



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



Evaluación del efecto de un recubrimiento con quitosano sobre la calidad postcosecha de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth)

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

El presente estudio es parte del proyecto: “**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 la Ph.D. Sandra Horvitz.

Autora: Mayra Alexandra Guamushig Tarco

Tutor: Ph.D. Sandra Horvitz Szoichet

Ambato – Ecuador

Septiembre 2017

APROBACIÓN DEL TUTOR

Ph.D. Sandra Horvitz Szoichet

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, 18 de julio del 2017



Ph.D. Sandra Horvitz Szoichet

AAA483083

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Mayra Alexandra Guamushig Tarco, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniería en Alimentos son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Mayra Alexandra Guamushig Tarco

C.I. 050397110-3

AUTORA

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueba-n 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



Ph.D. Ignacio Ángel Angós Iturgaiz

C.I. 175697822-5



Ph.D. Orestes Darío López Hernández

C.I. 175478486-4

Ambato, 11 de Septiembre del 2017

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.



Mayra Alexandra Guamushig Tarco

C.I. 050397110-3

AUTORA

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mis padres Tobías y Luz por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su apoyo incondicional en los momentos más difíciles, por brindarme su amor infinito en todo momento, por su ejemplo de perseverancia y humildad que me llevo a cumplir esta meta importante en mi vida.

A mi hermano Wilfrido por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos y por la motivación constante que me ha permitido cumplir mi propósito.

A mi esposo Marco por su amor incondicional, por creer en mí, por apoyarme en todo momento para cumplir mi sueño.

A mi hija Melany Abigail quien ha sido y será mi mayor motivación, inspiración y felicidad.

Mayra Guamushig

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme dado la vida, guiarme y darme fuerza para superar los obstáculos y dificultades a lo largo de toda mi vida.

A la Universidad Técnica de Ambato, en especial a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, por permitirme prepararme como profesional.

A todos los docentes por impartir sus conocimientos y enseñanzas que son muy valiosos y que nos permiten estar preparados para un futuro competitivo.

A la Doctora Sandra Horvitz (tutora), por la paciencia y dedicación en el desarrollo del proyecto y por su valiosa guía y asesoramiento en la realización del mismo, por sus conocimientos compartidos, tiempo dedicado y especialmente por su amistad.

A la Doctora Mirari Arancibia, al Químico César Yambay y al Doctor Ignacio Angos que con sus valiosos conocimientos aportaron de manera significativa en este proyecto.

A mis amigas y compañeras de tesis Gissela y Evelyn por todos los buenos momentos que hemos pasado juntas y apoyándonos a lo largo de la carrera y en la culminación de esta meta.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I EL PROBLEMA

1.1 TEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.2 JUSTIFICACIÓN	1
1.3 OBJETIVOS.....	2
1.3.1 OBJETIVO GENERAL	2
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	3
2.2 HIPÓTESIS	5
2.3 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LA HIPÓTESIS	5
2.3.1 VARIABLE INDEPENDIENTE.....	5
2.3.2 VARIABLE DEPENDIENTE.....	5

CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES.....	6
3.1.1 MATERIA PRIMA	6
3.1.2 REACTIVOS	6
3.2 MÉTODOS.....	7
3.2.1 RECUBRIMIENTO DE QUITOSANO	7
3.2.1.1 Preparación	7
3.2.1.2 Aplicación	7
3.2.2 ENVASADO Y ALMACENAMIENTO.....	7
3.2.3 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS	8
3.2.3.1 Tamaño	8

3.2.3.2 <i>Humedad</i>	8
3.2.3.3 <i>Pérdida de peso</i>	8
3.2.3.4 <i>Color</i>	8
3.2.3.5 <i>Firmeza</i>	9
3.2.3.6 <i>Sólidos solubles totales</i>	9
3.2.3.7 <i>Potencial de hidrógeno (pH) y acidez titulable</i>	9
3.2.4 COMPUESTOS BIOACTIVOS.....	9
3.2.4.1 <i>Polifenoles totales</i>	10
3.2.4.2 <i>Antocianinas</i>	10
3.2.4.3 <i>Vitamina C</i>	10
3.2.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	11
3.2.6 RESPIRACIÓN.....	11
3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	13
3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	13

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.1 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS.....	14
4.1.1.1 TAMAÑO.....	14
4.1.1.2 PÉRDIDA DE PESO.....	15
4.1.1.3 COLOR.....	16
4.1.1.4 FIRMEZA.....	17
4.1.1.5 SÓLIDOS SOLUBLES.....	19
4.1.1.6 POTENCIAL DE HIDRÓGENO (pH) Y ACIDEZ TITULABLE.....	20
4.1.2 COMPUESTOS BIOACTIVOS.....	21
4.1.2.1 POLIFENOLES TOTALES.....	21
4.1.2.2 ANTOCIANINAS.....	23
4.1.2.3 VITAMINA C.....	25
4.1.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	26
4.1.4 RESPIRACIÓN.....	27
4.2 VERIFICACIÓN DE LA HIPÓTESIS.....	28

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES.....	29
5.2 RECOMENDACIONES.....	30
BIBLIOGRAFÍA.....	31
ANEXOS.....	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de peso, diámetro y longitud determinados el día de cosecha de la mora de castilla y requisitos de calibre de la norma inen 2427:2010.	14
Tabla 2. Parámetros de color (L y °hue) analizados en las moras con y sin recubrimiento.....	16
Tabla 3. Datos de potencial de hidrógeno (ph) y acidez titulable (%) de las moras ..	21
Tabla 4. Actividad antioxidante (Eq mg de trolox/100 g MF) de las moras con y sin recubrimiento.	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Carta de color de la mora de castilla. Fuente: INEN (2010)	6
Figura 2. Cajas de tereftalato de polietileno (PET).....	7
Figura 3. Frascos de vidrio herméticos.	12
Figura 4. Pérdida de peso (%) de las moras con y sin recubrimiento de quitosano....	15
Figura 5. Firmeza (N) de las moras con y sin recubrimiento de quitosano.....	18
Figura 6. Sólidos solubles (°Brix) de las moras con y sin recubrimiento de quitosano.....	19
Figura 7. Contenido de polifenoles (Eq mg ácido gálico/g mf) en moras con y sin recubrimiento de quitosano.....	22

Figura 8. Contenido de Antocianinas (Eq mg cianidina -3-rutinosido/g MF) en moras con y sin recubrimiento de quitosano.....	23
Figura 9. Contenido de Vitamina C (Eq mg ácido ascórbico/100g MF) en moras con y sin recubrimiento de quitosano.....	25
Figura 10. Respiración (mg de CO ₂ /Kg*h) de las moras con y sin recubrimiento de quitosano.....	27
Figura 11. Mora en estado de madurez 4.....	48
Figura 12. Eliminación de fruta en mal estado y pedúnculos.....	48
Figura 13. Aplicación del recubrimiento en la fruta.....	48
Figura 14. Eliminación del exceso de recubrimiento.....	48
Figura 15. Secado del recubrimiento.....	48
Figura 16. Fruta envasada.....	48
Figura 17. Medición de longitud y ancho.....	49
Figura 18. Pesado de la mora.....	49
Figura 19. Balanza infrarrojo.....	49
Figura 20. Colorímetro.....	49
Figura 21. Texturómetro y refractómetro.....	49
Figura 22. Titulador automático.....	49
Figura 23. Muestra centrifugada.....	50
Figura 24. Agitación de muestras.....	50
Figura 25. Extractos.....	50
Figura 26. Muestras en cubetas.....	50
Figura 27. Diluciones para la curva de calibración.....	50
Figura 28. Espectrofotómetro.....	50

RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto que produce la aplicación de un recubrimiento a base de quitosano en la calidad postcosecha de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth), con el propósito de mejorar las características fisicoquímicas, mantener los compuestos bioactivos y prolongar el tiempo de vida útil de la fruta, para así brindar a los consumidores un producto de mejor calidad y reducir las pérdidas postcosecha.

Los análisis se realizaron en moras sin recubrimiento (control) y moras con recubrimiento de quitosano. Se evaluó la calidad físico-química en cuanto a pH, acidez, sólidos solubles, color (cada 2 días), porcentaje de pérdida de peso y firmeza (todos los días), contenido de compuestos bioactivos en cuanto a vitamina C, polifenoles, antocianinas y actividad antioxidante (cada 3 días). Además se midió la tasa de respiración de las moras todos los días.

Los resultados indican que el recubrimiento no afectó las características fisicoquímicas de la mora ya que al realizar el análisis estadístico no hubo diferencia significativa entre las moras sin recubrimiento (control) y las moras con recubrimiento de quitosano para la mayoría de análisis realizados, pero en respiración durante el almacenamiento la tasa de respiración fue menor en las moras con recubrimiento de quitosano y la actividad antioxidante fue mayor en los primeros días de almacenamiento.

Sin embargo la aplicación del recubrimiento le brinda una mejor apariencia visual a la fruta que podría ser atractiva para los consumidores, lo que posiblemente incrementaría las ventas y disminuiría las pérdidas postcosecha. Por el almacenamiento en refrigeración el tiempo de vida útil de las moras con y sin recubrimiento fue de 7 días.

PALABRAS CLAVES: mora de Castilla, recubrimiento de quitosano, postcosecha, almacenamiento refrigerado, compuestos bioactivos.

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the effect of the application of a chitosan coating on postharvest quality of blackberry (*Rubus glaucus* Benth). For the purpose of improving the physicochemical characteristics, maintain the bioactive compounds and prolong the Shelf life of the fruit. To provide at the consumers A better quality product and reduce postharvest losses.

