comparación con tomates debido a que, en una estructura rugosa, las células bacterianas estuvieron protegidas del ozono. Por tanto, tiempos de exposición más largos y concentraciones más altas podrían mejorar la acción antimicrobiana del gas llegando a zonas donde los microorganismos pueden estar protegidos. A la vez, un tratamiento con ozono acuoso es más eficiente en productos con superficies rugosas, debido a que la acción mecánica del agua desplaza las células microbianas de la superficie del fruto (**Alwi & Ali, 2014; Palou et al., 2002**).

Los microorganismos patógenos *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus* mostraron una inhibición de crecimiento que podría atribuirse al efecto del pH, puesto que la muestra de mora tuvo un pH de 2,9 y el pH mínimo de crecimiento para *E. coli*, *S. enterica* y *S. aureus* es 4,4; 3,8 y 4,2 respectivamente (**Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria Erika; 2013a, b y c**). Por lo tanto para comprobar la eficacia del ozono, se trituraron muestras de mora a las que se les ajustó el pH con hidróxido de sodio (0,1 N), con el fin de alcanzar el valor óptimo para cada microorganismo.

Los resultados de la actividad antibacterial del ozono evaluada en pulpa de mora inoculada con *E. coli* y almacenada durante 10 días a $6 \pm 1^\circ\text{C}$ se presentan en la figura 4.

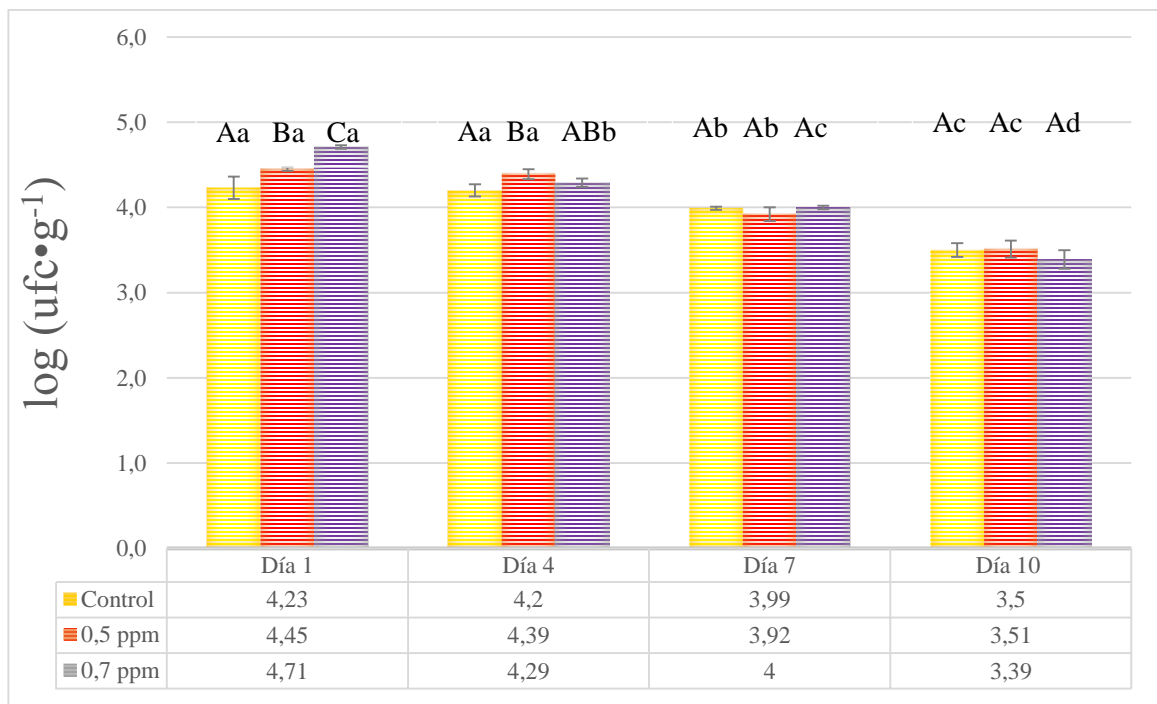


Figura 4. Recuentos microbiológicos de *E. coli* en muestras de mora, almacenadas durante 10 días a 6 ± 1 °C

Los resultados se expresan como la media de seis mediciones y las barras de error representan el intervalo de confianza del 95 % de la media. Las letras mayúsculas diferentes indican, para cada día, diferencias significativas entre los tratamientos aplicados a las moras de Castilla. Las letras minúsculas diferentes indican, para cada tratamiento, diferencias significativas entre los días de evaluación.

En los días 1 y 4 se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo no se comprueba una acción antibacteriana en las muestras tratadas con ozono en relación al control. Con respecto a los días 7 y 10, no existieron diferencias entre los tratamientos, ni una reducción significativa de la carga microbiana en relación al control.

Algunos investigadores han indicado que la viabilidad de *E. coli* no se vió afectada por la exposición a corto plazo al gas ozono, pero la permeabilidad de la membrana se vió comprometida. Sin embargo, cuando las células de *E. coli* se sometieron a una exposición prolongada al ozono, las proteínas intracelulares y el ADN se vieron afectados y hubo una disminución en la viabilidad de las células (Komanapalli & Lau, 1996).