The analysis were in uncoated blackberries (control) and blackberries with chitosan coating. Physicochemical parameters such as pH, acidity, soluble solids, color (every 2 days), percentage of weight loss and texture (everyday), bioactive compounds such as vitamin C, polyphenols, anthocyanins and antioxidant activity color (every 3 days). In addition, the respiration rate of blackberries was measured every day.

The results indicate that the coating did not affect the physicochemical characteristics because there was no significant difference between treatments for the majority of analyzes performed. The respiration rate was lower in the blackberries with chitosan coating and the antioxidant activity was higher in the first days of storage.

However the application of the coating gives a better visual appearance to the fruit. The coated fruit is attractive to consumers, this could increase sales and reduce post-harvest losses. The storage in refrigeration allowed that the blackberries had a shelf life of seven days.

KEYWORDS: blackberry, chitosan coating, postharvest, refrigerated storage, bioactive compounds.

INTRODUCCIÓN

Ecuador es uno de los países más ricos en flora ya que sus productos pueden ser cultivados durante todo el año, pero es importante que el manejo postcosecha sea adecuado para evitar el deterioro de los productos y pérdidas económicas a los productores. Las pérdidas postcosecha han llevado a investigar nuevos métodos de conservación que permitan mantener el valor nutricional y las características propias del producto por mayor tiempo (**Amores, 2011**).

En Ecuador las variedades de mora más conocidas son la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) y la mora Brazos (*Rubus* sp.) que se cultivan principalmente en las provincias de Tungurahua, Bolívar y Pichincha. En la provincia de Tungurahua es un producto de alto interés comercial por ser un recurso alimenticio de buena calidad, ser considerada funcional, debido a los efectos benéficos que produce en la salud, y ser una fruta que se cosecha casi todo el año (**Farinango & Rurales, 2010**). Se estima que la superficie cultivada de mora es de 5247 hectáreas siendo Tungurahua y Bolívar las provincias con mayor producción (**Brito, 2011**).

Los recubrimientos comestibles son una de las tecnologías que destacan por su capacidad de controlar la transferencia de agua y gases y la tasa de crecimiento microbiano y de mantener las características de los alimentos. Estos recubrimientos permiten además, disminuir los daños durante la manipulación y el transporte, retardar el envejecimiento, impartir brillo y conservar el color de la fruta para así, mantener la calidad postcosecha (**Velásquez-Moreira & Guerrero, 2014**).

En la actualidad existe una gran variedad de recubrimientos comestibles que, en combinación con otros componentes como agentes antioxidantes, compuestos nutricionales y antimicrobianos, pueden ser aplicados a los alimentos para mejorar su calidad, valor nutricional, inocuidad y aceptabilidad por parte de los consumidores (**Velásquez-Moreira & Guerrero, 2014**).

El quitosano es el segundo polisacárido más abundante después de la celulosa, tiene propiedades fungicidas, bactericidas, nematocidas y es de baja toxicidad, inclusive menos tóxico que la sal de mesa. Estas propiedades le hacen un ingrediente ideal para la formación de recubrimientos comestibles. Además, al degradarse no se generan productos dañinos para la salud ya que algunos estudios han demostrado que la quitina y el quitosano se biodegradan *in vivo* por su susceptibilidad a la hidrólisis enzimática (**Morey & Quinde, 2012; Valenzuela & Arias, 2012**).

El quitosano es un producto natural que ha tenido éxito en el área de la producción agraria ecológica y ha despertado gran interés en la industria agroalimentaria por lo que en la actualidad se expende en el mercado como aditivo alimentario en países como Japón, Inglaterra, Noruega, Portugal y España (**Vargas, González-Martínez, Chiralt, & Cháfer, 2010**).

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de un recubrimiento a base de quitosano sobre la calidad postcosecha y la vida útil de las moras de Castilla almacenadas en refrigeración, con la finalidad de mantener la características fisicoquímicas y los compuestos bioactivos en la mora para brindar a los consumidores un producto de calidad y además, reducir las pérdidas postcosecha.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 TEMA DE INVESTIGACIÓN

Evaluación del efecto de un recubrimiento con quitosano sobre la calidad postcosecha de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth)

1.2 JUSTIFICACIÓN

En el Ecuador la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) se cultiva casi todo el año y posee gran aceptación en el mercado nacional e internacional, resultando de interés comercial para los productores. Estas frutas tienen un alto valor nutritivo ya que poseen vitaminas A y B y una gran cantidad de minerales que pueden resultar benéficos para la salud (De Moura et al., 2011; Gobernación de Antioquia, 2014).

Por otro lado, las moras son una de las bayas más perecederas porque su piel es muy fina y frágil y presenta altas tasas de respiración y transpiración (Joo, Lewandowski, Auras, Harte, & Almenar, 2011). Además, debido a que se trata de un fruto no climatérico, no continúa con su proceso de maduración después de ser cosechado y por lo tanto la cosecha debe realizarse en un estado de madurez próximo a la madurez de consumo, con la desventaja de que en este estado las frutas son más sensibles a los daños mecánicos (Sánchez, Real, & Pérez, 2013).

Una alternativa para prolongar la vida útil de estas frutas es la aplicación de recubrimientos comestibles que permiten la formación de barreras semipermeables y una reducción del intercambio de gases, de la migración de solutos y de trastornos fisiológicos en la fruta (Hernández-Munoz, Almenar, Valle, Velez, & Gavara, 2008; Oliveira, Kwiatkowski, Rosa, & Clemente, 2014). En este sentido, el quitosano es un recubrimiento prometedor debido a sus excelentes propiedades en la formación de películas, a su actividad antimicrobiana y a su biocompatibilidad (Oliveira et al., 2014).

De ahí que este estudio se realizó con el fin de evaluar el efecto de la utilización de un recubrimiento a base de quitosano sobre el tiempo de vida útil de la mora y la calidad postcosecha de la fruta.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo General

- ♦ Evaluar el efecto de un recubrimiento de quitosano sobre la calidad postcosecha de la mora.

1.3.2 Objetivos Específicos

- ♦ Estudiar el efecto de la aplicación de un recubrimiento a base de quitosano sobre la vida útil de las moras almacenadas a (6 ± 1 °C)
- ♦ Analizar cómo influye la aplicación del recubrimiento con quitosano en la tasa respiratoria de la mora de Castilla
- ♦ Evaluar el efecto del recubrimiento sobre la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles, antocianinas y vitamina C de las moras
- ♦ Determinar cómo influye la aplicación del recubrimiento con quitosano en las propiedades fisicoquímicas (pérdida de peso, color, firmeza, sólidos solubles, pH y acidez titulable) de la fruta.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

La mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) es una fruta altamente perecible que requiere de especial cuidado durante la cosecha, almacenamiento, manipulación, transporte y comercialización para mantener sus características fisicoquímicas. Esta fruta tiene una vida útil muy corta, de 2 a 3 días en refrigeración, por lo que su expendio en el mercado es muy limitado y suelen existir valiosas pérdidas económicas, tanto para productores como para comerciantes (**Joo et al., 2011**).

La vida postcosecha de la mora está determinada también por su susceptibilidad a la pérdida de agua y a las lesiones mecánicas, pero sobre todo, a enfermedades. Los altos niveles de azúcar, nutrientes y actividad de agua en la mora permiten el crecimiento de una gran variedad de hongos sobre la fruta (**Oliveira et al., 2013**). En particular, el moho gris es una de las enfermedades más graves en las bayas ya que puede afectar antes y después de la cosecha produciendo enormes pérdidas económicas. Para mantener la calidad de estas frutas durante el almacenamiento es recomendable mantener bajas temperaturas (0 – 0,5 °C) con una humedad relativa de 90 – 95 % (**Montalvo & Brito, 2010**).

En los últimos años el consumo de frutas y hortalizas ha incrementado a nivel mundial debido a que su consumo está relacionado con posibles efectos benéficos en la salud humana. La mora es una de las frutas más apetecidas por poseer vitaminas, minerales, carotenos, azúcares, compuestos antioxidantes, etc., que permiten eliminar radicales libres y evitar desórdenes y enfermedades en el ser humano (**Sánchez et al., 2013; Vargas et al., 2010**).

Las pérdidas postcosecha de frutas y hortalizas producidas por hongos se pueden controlar de forma eficaz con la aplicación de fungicidas, pero los residuos que dejan

estos productos en las frutas resultan perjudiciales para la salud. Por esto existe una creciente necesidad de desarrollar nuevos métodos que permitan controlar estas pérdidas. En este sentido, una de las alternativas más prometedoras es la aplicación de recubrimientos comestibles (**Hernández-Munoz et al., 2008; Sánchez-Domínguez, Bautista-Baños, & Castillo, 2007**).

El quitosano es un polisacárido que se obtiene mediante desacetilación alcalina de la quitina que se encuentra en gran cantidad en el exoesqueleto de los crustáceos. Este producto presenta múltiples propiedades como biodegradabilidad, biocompatibilidad, baja toxicidad, actividad antimicrobiana de amplio espectro y capacidad de formación de películas comestibles. Estas propiedades hacen que su uso en frutas frescas y hortalizas reduzca el desarrollo de pudriciones ocasionadas por *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *Alternaria alternata* y *Penicillium expansum*, entre otras. Además, permite controlar de forma favorable los cambios fisicoquímicos que ocurren en la fruta prolongando así su vida útil (**Bautista-Baños, Hernández-Lauzardo, Velázquez, Bosquez-Molina, & Sánchez-Domínguez, 2005; Chavez, Ricón, Valbuena, & López, 2012**).