Bialka & Demirci, (2007b) observaron una reducción de hasta 2,9 y 5,6 unidades logarítmicas en fresas y frambuesas respectivamente, inoculadas con *E. coli* y expuestas a una concentración de 50000 ppm en tiempos de 1 hasta 60 minutos. **Bermúdez-Aguirre & Barbosa-Cánovas (2013)** determinaron que el tratamiento con ozono gaseoso a una concentración de 5 ppm por 3 minutos fue efectivo para reducir en 2,2 unidades logarítmicas los recuentos de *E. coli*. Es así que probablemente se pueden lograr reducciones microbianas más altas con mayores dosis de ozono. Sin embargo, como la sensibilidad del ozono varía en diferentes productos, es necesario establecer una dosis óptima para cada uno, en especial para la mora debido a su estructura frágil.

En la tabla 3 se presentan los resultados de la actividad antibacterial del ozono evaluada en pulpa de mora inoculada con *S. enterica* y almacenada durante 10 días a $6 \pm 1^\circ\text{C}$.

Tabla 3. Recuentos de *Salmonella enterica* en muestras de mora, almacenadas durante 10 días a $6 \pm 1^\circ\text{C}$

Día	Recuentos microbiológicos ($\log(\text{ufc} \cdot \text{g}^{-1})$)		
	Control	0,5 ppm	0,7 ppm
1	5,48 \pm 0,01 A b	6,25 \pm 0,11 B a	6,97 \pm 0,03 C a
4	6,50 \pm 0,08 A a	6,37 \pm 0,03 A a	6,46 \pm 0,10 A b
7	4,65 \pm 0,06 A c	6,07 \pm 0,03 B b	6,16 \pm 0,10 B c
10	4,08 \pm 0,14 A d	3,54 \pm 0,07 B c	3,30 \pm 0,24 B d

Los valores corresponden a la media \pm la desviación estándar de tres réplicas.

Las letras minúsculas indican para cada tratamiento, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los días de evaluación.

Las letras mayúsculas indican para cada día, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos aplicados a las moras de Castilla.

Como se puede observar, no se obtuvo una reducción de la carga microbiana en las muestras tratadas con ozono en los primeros días de evaluación; sin embargo en el día 10 existieron diferencias significativas entre el control y los tratamientos con ozono,

observando además una disminución de la carga microbiana de 0,54 y 0,78 unidades logarítmicas en el tratamiento con 0,5 y 0,7 ppm de ozono gaseoso con respecto al control.

Selma et al. (2008) obtuvieron una mayor reducción de carga microbiana en melones maduros expuestos a una concentración de 10000 ppm de ozono gaseoso por 30 minutos al vacío, con un valor de 2,8 unidades logarítmicas. De la misma forma, **Alwi & Ali (2014)** estudiaron la actividad antimicrobiana del ozono gaseoso a una concentración de 9 ppm por 6 horas en pimientos cortados e inoculados con *S. enterica* obteniendo una reducción de 2,89 unidades logarítmicas.

No obstante, las dosis utilizadas en el presente estudio no fueron suficientes para lograr un estrés oxidativo a las células de *S. enterica* y *E. coli* que altere su estructura y provoque una lisis celular. Además, **Prez et al. (1999)** mostraron que la N-acetilglucosamina, un compuesto presente en el peptidoglicano de la pared celular bacteriana, fue resistente a la acción del ozono en soluciones acuosas con pH entre 3,0 y 7,0.

De la misma forma, se identificó una disminución en la efectividad del tratamiento con ozono cuando se aplicó en frutas cortadas, debido a que estas producen jugos orgánicos como lignina y suberina en la superficie cortada y estos compuestos protegen contra la actividad antibacteriana del ozono (**Alexopoulos et al., 2013**). Por otro lado, **Kim et al. (1999)** mencionaron que la descomposición del ozono es tan rápida en la fase acuosa de los alimentos que su acción antimicrobiana puede tener lugar principalmente en la superficie, por lo tanto ésta podría ser la principal causa de la escasa o nula actividad antibacteriana del ozono en *E. coli* y *S. enterica*.

Finalmente, con respecto a la bacteria *S. aureus*, no se observó crecimiento en ninguno de los tratamientos, incluido el control a pesar de haber corregido el pH para que sea el óptimo para su crecimiento. La principal causa de esta inhibición pudo deberse a que se ha encontrado que compuestos fenólicos en *berries*, especialmente del género *Rubus*, llamados elagitaninos, son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias Gram

positivas y Gram negativas, siendo *S. aureus* la más susceptible (Puupponen-Pimia et al., 2005).

4.3. Análisis de la tasa respiratoria de moras de Castilla expuestas a ozono gaseoso

En la figura 5 se presenta la tasa respiratoria de moras de Castilla control y expuestas a concentraciones de ozono de 0,5 y 0,7 ppm durante 3 minutos y almacenadas en refrigeración a 6 ± 1 °C durante 10 días.