Existen numerosos estudios que muestran resultados positivos de la aplicación de quitosano para el control del deterioro postcosecha de diversas frutas y hortalizas e incluso para retrasar la maduración en frutas como plátano Cavendish, uvas y frutillas (**Valenzuela & Arias, 2012; Vargas et al., 2010; Velásquez-Moreira & Guerrero, 2014**).

2.2 HIPÓTESIS

Ho: El recubrimiento a base de quitosano aplicado en la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) no influye en las características fisicoquímicas, compuestos bioactivos, actividad antioxidante, tasa de respiración y la vida útil de la mora.

Ha: El recubrimiento a base de quitosano aplicado en la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) influye en las características fisicoquímicas, compuestos bioactivos, actividad antioxidante, tasa de respiración y la vida útil de la mora.

2.3 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LA HIPÓTESIS

2.3.1 Variable Independiente

- Recubrimiento a base de quitosano

2.3.2 Variable Dependiente

- Calidad postcosecha de la mora de Castilla

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Materia Prima

La mora de Castilla fue recolectada por la mañana en un campo de cultivo ubicado en el sector Huachi Grande, cantón Ambato, provincia de Tungurahua, Ecuador. La fruta se cosechó en el estado de madurez 4 de acuerdo a la Norma INEN 2427:2010 (INEN, 2010) (Figura 1).



Figura 1. Carta de color de la mora de Castilla. Fuente: INEN (2010)

La fruta se transportó inmediatamente a los laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato para realizar los análisis correspondientes.

Antes de empezar los análisis, la fruta fue clasificada para eliminar fruta en mal estado y el pedúnculo de las mismas.

3.1.2 Reactivos

- Hidróxido de sodio 0,1 N
- Etanol 99,5 %
- Agua destilada
- Carbonato sódico al 20 %
- Ácido gálico
- Reactivo de Folin
- Reactivo 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
- Metanol
- Trolox
- Cloruro de potasio (0,2 N)

- Acetato de sodio
- Ácido clorhídrico
- Fosfato de potasio monobásico
- Ácido ascórbico

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Recubrimiento de quitosano

3.2.1.1 Preparación

Se preparó 1 litro de solución de ácido láctico al 1 % (v/v) y en esta solución se disolvieron 10 g de quitosano. La solución se agitó en forma continua (450 rpm) a 40 °C durante 24 horas usando una placa de calentamiento (Fischer Scientific Isotherm, USA). Finalmente se agregaron 10 ml de glicerol.

3.2.1.2 Aplicación

Se colocaron 3 kilos de mora en bandejas de plástico y se les aplicó el recubrimiento. Se dejó reposar por 5 min, luego la fruta se colocó sobre mallas para eliminar el exceso de quitosano y finalmente se colocó en un secador (Gander MTN, USA) regulado a (21 ± 1) °C durante 2 horas.

3.2.2 Envasado y Almacenamiento

La fruta fue envasada en cajas de tereftalato de polietileno (PET) con perforaciones en la tapa (Figura 3). Se colocaron (200 ± 10) g por envase y se almacenaron a (6 ± 1) °C.

Los análisis se realizaron hasta que se observaron síntomas visuales de deterioro de la fruta.



Figura 2. Cajas de tereftalato de polietileno (PET)

3.2.3 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS

3.2.3.1 Tamaño

El día de cosecha se tomaron datos individuales de peso, diámetro y longitud en 30 frutas, utilizando una balanza analítica (OHAUS, Nueva Jersey) y un pie de rey, respectivamente. De acuerdo a la Norma INEN 2427:2010 (INEN, 2010) las moras se clasificaron en grandes, medianas y pequeñas.

3.2.3.2 Humedad

Se determinó el día de cosecha, en muestras de 3 g de fruta y utilizando una balanza de infrarrojo (KERN MLS50-3, Alemania).

3.2.3.3 Pérdida de peso

Se registró diariamente el peso de tres bandejas por tratamiento utilizando una balanza (TOR REY Model EQ-5TA10), hasta que se observaron síntomas visuales de deterioro en la fruta. La pérdida de peso se calculó utilizando la siguiente ecuación (Ec. 1):

$$\% \text{ pérdida de peso} = \frac{P_o - P_t}{P_o} \cdot 100 \quad \text{Ec. 1}$$

Siendo:

P_o: Peso fresco inicial (g)

P_t: Peso fresco en cada fecha de evaluación (g)

3.2.3.4 Color

Para medir el color se tomaron 10 submuestras de cada envase, totalizando 30 unidades por tratamiento y se utilizó un colorímetro (HunterLab MiniScan EZ) previamente calibrado. La medición se realizó en las dos caras opuestas y en el ápice de la mora y se tomó el promedio de las tres mediciones.

El colorímetro muestra los resultados en términos de la luminosidad (L*) y las coordenadas rectangulares a* y b*. La luminosidad indica el grado de claridad u oscuridad de un color, presenta una escala entre 0 (negro) y 100 (blanco). La coordenada rectangular a* muestra los colores que van de verde (-) a rojo (+) y la coordenada

rectangular b^* muestra los colores que van de azul (-) a amarillo (+). Estas coordenadas permitieron calcular el ángulo de tono $^{\circ}\text{Hue}$ (Ec. 2) que presenta una escala entre 0° y 360° .

$$^{\circ}\text{Hue} = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad \text{Ec. 2}$$

3.2.3.5 Firmeza

La medición de este parámetro se realizó en el centro de la fruta utilizando un texturómetro (Brookfield Engineering Labs, Inc., EE.UU.) con una sonda plana de acero inoxidable de 3 mm de diámetro en una mesa base estándar.

Se realizó un test de compresión con velocidad de 2 mm/seg y penetración de 10 mm que corresponde a la mitad del diámetro de la fruta (20 mm) y se obtuvo la dureza de la mora en Newton. Para esta medición se tomaron 10 submuestras de cada envase, totalizando 30 unidades por tratamiento.

3.2.3.6 Sólidos solubles totales

Se realizó una medición directa con muestra triturada en un refractómetro (ATAGO) previamente calibrado con agua destilada, según la norma NTE INEN-ISO 2173 (INEN, 2013).

3.2.3.7 Potencial de hidrógeno (pH) y acidez titulable

Se realizó la medición en una muestra (5 g de jugo de mora + 45 g de agua destilada) utilizando un titulador automático (METTLER TOLEDO). Los datos de pH y % de acidez se obtuvieron directamente.

Los análisis de color, sólidos solubles, pH y acidez se realizaron cada 2 días.

3.2.4 COMPUESTOS BIOACTIVOS

Los análisis se realizaron con muestras previamente liofilizadas de cada tratamiento y día de evaluación.

EXTRACTO PARA POLIFENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Se pesaron 0,5 g de muestra liofilizada y se añadieron 10 ml de etanol/agua (50:50; v:v), la mezcla se colocó en un agitador orbital (STUART-SSL1, Suiza) a 100 rpm durante 30 min. Después de ser agitada, la mezcla fue centrifugada a 5000 rpm por 15 min y el sobrenadante se colocó en un balón de aforo de 25 ml. El proceso se realizó por duplicado, se juntaron las mezclas y se aforó a un volumen de 25 ml con etanol/agua (**ANEXO A-1**).

3.2.4.1 Polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales en mora de Castilla se determinó por el método de Folin-Ciocalteu (**Goulas & Manganaris, 2011**). La absorbancia se midió a 750 nm en un espectrofotómetro HACH DR 5000 y los resultados se expresaron en equivalentes de mg de ácido gálico/100 g de mora fresca (**ANEXO A-2**). Los cálculos se realizaron en base a una curva estándar de ácido gálico (200-1000 mg/L) (**ANEXO A-3**).

3.2.4.2 Antocianinas

Se determinó por el método de pH diferencial (**Anisimoviene et al., 2013**). Se preparó previamente el extracto con etanol al 80 % y los buffers de pH 1 y pH 4,5 (**ANEXO B-1**).

Medición de muestras

En las cubetas se colocó:

- 100 µl del extracto + 2900 µl del buffer pH 1
- 100 µl del extracto + 2900 µl del buffer pH 4.5

Se dejó incubar 15 min a la luz y se realizó la medición de cada cubeta a 510 nm y 700 nm en un espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC modelo 4001/4.

3.2.4.3 Vitamina C

Se determinó por el método del 2-6 dicloroindofenol (**Goulas & Manganaris, 2011**).

Preparación del extracto

En tubos de centrífuga de 15 ml se pesaron 0,5 g de muestra liofilizada y se añadieron 5 ml de ácido ortofosfórico al 2 %. Luego se centrifugó por 5 min a 3000 rpm en una centrífuga HETTICH ROTINA 380 y el sobrenadante se pasó a un tubo Eppendorf y se centrifugó por 30 min a 13300 rpm en una centrífuga LABNET 24D y finalmente el sobrenadante se utilizó como extracto.

Medición de las muestras

En un balón de aforo de 10 ml se colocaron 100 µl del extracto y se aforó con ácido ortofosfórico al 2 %. De la solución preparada se tomó 1 ml y se aforó a 10 ml con 2-6 dicloroindofenol (ANEXO C-1). La muestra se dejó incubar 2 min y luego se realizó la medición a 520 nm utilizando un espectrofotómetro HACH DR 5000.

Para los cálculos se utilizó una curva estándar de ácido ascórbico (ANEXO C-2).

3.2.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Se realizó de acuerdo al método descrito por **Brand-Williams, Cuvelier y Berset (1995)**, mediante inhibición del radical DPPH (Radical 2,2-diphenyl-1-picrilhydrazyl). Se utilizó el extracto de mora con una dilución 1:20 (extracto:etanol/agua) y se midió la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC modelo 4001/4 (ANEXO A-4). Los resultados se expresaron como equivalentes de µmol de Trolox/100 g de mora fresca y para los cálculos se utilizó una curva de Trolox (50-500 µmol/L) (ANEXO A-5).