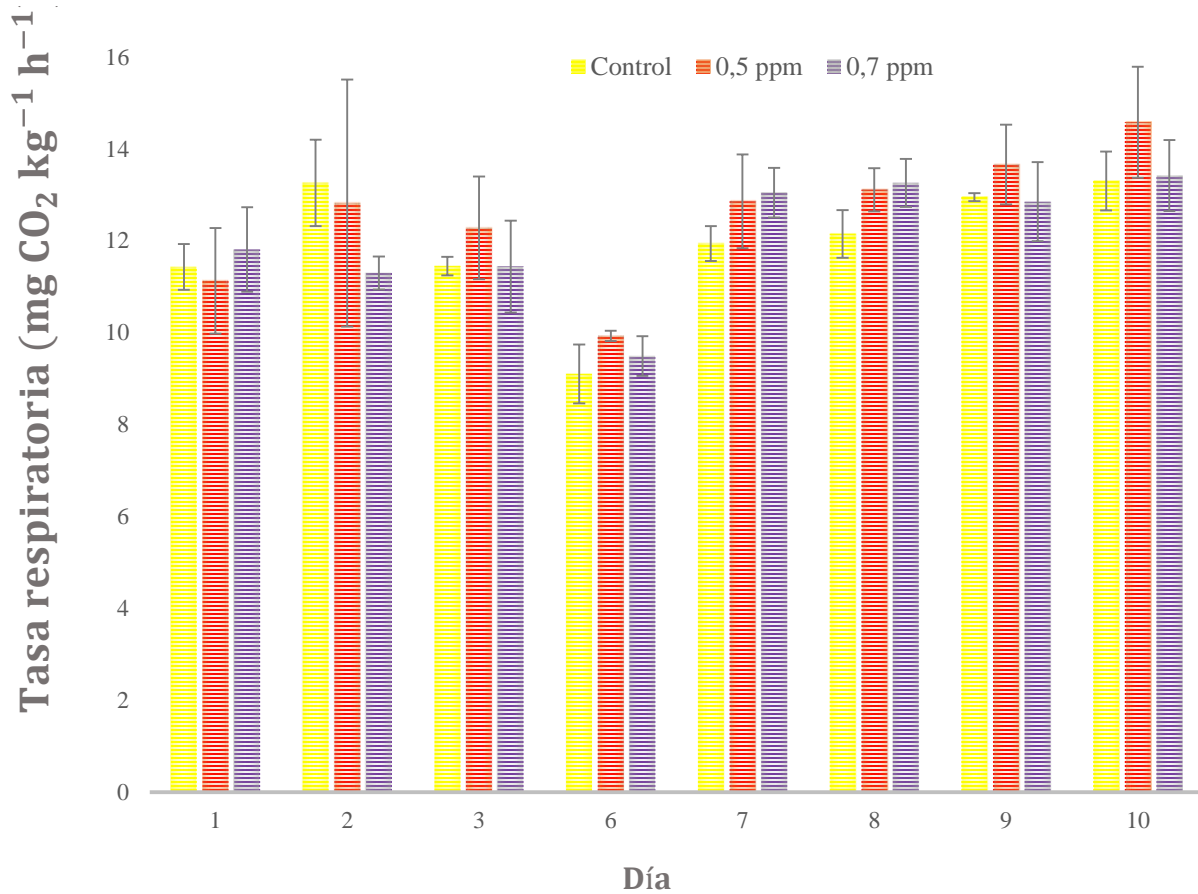


Figura 5. Comportamiento de la tasa respiratoria de moras de Castilla control y expuestas a concentraciones de ozono de 0,5 y 0,7 ppm, almacenadas en refrigeración a 6 ± 1 °C durante 10 días.

Los resultados se expresan como la media de nueve mediciones y las barras de error representan el intervalo de confianza del 95 % de la media

Independientemente del tratamiento considerado, la tasa respiratoria de las moras aumentó durante el almacenamiento. Además el comportamiento de la tasa de respiración de los diferentes tratamientos es propio del carácter no climatérico de los frutos de la mora de Castilla.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en las muestras tratadas con ozono gaseoso con respecto al control. Este resultado concuerda con los hallados en lechugas recién cortadas lavadas con agua ozonizada en las que no se observaron diferencias en la concentración de gas y la tasa de respiración debido al tratamiento con O₃ (Beltrán, Selma, Marín, & Gil, 2005). Asimismo, en el estudio realizado por Palou et al. (2002) con duraznos expuestos a 0,3 ppm de ozono gaseoso se determinó que el tratamiento con ozono no afectó la tasa de respiración.

Según Miller et al. (2013), las bajas concentraciones de ozono por lo general no tienen un efecto significativo sobre la respiración durante el almacenamiento, sin embargo, algunos hallazgos han reportado daños fisiológicos en los productos tratados en los que se ha utilizado concentraciones mayores de ozono. Se constata que las dosis de ozono utilizadas (0.5 y 0.7 ppm) no causaron alteraciones en la tasa respiratoria de moras de Castilla.

4.4. Verificación de hipótesis

De acuerdo a los resultados obtenidos se acepta la hipótesis nula debido a que el tratamiento de moras de Castilla con ozono gaseoso no influyó en la tasa respiratoria de la fruta.

Con respecto a la actividad antimicrobiana se acepta la hipótesis alternativa puesto que la aplicación postcosecha de ozono gaseoso si influyó en la calidad microbiológica de mora de Castilla.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

La aplicación postcosecha de ozono gaseoso en concentraciones de 0,5 ppm y 0,7 ppm durante 3 minutos en mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) incidió en la calidad microbiológica, pero no afectó la tasa respiratoria de la fruta almacenada en refrigeración durante 10 días a 6 ± 1 °C.

Los microorganismos nativos (aerobios mesófilos totales, psicrótrofos, mohos y levaduras) de moras de Castilla demostraron una disminución de su carga microbiana ante la exposición a diferentes concentraciones de ozono gaseoso durante 3 minutos.

El ozono gaseoso demostró tener actividad antifúngica contra *B. cinerea*. En el caso de las bacterias *E. coli* y *S. enterica*, a pesar de la modificación de las condiciones de pH para su crecimiento no se observó una reducción significativa de carga microbiana después del tratamiento con ozono

No se observó crecimiento en *S. aureus* en ninguno de los tratamientos, incluido el control, posiblemente debido al efecto de compuestos fenólicos presentes en moras de Castilla, capaces de inhibir el crecimiento de esta bacteria.

La aplicación de ozono gaseoso a concentraciones de 0.5 ppm y 0.7 ppm por 3 minutos en moras de Castilla, seguido de un almacenamiento refrigerado a 6 ± 1 °C no causaron cambios en la tasa respiratoria de los frutos.

5.2. Recomendaciones

Determinar la capacidad antimicrobiana del ozono en moras de Castilla a diferentes temperaturas de almacenamiento y diferentes porcentajes de humedad, con el fin de encontrar el tratamiento óptimo para la conservación de esta fruta.

Identificar el efecto del ozono en la actividad fisiológica, específicamente en la producción de etileno de frutas climatéricas de la provincia, mediante cromatografía de gases.

Realizar un estudio a nivel molecular en moras de Castilla tratadas con ozono gaseoso para determinar el mecanismo de defensa que los componentes de la fruta desarrollan ante el estrés por ataque de microorganismos.

Determinar cuantitativamente la presencia de compuestos fenólicos denominados elagitaninos en moras de Castilla, y evaluar su aplicación en el desarrollo de productos que beneficien la salud de la población.

Referencias bibliográficas

- Aguayo, E., Escalona, V. H., & Artés, F. (2006). Effect of cyclic exposure to ozone gas on physicochemical, sensorial and microbial quality of whole and sliced tomatoes. *Postharvest Biology and Technology*, 39(2), 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.11.005>.
- Akbas, M. Y., & Olmez, H. (2007). Effectiveness of organic acid, ozonated water and chlorine dippings on microbial reduction and storage quality of fresh-cut iceberg lettuce. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2609–2616. <https://doi.org/10.1002/jsfa>.
- Alexopoulos, A., Plessas, S., Ceciu, S., Lazar, V., Mantzourani, I., Voidarou, C., ... Bezirtzoglou, E. (2013). Evaluation of ozone efficacy on the reduction of microbial population of fresh cut lettuce (*Lactuca sativa*) and green bell pepper (*Capsicum annuum*). *Food Control*, 30(2), 491–496. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.018>.
- Allende, A., Marín, A., Tomás-Barberán, F., & Gil, M. I. (2007). Impact of combined postharvest treatments (UV-C light, gaseous O₃, superatmospheric O₂ and high CO₂) on health promoting compounds and shelf-life of strawberries. *Postharvest Biology and Technology*, 46, 201–211. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.05.007>
- Alwi, N. A., & Ali, A. (2014). Reduction of *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* sv. Typhimurium populations on fresh-cut bell pepper using gaseous ozone. *Food Control*, 46, 304–311.
- Alzate, A., Mayor, N., & Montoya, S. (2010). Influencia del manejo agronómico, condiciones edáficas y climáticas sobre las propiedades fisicoquímicas y fisiológicas de la mora (*Rubus glaucus* Benth.) en dos zonas de la región centro sur del departamento de Caldas. *Universidad de Caldas, Instituto de Biotecnología Agropecuaria*, 18(2), 37–46.
- Archer, D. L. (2004). Freezing: an underutilized food safety technology. *International Journal of Microbiology*, 90(2), 127–138.
- Ayala, L. C., Valenzuela, C. P., & Bohórquez, Y. (2015). Caracterización fisicoquímica de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) en seis estados de madurez. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(2), 10–18.
- Barrera, V. H., Alwang, J., Andrango, G., Domínguez Andrade, J. M., Escudero, L., & Martínez, A. (2017). Tipificación de los productores de mora de Ecuador para optimizar sus estrategias de medios de vida. En *2do Concurso Nacional de Investigación Agroeconómica* (pp. 1-23). Quito, Ecuador: Ministerio de Agricultura y Ganadería. Recuperado de:

http://sinagap.agricultura.gob.ec/index.php/1tematica_victor_hugo_barrera7.

- Barth, M., Zhou, C., Mercier, J., & Payne, F. A. (1995). Ozone storage effects on anthocyanin content and fungal growth in blackberries. *Journal of Food Science*, *60*, 1286–1288.
- Bataller-Venta, M., Cruz-Broche, S. S., & García-Pérez, M. A. (2010). El ozono: una alternativa sustentable en el tratamiento poscosecha de frutas y hortalizas. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, *41*(3), 155–164.
- Beattie, J., Crozier, A., & Duthie, G. G. (2005). Potential health benefits of berries. *Current Nutrition & Food Science*, *1*(1), 71–86.
- Beltrán, D., Selma, M. V., Marín, A., & Gil, M. I. (2005). Ozonated water extends the shelf life of fresh-cut lettuce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(14), 5654–5663.
- Bermúdez-Aguirre, D., & Barbosa-Cánovas, G. (2013). Disinfection of selected vegetables under nonthermal treatments: Chlorine, acid citric, ultraviolet light and ozone. *Food Control*, *29*(1), 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.073>.
- Bialka, K., & Demirci, A. (2007a). Decontamination of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* on blueberries using ozone and pulsed UV-light. *Journal of Food Science*, *72*, 391–396.
- Bialka, K. L., & Demirci, A. (2007b). 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 Recubrimientos de Quitosano y ϵ -Polilisina en moras inoculadas con Escherichia coli, Salmonella enterica y Botrytis cinerea* (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato. Ambato, Ecuador.
- Calero, V. (2010). *Estudio de prefactibilidad para la producción de mora (Rubus lanciniatus) variedad Brazos, en Atuntaquí-Imbabura* (Tesis de pregrado). Universidad San Francisco de Quito. Quito, Ecuador.
- Campuzano, S., Mejía, D., Madero, C., & Pabón, P. (2015). Determinación de la calidad microbiológica y sanitaria de alimentos preparados vendidos en la vía pública de la ciudad de Bogotá DC. *Nova*, *13*(23), 81–92.
- Cañet, F., Gordillo, M., Vega, M., & Pérez, L. (2004). Manual de manejo poscosecha de frutas y vegetales para mercados selectos y la exportación. *INIFAT, La Habana. Cuba*.