3.2.6 RESPIRACIÓN

En frascos de vidrio herméticos se colocaron 100 ± 10 g de fruta (Figura 4). Diariamente se cerraron los frascos por un lapso de 10 horas al cabo de las cuales se midió la concentración gaseosa (porcentaje de O₂ y CO₂) en el interior de los mismos a través de un septum de silicona.

Con los datos de O₂ y CO₂ se calculó la tasa respiratoria de la fruta en forma volumétrica (producción de CO₂ en L/kg·h) (Ec. 3):

$$\frac{l CO_2 \text{ Producidos}}{Kg * h} = \frac{\%CO_2}{100} * \frac{\text{Volumen libre (l)}}{\text{peso muestra (Kg)} * 10} \quad \text{Ec. 3}$$

Donde:

% CO₂: es la diferencia entre la concentración inicial y final de CO₂

Kg: es la masa respirante de fruta

h: es la duración del ensayo

Volumen libre: es el volumen de la cámara de respiración, menos el volumen de la fruta contenida en ella

La tasa respiratoria se expresó en mg de CO₂ para poder ser comparada con otros estudios.

(Ec. 4):

$$\frac{mg\ CO_2}{Kg*h} = \left(\frac{P.atm \frac{Lt\ CO_2}{Kg*h}}{R*T} * PM \right) * 1000 \quad \text{Ec. 4}$$

Donde:

P.atm: Presión atmosférica en Ambato a 2500 msnm (0,73 atm)

R: Constante de los gases (0,0821 atm·L·mol⁻¹·K⁻¹)

T: Temperatura de almacenamiento (K)

PM: Peso molecular de CO₂ (g/mol)



Figura 3. Cámaras de respiración herméticas

3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con dos tratamientos: un control sin recubrimiento y un recubrimiento con una película comestible a base de quitosano.

Se realizaron dos cosechas y para cada una se hicieron los análisis por triplicado, excepto en color y firmeza, que se tomaron 10 submuestras por cada réplica, totalizando 30 mediciones de cada parámetro.

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

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 Statistics 21.0.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La norma INEN 2427:2010 indica que la cosecha de la mora de Castilla puede realizarse a partir del estado de madurez 3, pero en un estudio realizado previamente se determinó que en este estado de madurez la mora no cumple con el porcentaje de acidez y se ve afectado en la calidad sensorial por lo que este estudio se realizó con mora de Castilla cosechada en estado de madurez 4.

Los datos obtenidos para los diferentes parámetros estudiados no presentaron diferencias significativas entre las cosecha 1 y 2 por lo que fueron promediados.

4.1.1 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS

4.1.1.1 Tamaño

En la tabla 1 se presentan los parámetros iniciales de tamaño (peso, diámetro y longitud) de terminados el día de la cosecha y los requisitos de calibre de la norma INEN 2427:2010.

Tabla 1. Parámetros de peso, diámetro y longitud determinados el día de cosecha de la mora de Castilla y requisitos de calibre de la norma INEN 2427:2010

Parámetros iniciales	Medición del día inicial	Norma INEN	
		Requisitos	Calibre
Peso (g)	5,95 ± 1,53		
Diámetro (mm)	19,05 ± 1,67	25 - 18	Mediano
Longitud (mm)	22,33 ± 3,46	20 - 25	Mediano

La mora de Castilla presentó un diámetro de 19,05 ± 1,67 mm y una longitud de 22,33 ± 3,46 mm que la calificaría como mora de calibre mediano de acuerdo a la norma INEN 2427:2010.

El tamaño de la fruta es un factor importante en el momento de su comercialización por lo que sería recomendable cosechar en el estado de madurez 4 porque a partir de este estado el aumento del peso y del diámetro de la mora es mínimo y los estados de madurez 5 y 6 son considerados altamente percederos y son uno de los principales factores para

las pérdidas postcosecha. Sin embargo la mayoría de los productores cosechan la mora en los estados de madurez 5 y 6 guiados por el color y la apariencia del fruto que son factores importantes que influyen en la aceptabilidad del producto en el mercado, pero sería importante que además de los criterios de color para la cosecha se tomaran en cuenta otros métodos que ayudarían a seleccionar un adecuado estado de madurez como análisis fisicoquímicos de pH, acidez, °Brix y medición de tamaño, peso y firmeza (Carvalho & Betancur, 2015; Gobernación de Antioquia, 2014; Ministerios de Agricultura Ganadería Acuacultura y Pesca, 2013).

4.1.1.2 Pérdida de peso

En la figura 4 se muestra la pérdida de peso durante el almacenamiento de las moras con y sin recubrimiento de quitosano.

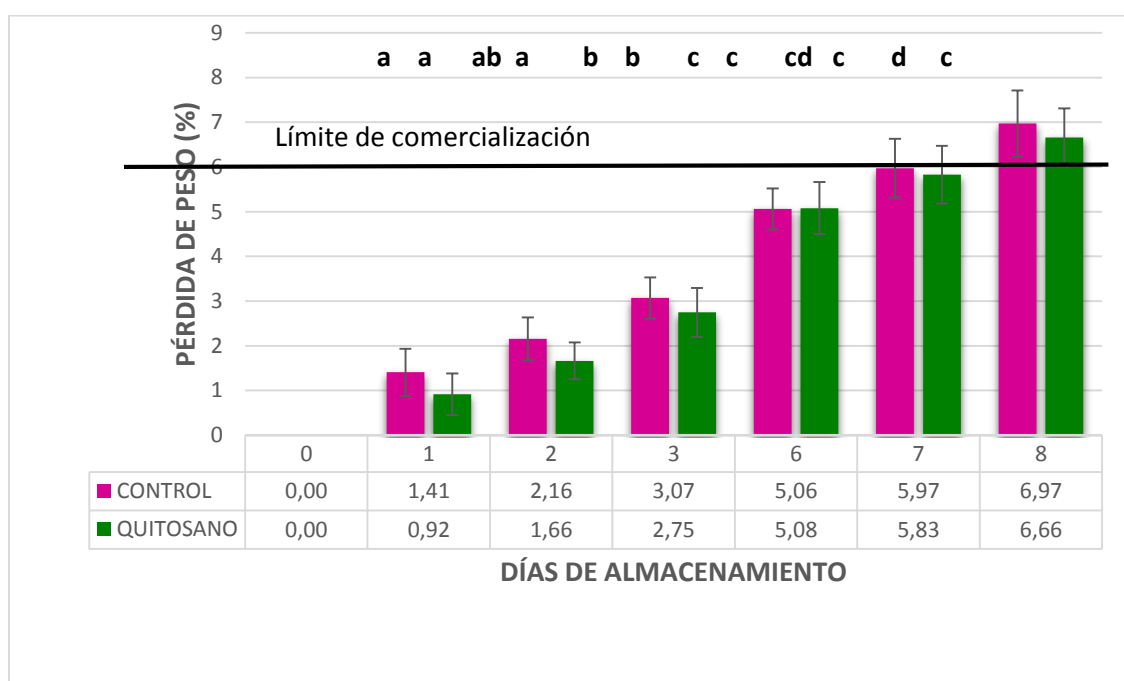


Figura 4. Pérdida de peso (%) de las moras con y sin recubrimiento de quitosano

Las barras representan el promedio de seis mediciones y las barras de error representan el intervalo de confianza del 95 % (IC95) de la media. Las letras indican para cada tratamiento diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los días de almacenamiento

En la figura 4 se observa que el porcentaje de pérdida de peso incrementó con el pasar de los días en las moras con y sin recubrimiento y esto fue debido a la pérdida de agua por los procesos naturales de transpiración y respiración de la fruta (Farinango & Rurales, 2010).

En este sentido **Guevara (2016)** y **Luna (2012)** indicaron que el quitosano presenta mayor efectividad a mayor concentración por lo que, en este estudio que se realizó un recubrimiento con quitosano al 1 %, en el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos.

La pérdida de peso máxima admisible en moras es del 6 % por lo que en el día 7 las moras control y las moras con recubrimiento de quitosano llegaron al límite permitido y después de estos días se produciría un deterioro en la apariencia física del producto que podría influir en la comercialización del mismo (**Bartz & Brecht, 2003**).

4.1.1.3 Color

Una de las características externas más importantes en la comercialización de la mora es el color, que está relacionado con su calidad por lo que resulta importante el análisis de color con la aplicación de un recubrimiento (**Duque, Giraldo, & Mejía, 2007**).

En la tabla 2 se muestran los parámetros de luminosidad y ángulo Hue para las moras con y sin recubrimiento de quitosano.

Tabla 2. Parámetros de color (L y °Hue) analizados en las moras con y sin recubrimiento

Días	L (luminosidad)				°Hue (Tono)			
	CONTROL		QUITOSANO		CONTROL		QUITOSANO	
0	18,23 ± 1,74	A ab	18,66 ± 1,70	A a	14,82 ± 4,93	A a	14,17 ± 4,26	A a
1	17,67 ± 1,58	A a	18,62 ± 1,69	B a	11,36 ± 5,02	A b	11,25 ± 5,63	A b
3	19,29 ± 1,89	A c	20,01 ± 2,04	B b	12,74 ± 3,81	A ab	10,51 ± 5,08	B b
6	18,99 ± 2,48	A bc	19,29 ± 1,98	A ab	10,81 ± 5,59	A b	9,24 ± 4,83	A b
8	19,66 ± 2,46	A c	19,88 ± 2,18	A b	12,96 ± 3,77	A ab	10,52 ± 4,05	B b

Los valores son la media de 60 mediciones ± la desviación estándar

Las letras mayúsculas indican para cada día diferencias significativas entre tratamientos

Las letras minúsculas indican para cada tratamiento diferencias significativas entre días de almacenamiento

En la tabla 2 se observa que la luminosidad se incrementó al comparar el día inicial con el final tanto en las moras control como en las moras con recubrimiento de quitosano.

Esto indica que las moras van adquiriendo una tonalidad brillante conforme pasan los días de almacenamiento. En los días 1 y 3 se muestran diferencias significativas entre tratamientos. La luminosidad de la mora recubierta fue mayor, posiblemente porque el recubrimiento con quitosano a las 24 horas está completamente seco y le brinda a la fruta una mejor apariencia en cuanto a color y brillo.

Sin embargo en la mayoría de días tanto en la luminosidad como en el °Hue no hubo diferencias significativas entre tratamientos esto indica que el recubrimiento no afectó de manera negativa los parámetros de color estudiados (**Cadena & Orellana, 1985**).

En la tabla 2 se observa que el tono de color en las moras con recubrimiento mostró diferencias significativas respecto a los días de almacenamiento a partir de las 24 horas y de ahí se mantuvo constante durante el resto de días de almacenamiento, lo que indica que el recubrimiento ayuda a mantener la tonalidad de las moras. Esto es importante ya que el color es uno de los principales factores para la comercialización del producto.

Las moras conforme van madurando van adquiriendo un color morado negrozco debido a la pérdida de clorofila y al incremento de antocianinas. Esta fruta contiene abundantes antocianinas que le brindan el color rojo por lo que pueden ser consideradas como materia prima para la elaboración de colorantes naturales alimentarios (**Farinango & Rurales, 2010**).

4.1.1.4 Firmeza

La firmeza en las frutas es un atributo de calidad apreciado por los consumidores, que puede ser medido por el sentido del tacto, la mano o la boca como instrumentos primarios, pero también con instrumentos especializados como un texturómetro (**Sousa, Canet, Alvarez, & Fernández, 2007**).

En la figura 5 se indican los valores de firmeza en (N) medidos en las moras control y las moras con recubrimiento cada día de almacenamiento.

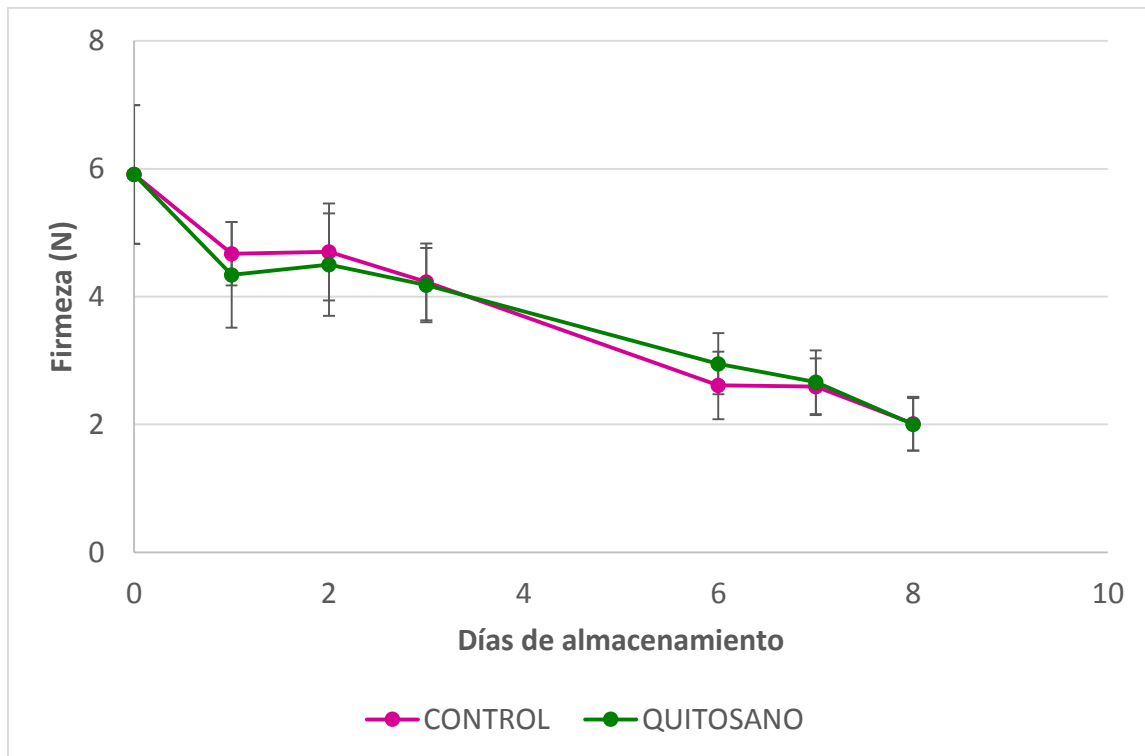


Figura 5. Firmeza (N) de las moras con y sin recubrimiento de quitosano

Los valores representan el promedio de 60 mediciones \pm el intervalo de confianza del 95 % (IC95) de la media

En la figura 5 se observa que la firmeza disminuyó significativamente en los dos tratamientos con el transcurso de los días. Esto puede deberse a la modificación que ocurre en la estructura de la fruta por la maduración. Se produce ablandamiento en la fruta debido a la disminución de la pectina que es la que ayuda a atrapar el agua y formar una malla que le da la firmeza característica de las frutas no maduras (**Luna, 2012**).

En el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos y esto podría deberse a la concentración de quitosano y ácido láctico utilizado en la elaboración del recubrimiento.

Por el contrario, en estudios realizados por **Luna (2012)** se indicó que el quitosano aplicado al 1,5 % presentó efectos benéficos en las características fisicoquímicas manteniendo la firmeza, color, aroma y sabor y logrando un tiempo de vida útil de 9 días. En el estudio realizado por **Guevara (2016)** también se encontraron efectos benéficos en las características fisicoquímicas y sensoriales logrando un tiempo de vida útil de 14 días al aplicar un recubrimiento de quitosano al 2 % y mantener en refrigeración a 4 °C y 90 % de HR.

4.1.1.5 Sólidos solubles

En la figura 6 se presentan los datos de sólidos solubles de las moras sin recubrimiento (control) y las moras con recubrimiento de quitosano, almacenadas durante 8 días en refrigeración a 6 ± 1 °C.

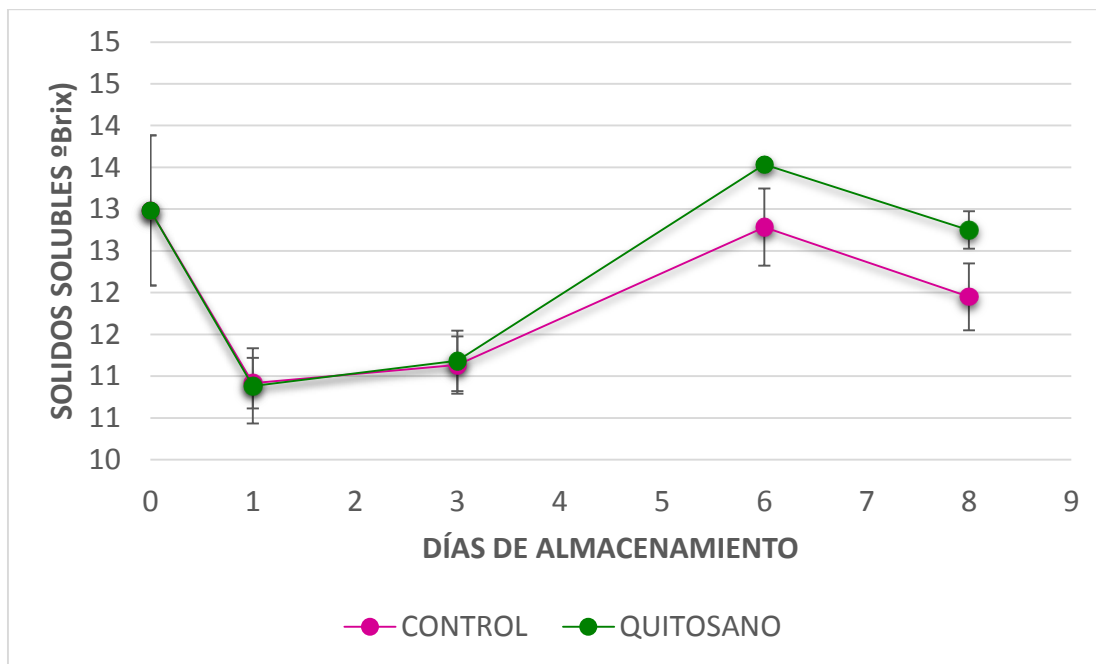


Figura 6. Sólidos solubles (°Brix) de las moras con y sin recubrimiento de quitosano

Los valores representan el promedio de 6 mediciones \pm el intervalo de confianza del 95 % (IC95) de la media

El contenido de sólidos solubles indica la cantidad de azúcares como la fructosa, glucosa y sacarosa presentes en las frutas. Este parámetro se mide en °Brix e incrementa con los días de almacenamiento debido a la transformación de ácidos orgánicos en azúcares que le da el dulzor típico de las frutas maduras (Guevara, 2016; Luna, 2012).