- Crowe, K. M., Bushway, A., & Davis-Dentici, K. (2012). Impact of postharvest treatments, chlorine and ozone, coupled with low-temperature frozen storage on the antimicrobial quality of lowbush blueberries (*Vaccinium angustifolium*). *LWT-Food Science and Technology*, 47(1), 213–215. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.12.026>.
- Daş, E., Gürakan, C., & Bayındırlı, 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, 430–438. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.08.002>.
- Di Renzo, G. C., Altieri, G., D'erchia, L., Lanza, G., & Strano, M. C. (2005). Effects of gaseous ozone exposure on cold stored orange fruit. *Acta Horticulturae*, 682, 1605–1610.
- Doyle, M. P., & Erickson, M. C. (2008). Summer meeting 2007—the problems with fresh produce: An overview. *Journal of Applied Microbiology*, 105(2), 317–330.
- Emer, Z., Akbas, M. Y., & Ozdemir, M. (2008). Bactericidal activity of ozone against *Escherichia coli* in whole and ground black peppers. *Journal of Food Protection*, 71(5), 914–917.
- Farinango, M. (2010) *Estudio de la fisiología postcosecha de la mora de Castilla (Rubus glaucus Benth) y de la mora variedad Brazos (Rubus sp.)*. (Tesis de pregrado). Universidad Politécnica Nacional. Quito, Ecuador.
- Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria Elika. (2013a). *Escherichia coli*. Recuperado de: http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento84/3.Ecoli.pdf. [17/05/2018].
- Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria Elika. (2013b). *Salmonella*. Recuperado de: http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento82/1.Salmonella.pdf. [17/05/2018].
- Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria Elika. (2013c). *Staphylococcus aureus*. Recuperado de: https://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento95/7.Staphylococcus.pdf [17/05/2018].
- Gambini, J., López-Grueso, R., Olaso-González, G., Inglés, M., Abdelazid, K., El Alami, M., ... Viña, J. (2012). Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. *Revista Española de Geriátria y Gerontología*, 48(2), 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.regg.2012.04.007>.

- Giuggioli, N. R., Briano, R., Girgenti, V., & Peano, C. (2015). Quality effect of ozone treatment for the red raspberries storage. *Chemical Engineering*, *44*, 25–30.
- Glowacz, M., Colgan, R., & 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. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6776>.
- Guedes, M. N. S., Abreu, C. M. P. D., Maro, L. A. C., Pio, R., Abreu, J. R. D., & Oliveira, J. O. D. (2013). Chemical characterization and mineral levels in the fruits of blackberry cultivars grown in a tropical climate at an elevation. *Acta Scientiarum Agronomy*, *35*(2), 191–196.
- Guzel-Seydim, Z. B., Greene, A. K., & Seydim, A. C. (2004). Use of ozone in the food industry. *LWT-Food Science and Technology*, *37*(4), 453–460. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2003.10.014>.
- Horvitz, S., & Cantalejo, M. J. (2010). Effects of aqueous ozone on quality of minimally processed red bell pepper. *Acta Horticulturae*, *858*, 329–334.
- Horvitz, S., & Cantalejo, M. (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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03053.x>.
- Horvitz, S., & 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. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.584353>.
- Horvitz, S. (2017). Postharvest handling of berries. In *Postharvest Handling*. Tech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69073>.
- Horvitz, S., Chanaguano, D., & Arozarena, I. (2017). Andean blackberries (*Rubus glaucus* Benth) quality as affected by harvest maturity and storage conditions. *Scientia Horticulturae*, *226*, 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.09.002>.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC). (2001). III Censo Nacional Agropecuario. Recuperado de: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/censo-nacional-agropecuario> [25/10/2017].
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). (2016). Información levantada por parte de las Direcciones Provinciales Agropecuarias del MAGAP, consolidada por la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP, 2015-2016. Cifras no publicadas [25/10/2017].
- Kabal, N. N., Murinov, K. Y., Mullagaliev, I. R., Krasnogorskaya, N. N., Shereshovets, V. V., Monakov, Y. B., 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., & Velioglu, Y. S. (2007). Ozone applications in fruit and vegetable processing. *Food Reviews International*, 23(1), 91–106. <https://doi.org/10.1080/87559120600998221>.
- Khadre, M. A., & Yousef, A. E. (2001). Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. *International Journal of Food Microbiology*, 71(2–3), 131–138. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00561-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00561-X).
- Khadre, M. A., Yousef, A. E., & Kim, J. G. (2001). Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. *Journal of Food Science*, 66(9), 1242–1252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb15196.x>.
- Kim, J. G., Yousef, A. E., & Dave, S. (1999). Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: A review. *Journal of Food Protection*, 62(9), 1071–1087.
- Kim, J. G., Yousef, A. E., & Khadre, M. A. (2003). Ozone and its current and future application in the food industry. *Advances in Food and Nutrition Research*, 45, 167–218.
- Komanapalli, I. R., & Lau, B. H. S. (1996). Ozone-induced damage of *Escherichia coli* K-12. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46(5–6), 610–614.
- Krause, C. R., & Weidensaul, T. C. (1978). Effects of ozone on the sporulation, germination and pathogenicity of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 68, 195–197.
- Li, C. S., & Wang, Y. C. (2003). Surface germicidal effects of ozone for microorganisms. *Aiha Journal*, 64(4), 533–537.
- Mejía, P. (2011). *Caracterización morfoagronómica de genotipos de mora (Rubus glaucus Benth) en la granja experimental Tumbaco-INIAP* (Tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica del Ejército. Quito, Ecuador.
- Miller, F. A., Silva, C. L. M., & Brandão, T. R. S. (2013). A review on ozone-based treatments for fruit and vegetables preservation. *Food Engineering Reviews*, 5(2), 77–106. <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9064-5>.
- Ministerio de Salud Pública (MSP). (2018). Anuario de Vigilancia Epidemiológica 1994–2017. Recuperado de: <https://public.tableau.com/profile/vvicentee80#!/vizhome/ETAS-2014/ANUARIO> [09/10/2018].

- Moore, G., Griffith, C., & Peters, A. (2000). Bactericidal properties of ozone and its potential application as a terminal disinfectant. *Journal of Food Protection*, 63(8), 1100–1106. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.8.1100>.
- Painter, J., Hoekstra, R., Ayers, T., Tauxe, R., Braden, R., Angulo, F., & Griffin, P. (2013). Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998-2008. *Emerging Infectious Diseases*, 19(3), 407–415.
- Palou, L., Crisosto, C. H., Smilanick, J. L., Adaskaveg, J. E., & 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. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00118-1](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00118-1).
- Palou, L., Smilanick, J. L., Crisosto, C. H., & Mansour, M. (2001). Effect of gaseous ozone exposure on the development of green and blue molds on cold stored citrus fruit. *Plant Disease*, 85(6), 632–638. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.6.632>.
- Pérez-Rey, R., Chávez, H., & Baluja, C. (1995). Ozone inactivation of biologically-risky wastewaters. *Ozone: Science & Engineering*, 17(5), 499–509. <https://doi.org/10.1080/01919512.1995.10555763>.
- Perry, J. J., & Yousef, A. E. (2011). Decontamination of raw foods using ozone-based sanitization techniques. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2, 281–298.
- Previdi, M., Fiori, R., Dallacasa, N., Fortini, G., & Franceschini, B. (2016). The effects of gaseous ozone treatment on the safety and shelf life of berries. *International Journal of Advanced Research*, 4(10), 16–24.
- Prez, A. G., Sanz, C., Ros, J., Olas, R., & Olas, J. (1999). Effects of ozone treatment on postharvest strawberry quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1652–1656. <https://doi.org/10.1021/jf980829l>.
- Puupponen-Pimia, R., Nohynek, L., Hartmann-Schmidlin, S., Kahkonen, M., Heinonen, M., Maatta-Riihinen, K., & Oksman-Caldentey, K. M. (2005). Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 991–1000. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02547.x>.
- Rahman, S., Ding, T., & Deog-Hwan, O. (2010). Inactivation effect of newly developed low concentration electrolyzed water and other sanitizers against microorganisms on spinach. *Food Control*, 21(10), 1383–1387. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.03.011>.

- Ramírez, J., Aristizabal, I., & Restrepo, J. (2013). Conservación de mora de Castilla mediante la aplicación de un recubrimiento comestible de gel de mucílago de penca de sábila. *Vitae*, 20(3), 172–183.
- Rennumarn, P., Srilaong, V., Uthairatanakij, A., Kanlayanarat, S., & Jitareerat, P. (2014). The effects of immersion methods and concentration of ozonated water on the microbial counts and the quality and sensory attributes of fresh-cut broccoli. *International Food Research Journal*, 21(2), 533–539.
- Rice, R. G. (1999). Ozone in the United States of America-State-of-the-art. *Ozone: Science & Engineering*, 21(2), 99–103.
- Sarig, P., Zutkhi, Y., Monjauze, A., Lisker, N., & Ben-Arie, R. (1997). Phytoalexin elicitation in grape berries and their susceptibility to *Rhizopus stolonifer*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 50, 337–347.
- Schirra, M., Delogu, G., Cabras, P., Angioni, A., D'hallewin, G., Veyrat, A., & Candelas, L. G. (2002). Complexation of imazalil with β -cyclodextrin, residue uptake, persistence, and activity against *Penicillium* decay in citrus fruit following postharvest dip treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6790–6797.
- Selma, M. V., Ibáñez, A. M., Cantwell, M., & Suslow, T. (2008). Reduction by gaseous ozone of *Salmonella* and microbial flora associated with fresh-cut cantaloupe. *Food Microbiology*, 25(4), 558–565. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.02.006>.
- Selma, V., Beltrán, D., Chacón, E., & Gil, I. (2006). Effect of ozone on the inactivation of *Yersinia enterocolitica* and the reduction of natural flora on potatoes. *Journal of Food Protection*, 69(10), 2357–2363.
- Singh, N., Singh, R. K., Bhunia, A. K., & Stroshine, R. L. (2002). Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157: H7 on lettuce and baby carrots. *LWT-Food Science and Technology*, 35(8), 720–729. <https://doi.org/10.1006/fstl.2002.0933>.
- Sharpe, D., Fan, L., McRae, K., Walker, B., MacKay, R., & Doucette, C. (2009). Effects of Ozone Treatment on *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. Relation. *Food Microbiology and Safety*, 74(6), 250–257. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01234.x>
- Smilanick, J. L., Crisosto, C., & Mlikota, F. (1999). Postharvest use of ozone on fresh fruit. *Perishables Handling Quarterly*, (99), 10–14.
- Suslow, T. (1998). Basics of Ozone Applications for Postharvest Treatment of Fruits and Vegetables. *Perishables Handling Quarterly*, (94), 9–11.