En la figura 6 se observa que hay una variación de los sólidos solubles durante el periodo de almacenamiento tanto para las muestras control como para las muestras con recubrimiento de quitosano. Hubo una disminución en los días 1 y 3 y luego un incremento en el día 6 con un ligero decaimiento hasta el día 8. La disminución de los sólidos solubles puede deberse al consumo de azúcares durante el desarrollo de procesos biológicos como la respiración, mientras que el incremento posiblemente pueda deberse a la conversión de ácidos orgánicos en azúcares durante el proceso de maduración y

senescencia de la fruta (Ayala, Valenzuela, & Bohorquez, 2012; Chitarra & Chitarra, 2005).

De acuerdo a la norma **INEN 2427:2010** el contenido de sólidos solubles totales en la mora de Castilla debe ser como mínimo 9 °Brix por tanto los datos obtenidos cumplirían con lo establecido por esta norma (**INEN, 2010**).

El contenido de sólidos solubles fue superior en nuestro estudio en comparación al presentado por **Villegas & Albarracín (2016)** donde se observó que el contenido de sólidos solubles para la muestra testigo fue de 7 °Brix en el día inicial y se incrementó hasta los 9,43 °Brix a los 15 días de almacenamiento.

Por otro lado la tendencia de disminución e incremento coincide con los estudios realizados por **Guevara (2016)** en moras recubiertas con quitosano al 0,5 % y 1 % y almacenadas en refrigeración a 4 °C.

4.1.1.6 Potencial de hidrógeno (pH) y acidez titulable

En la tabla 3 se indica el pH y el porcentaje de acidez obtenidos durante los 8 días de almacenamiento en las moras sin recubrimiento (control) y las moras con recubrimiento de quitosano.

En la mora de Castilla el ácido predominante es el ácido cítrico y la acidez se determina en base a éste.

Tabla 3. Potencial de hidrógeno (pH) y acidez titulable (%) de las moras con y sin recubrimiento

Días	pH						Acidez titulable					
	CONTROL			QUITOSANO			CONTROL			QUITOSANO		
0	3,31 ± 0,03	A	a	3,31 ± 0,03	A	a	2,45 ± 0,16	A	a	2,45 ± 0,16	A	a
1	3,16 ± 0,03	A	c	3,24 ± 0,07	B	ab	3,14 ± 0,40	A	b	2,90 ± 0,67	A	a
3	3,16 ± 0,02	A	c	3,22 ± 0,03	B	b	3,14 ± 0,25	A	b	2,94 ± 0,25	A	a
6	3,24 ± 0,02	A	b	3,25 ± 0,02	A	ab	2,88 ± 0,31	A	ab	2,89 ± 0,32	A	a
8	3,29 ± 0,05	A	ab	3,28 ± 0,03	A	ab	2,71 ± 0,26	A	ab	2,65 ± 0,25	A	a

Los valores son la media de 6 mediciones ± la desviación estándar

Las letras mayúsculas indican para cada día diferencias significativas entre tratamientos

Las letras minúsculas indican para cada tratamiento diferencias significativas entre días de almacenamiento

En la tabla 3 se observa disminución del pH e incremento del porcentaje de acidez en los días 1 y 3 presentando diferencias significativas entre estos días para los dos tratamientos. En la mora con recubrimiento de quitosano el aumento de acidez se debe probablemente a una reacción del tejido vegetal para contrarrestar el efecto acidificante de ácido láctico aplicado en el recubrimiento de quitosano (**Dayron, Fischer, & Flórez, 2006**).

En los 8 días de almacenamiento las moras sin recubrimiento (control) y las moras con recubrimiento de quitosano no presentaron diferencias significativas entre el día inicial y el final en cuanto a sólidos solubles, acidez y pH, esto indica que la actividad enzimática en la mora durante el período de almacenamiento fue mínima (**Guevara, 2016**).

Los resultados obtenidos de pH y acidez son parecidos a los reportados por **Ayala et al. (2012)**.

4.1.2 COMPUESTOS BIOACTIVOS

4.1.2.1 Polifenoles totales

En la figura 7 se muestra la concentración de polifenoles en Eq mg ácido gálico/g materia fresca de las moras sin recubrimiento y las moras con recubrimiento de quitosano durante el periodo de almacenamiento.

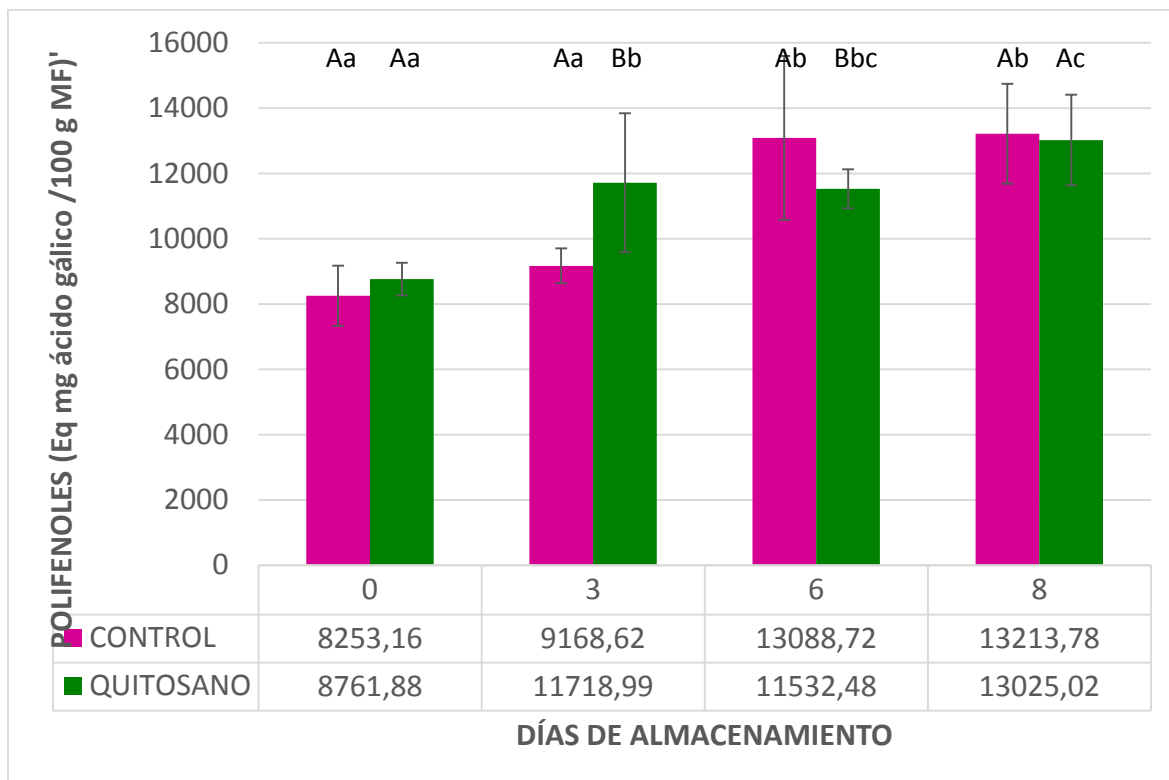


Figura 7. Contenido de polifenoles (Eq mg ácido gálico /100 g MF) en moras con y sin recubrimiento de quitosano

Los valores representan el promedio de 6 mediciones \pm el intervalo de confianza del 95 % (IC95) de la media

Los polifenoles son compuestos bioactivos que se encuentran como metabolitos secundarios en las frutas y actúan como antioxidantes. La ingesta de frutas ricas en polifenoles como la mora ayudan a prevenir enfermedades vasculares y la osteoporosis (Martinez, 2015).

En la figura 7 se observa que el contenido de polifenoles se incrementó en los dos tratamientos mostrando diferencias significativas entre tratamientos en los días 3 y 6 y este incremento podría estar relacionado con el incremento de antocianinas.

Esta tendencia de incremento concuerda con los datos obtenidos por Chanaguano (2016).

4.1.2.2 Antocianinas

En la figura 8 se indica el contenido de antocianinas en Eq mg cianidina -3-rutinosido/100g de materia fresca de las moras sin recubrimiento (control) y las moras con recubrimiento de quitosano.