- Tanimura, Y., Hirotsuji, J., & Tanaka, K. (1998). Food preservation technique using a mixed gas containing negative ions and ozone. *Shokuhin Kogyo (Food Industry)*, *41*(10), 71–77.
- Tavares, L., Figueira, I., Macedo, D., McDougall, G. J., Leitão, M. C., Vieira, H. L., & Santos, C. N. (2012). Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus* sp.) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, *131*(4), 1443–1452.
- Tournas, V. H., & Katsoudas, E. (2005). Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. *International Journal of Food Microbiology*, *105*(1), 11–17.
- Tzortzakis, N. (2015). Gaseous ozone-enrichment for the preservation of fresh produce. *Acta Horticulturae*, *1079*, 273–278. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1079.32>.
- Tzortzakis, N., & Chrysargyris, A. (2017). Postharvest ozone application for the preservation of fruits and vegetables. *Food Reviews International*, *33*(3), 270–315. <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1175015>.
- Tzortzakis, N., Singleton, I., & Barnes, J. (2007). Deployment of low-level ozone-enrichment for the preservation of chilled fresh produce. *Postharvest Biology and Technology*, *43*(2), 261–270. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.09.005>.
- Tzortzakis, N., Singleton, I., & Barnes, J. (2008). Impact of low-level atmospheric ozone-enrichment on black spot and anthracnose rot of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *47*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.06.004>.
- Wani, S., Barnes, J., & Singleton, I. (2016). Investigation of potential reasons for bacterial survival on ‘ready-to-eat’ leafy produce during exposure to gaseous ozone. *Postharvest Biology and Technology*, *111*, 185–190.

ANEXOS

Anexo A. Fotografías de la fase experimental



Figura 6. Envasado de la fruta en envases PET



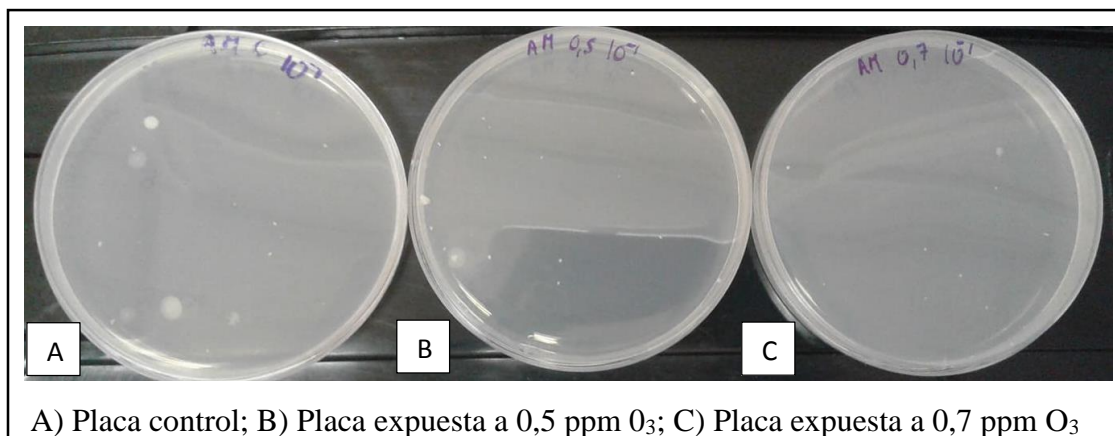
Figura 7. Placas Petri con medio de cultivo para siembra de microorganismos



Figura 8. Medición de la concentración gaseosa para la determinación de la tasa respiratoria