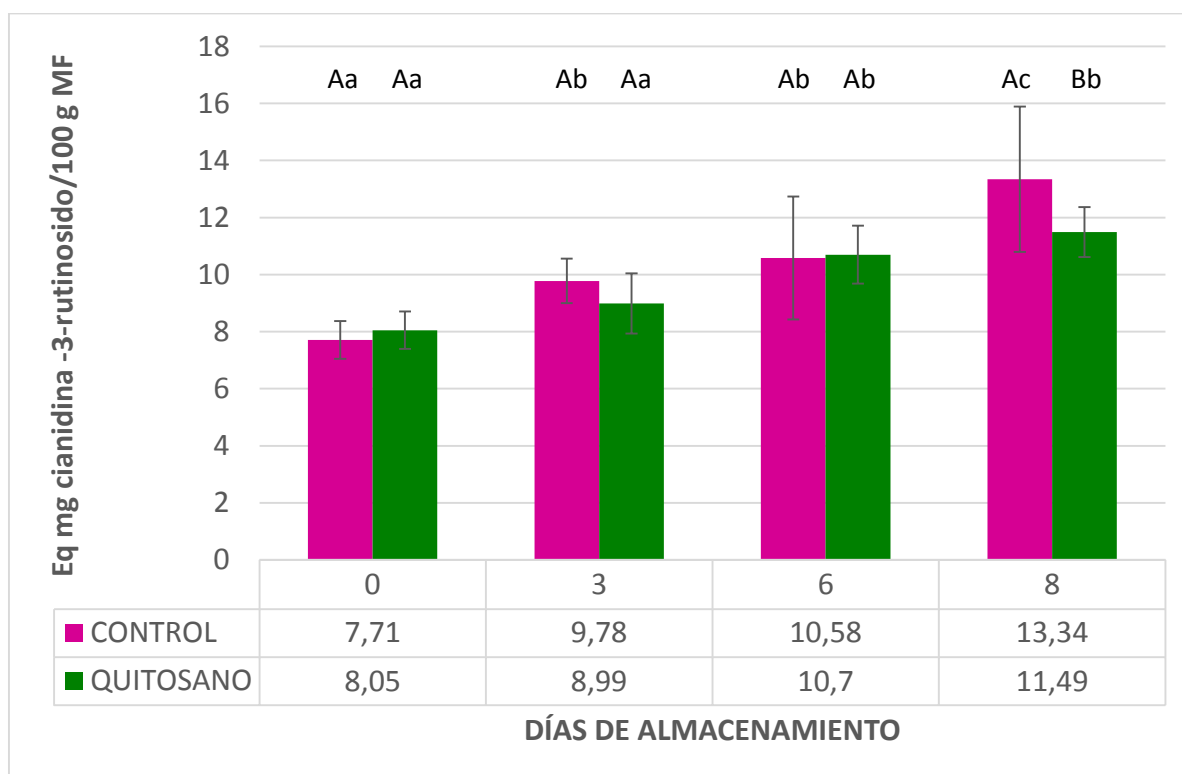


Figura 8. Contenido de antocianinas (Eq mg cianidina -3-rutinosido/100 g MF) en moras con y sin recubrimiento de quitosano.

Los valores representan el promedio de 6 mediciones \pm el intervalo de confianza del 95 % (IC95) de la media. Las letras mayúsculas indican para cada día diferencias significativas entre tratamientos. Las letras minúsculas indican para cada tratamiento diferencias significativas entre días de almacenamiento.

Las antocianinas son pigmentos naturales que le dan la coloración a las flores y frutos, existiendo una amplia gama que va desde el color rojo hasta el azul. Frutos con colores fuertes como las uvas moradas, las cerezas y las moras contienen gran cantidad de antocianinas que representan un factor importante en la industria alimentaria por las restricciones que existen hacia los colorantes sintéticos (López Ramírez, Quiñonez, & Echeverri, 2007).

En la figura 8 se observa que el contenido de antocianinas incrementó en los dos tratamientos sin mostrar diferencias significativas entre ellos excepto en el último día. Este incremento de antocianinas concuerda con la variación de color que mostró la mora de Castilla durante el almacenamiento. El contenido de antocianinas incrementó conforme va madurando la fruta hasta tomar un color rojo negruzco. Este incremento se le puede atribuir a la pérdida de agua y además está correlacionado con el contenido de polifenoles y actividad antioxidante (**Ayala et al., 2012; Farinango & Rurales, 2010**).

En el último día se observa que hubo diferencias significativas entre tratamientos y que el contenido de antocianinas fue menor en la muestra con recubrimiento de quitosano. Esto debido a que las antocianinas pudieron ser afectadas por el pH del recubrimiento aplicado, ya que las antocianinas son sensibles a la luz, el pH, los cambios de temperatura y la oxidación (**Taiz & Zeiger, 2006**).

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con la tendencia de incremento y los datos son similares a los reportados por **Ayala et al (2012)**.

Por el contrario en estudios realizados por **Farinango & Rurales (2010); Leyva (2009); Ramírez, Rojas-Aguilar, & Correa-Higuera (2006)** el contenido de antocianinas fue menor posiblemente por el estado de madurez, las condiciones de cosecha y las condiciones de almacenamiento previo a los análisis.

El estudio de antocianinas recientemente ha tomado importancia por su relación con la actividad antioxidante y por sus posibles efectos benéficos en la salud ya que su consumo está relacionado con la reducción de la incidencia de enfermedades como el cáncer y enfermedades cardiovasculares, entre otras. Pero, a pesar de los beneficios que muestran, un tema controversial es la biodisponibilidad en el ser humano ya que metabólicamente la excreción de antocianinas en la orina es mucho mayor a la cantidad consumida (**Santacruz, 2011**).

4.1.2.3 Vitamina C

En frutas del género *Rubus* los principales componentes son las vitaminas. Las moras son frutas ricas en vitamina C y además aportan fibra, hierro, potasio y calcio. La vitamina C o ácido ascórbico es un ácido orgánico soluble en agua y muy sensible a la oxidación (Emerald, 2015; Márquez, Ciro, & Rojano, 2003). Esta vitamina es un potente antioxidante que actúa como agente donador de electrones para 8 diferentes enzimas (Amores, 2011).

En la figura 9 se observa el contenido de Vitamina C expresado en Eq mg ácido ascórbico/100 g materia fresca en las moras sin recubrimiento y las moras con recubrimiento de quitosano durante los 8 días de análisis.

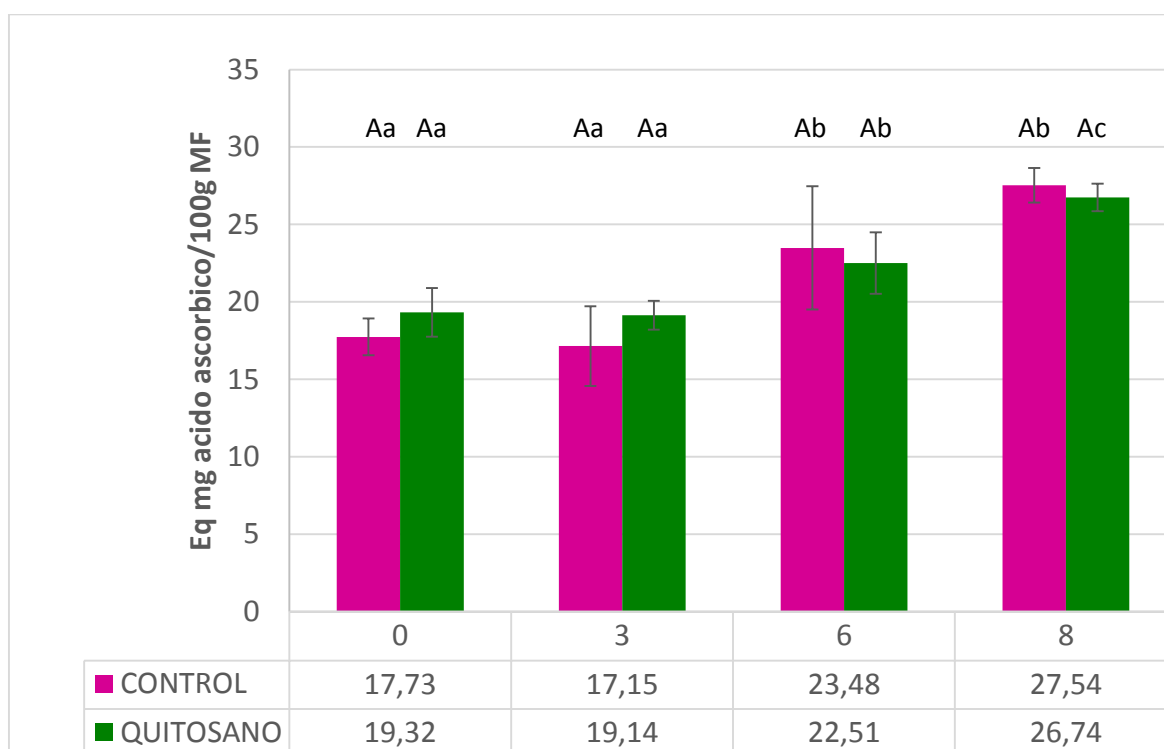


Figura 9. Contenido de Vitamina C (Eq mg ácido ascórbico/100 g MF) en moras con y sin recubrimiento de quitosano

Los valores representan el promedio de 6 mediciones \pm el intervalo de confianza del 95 % (IC95) de la media. Las letras mayúsculas indican para cada día diferencias significativas entre tratamientos. Las letras minúsculas indican para cada tratamiento diferencias significativas entre días de almacenamiento.

En la figura 9 se puede observar que el contenido de vitamina C es variable en los dos tratamientos y al comparar el día inicial con el final se observa que el contenido de ácido ascórbico incrementó presentando diferencias significativas entre días. Esta variabilidad

posiblemente se deba a que es una sustancia que se puede destruir fácilmente por oxidación. También se puede ver afectada por su pH, presencia de oxígeno y temperatura (Márquez et al., 2003).

El aumento del contenido de ácido ascórbico en este estudio puede deberse a la pérdida de agua y aumento en la concentración del contenido de sólidos en la fruta. Durante el estudio la mora se mantuvo en refrigeración y los envases debidamente cerrados para evitar en lo posible el contacto con el oxígeno lo que pudo evitar su degradación.

En este estudio se obtuvieron valores del contenido de vitamina c superiores a los reportados por Freire (2012) que obtuvo en las muestras control 15 mg ácido ascórbico/100 g MF.

4.1.3 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante es la capacidad de eliminar los radicales libres y evitar la oxidación de otras moléculas de la fruta. Esta actividad antioxidante ha sido relacionada con el contenido de polifenoles y antocianinas (Leyva, 2009).

Tabla 4. Actividad antioxidante (Eq mg de Trolox /100 g MF) de las moras con y sin recubrimiento

DÍAS	CONTROL		QUITOSANO	
0	147,69 ± 15,58	A a	179,80 ± 18,30	B a
3	165,23 ± 10,19	A b	189,59 ± 19,80	B a
6	170,02 ± 22,21	A bc	177,23 ± 25,03	A a
8	181,18 ± 21,48	A c	188,11 ± 24,66	A a

Los valores representan el promedio de 18 mediciones ± la desviación estándar. Las letras mayúsculas indican para cada día diferencias significativas entre tratamientos. Las letras minúsculas indican para cada tratamiento diferencias significativas entre días de almacenamiento.