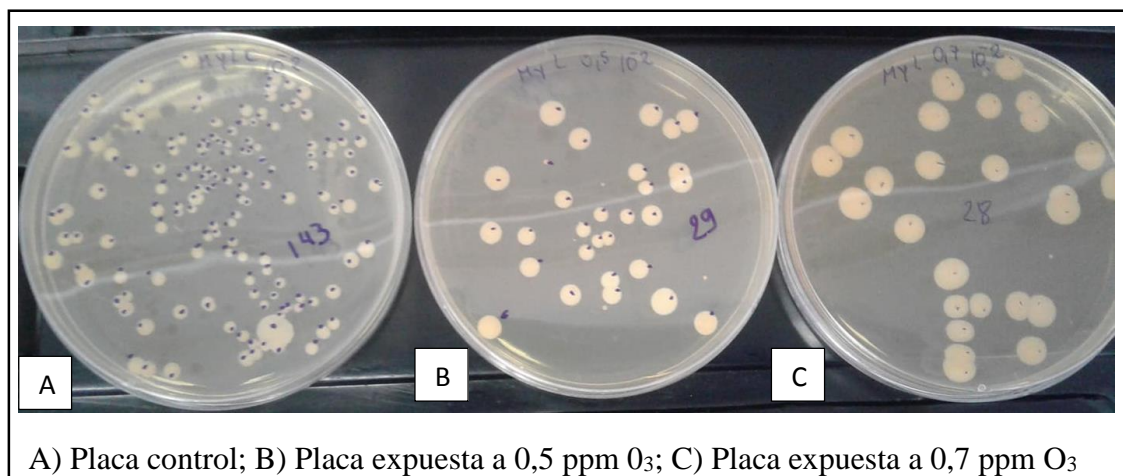


Figura 9. Ajuste de pH en pulpa de mora para la inoculación de *E. coli*, *S. enterica* y *S. aureus*



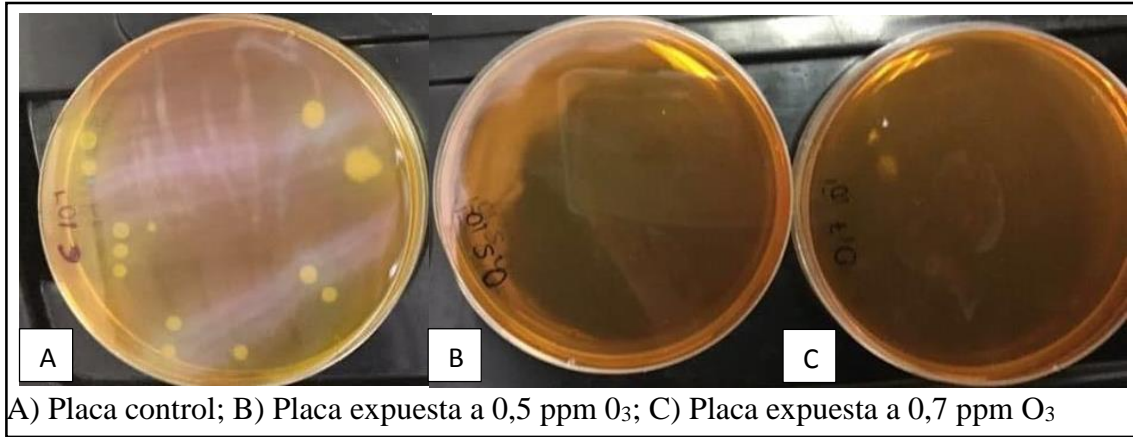
A) Placa control; B) Placa expuesta a 0,5 ppm O₃; C) Placa expuesta a 0,7 ppm O₃

Figura 10. Colonias de aerobios mesófilos en placas control (A), expuestas a 0,5 (B) y 0,7 (C) ppm de ozono gaseoso



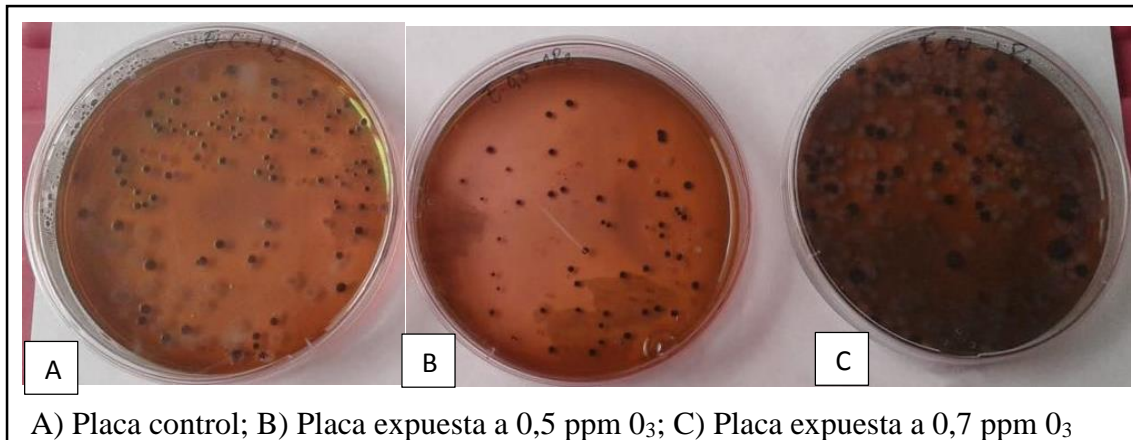
A) Placa control; B) Placa expuesta a 0,5 ppm O₃; C) Placa expuesta a 0,7 ppm O₃

Figura 11. Colonias de mohos y levaduras



A) Placa control; B) Placa expuesta a 0,5 ppm O₃; C) Placa expuesta a 0,7 ppm O₃

Figura 12 Colonias de *Salmonella enterica*



A) Placa control; B) Placa expuesta a 0,5 ppm O₃; C) Placa expuesta a 0,7 ppm O₃

Figura 13. Colonias de *Escherichia coli*