En la tabla 4 se observa que la actividad antioxidante incrementó con el paso de los días en las moras sin recubrimiento de quitosano y esto probablemente está correlacionado con el incremento de polifenoles y de antocianinas. Este incremento también puede estar relacionado con la posición y el número de grupos hidroxilo, el contenido de azúcares y el grado de polimerización de los compuestos fenólicos (Leyva, 2009). Además hay que

tener en cuenta que con la pérdida de agua el contenido de compuestos sólidos en la fruta es mayor.

Por el contrario, en las moras con recubrimiento de quitosano la actividad antioxidante se mantuvo durante los 8 días de análisis. Esto se puede atribuir al pH del recubrimiento que pudo influir en el contenido de antocianinas y por esto la actividad antioxidante no mostró diferencias significativas entre los días de análisis.

La actividad antioxidante obtenida en este estudio fue inferior a la reportada por **Leyva (2009)** y fue superior a la reportada por **Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini-Filho & Feti (2005)**. Esto puede variar por el genotipo, estado de madurez, tipo de cosecha y condiciones de almacenamiento.

4.1.4 Respiración

En la figura 10 se muestran los mg de CO₂/kg·h producidos cada día por las moras sin recubrimiento (control) y las moras con recubrimiento de quitosano.

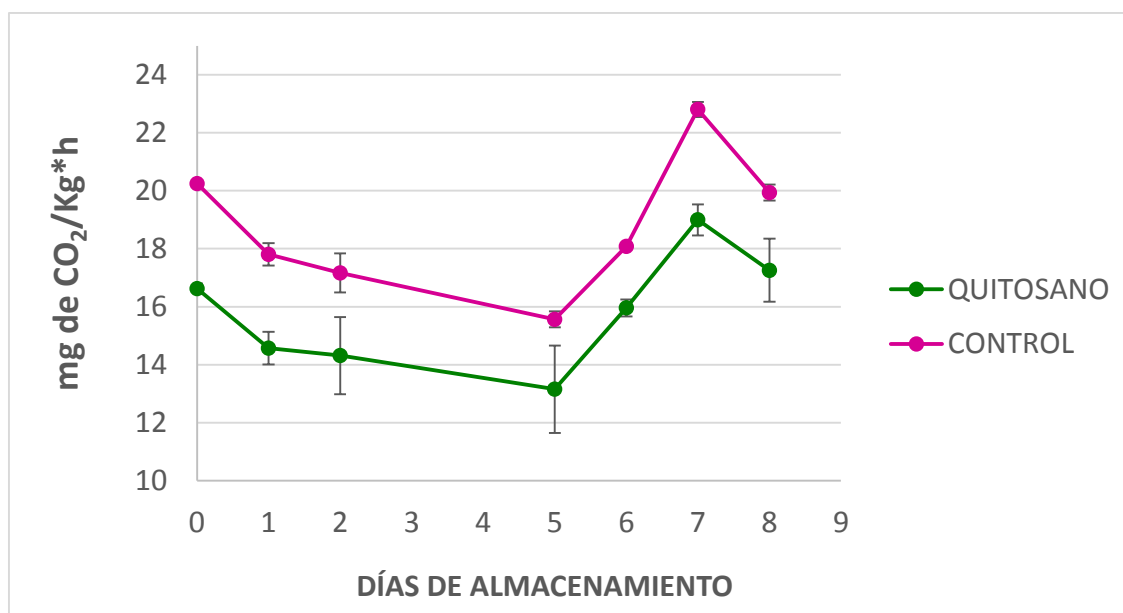
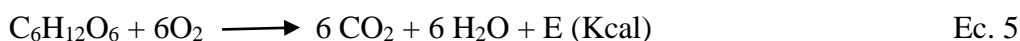


Figura 10. Respiración (mg de CO₂/kg·h) de las moras con y sin recubrimiento de quitosano.

Los valores representan el promedio de 6 mediciones ± el intervalo de confianza del 95 % (IC95) de la media

Después de la cosecha las células de las frutas requieren de energía para seguir viviendo. Esta energía la obtienen mediante la respiración que consiste en la oxidación de nutrientes ricos en energía como los carbohidratos, para lo cual requieren de oxígeno de la atmósfera y liberan dióxido de carbono (Ec. 5) (**González & López, 2010**).



De acuerdo al análisis estadístico si hubo diferencias significativas entre tratamientos y también hubo diferencias significativas entre días de almacenamiento.

En la figura 10 se puede observar que en los dos tratamientos la concentración de dióxido de carbono disminuyó hasta el día 5 y a partir de este día incrementó hasta el día 7 y disminuyó de nuevo en el día 8. La disminución de la concentración de dióxido de carbono en los primeros días posiblemente se debe a dos causas: la mora es una fruta no climatérica y su tasa de respiración va disminuyendo luego de ser cosechada y al almacenamiento en refrigeración ya que las bajas temperaturas reducen la tasa de respiración (**González & López, 2010**).

En el proceso de respiración se genera dióxido de carbono, agua y energía, el agua se queda en la superficie de la fruta y ayuda a la acción de los microorganismos. Por lo que el incremento de la respiración a partir del día 5 pudo deberse al incremento de la carga microbiana. En el caso de mohos y levaduras producen fermentación en la fruta con la obtención de alcohol y dióxido de carbono.

4.2 VERIFICACIÓN DE LA HIPÓTESIS

En base al análisis estadístico de los resultados obtenidos en el estudio se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa la cual indica que el recubrimiento a base de quitosano aplicado en la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth), sí influye en las características fisicoquímicas, compuestos bioactivos, tasa de respiración y la vida útil de la mora.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- ✓ No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en la mayoría de parámetros analizados. Esto indica que el recubrimiento de quitosano aplicado al 1 % no afecta de manera negativa las características fisicoquímicas.

- ✓ Las moras con recubrimiento de quitosano tuvieron menor tasa de respiración en comparación a las moras sin recubrimiento esto influye de manera positiva en la apariencia de las frutas, que puede contribuir a la disminución en pérdidas postcosecha.

- ✓ El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre tratamientos respecto al contenido de polifenoles, antocianinas y vitamina C ya que los procesos fisiológicos y de senescencia continúan a pesar del recubrimiento.

- ✓ La aplicación del recubrimiento permite mantener la tonalidad de las moras durante los días de almacenamiento que podría resultar benéfico en el momento de su comercialización.

5.2 RECOMENDACIONES

- ✓ El estudio se realizó con un recubrimiento de quitosano al 1 % y en la mayoría de los análisis fisicoquímicos no presento diferencias significativas entre tratamientos por lo que sería recomendable realizar estudios con concentraciones más elevadas de quitosano.
- ✓ Durante el análisis de antocianinas se recomienda tener especial cuidado con factores que podrían afectar su estabilidad como la luz, pH y temperatura.
- ✓ Las muestras de moras liofilizadas se deben guardar en frascos bien cerrados para evitar que gane humedad y en oscuridad para evitar la degradación de compuestos bioactivos.
- ✓ Una vez aplicado el recubrimiento en las moras es importante dejar el tiempo necesario en el secador para que el recubrimiento esté bien seco, porque las moras se pueden adherir entre sí durante el almacenamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Amores, D.** (2011). Evaluación nutritiva y nutraceútica de la mora de Castilla (*Rubus glaucus*) deshidratada por el método de liofilización y comparación con la obtenida por deshidratación en microondas y secador en bandejas., *Tesis Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*, Riobamba - Ecuador.
- Anisimoviene, N., Jankauskiene, J., Jodinskiene, M., Bendokas, V., Stanys, V., & Siksniunas, T.** (2013). Phenolics, antioxidative activity and characterization of anthocyanins in berries of blackcurrant interspecific hybrids. *Acta Biochémica Polonica*, 60(4), 767-772.
- Ayala, S., Valenzuela, R., & Bohorquez, P.** (2012). Efecto de un recubrimiento comestible a base de alginato de sodio y iones de calcio sobre la calidad de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth). *Vitae*, 19(1), 128-131.
- Bartz, J., & Brecht, J.** (2003). Postharvest physiology and pathology of vegetables. Capítulo I (Second Edition ed. Vol. 1). New York: Marcel Dekker Inc.
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A., Velázquez, M., Bosquez-Molina, E., & Sánchez-Domínguez, D.** (2005). Quitosano: Una alternativa natural para reducir microorganismos post-cosecha y mantener la vida de anaquel de productos hortofrutícolas. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 7(1), 1-7.
- Brito, B.** (2011). Ecuador: Nueva Tecnología para el cultivo de mora se dio a conocer en Tungurahua. *El productor-INIAP*.
- Cadena, J., & Orellana, A.** (1985). El cultivo de mora. Manual del capacitador. *Unidad de Capacitación Fruticultura*, 1, 1-110.
- Carvalho, C., & Betancur, J.** (2015). Caracterización de la calidad del fruto de mora de 'Castilla' (*Rubus glaucus* Benth.) en diferentes estados de madurez en Antioquia, Colombia. *Agronomía Colombiana*, 33(1), 74-83.

- 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 Universidad Tecnica de Ambato*, Ambato- Ecuador.
- Chavez, A.,** Ricón, M., Valbuena, A., & López, A. (2012). Obtención y caracterización de películas de quitosano elaborado a partir de los desechos de la industria cangrejera. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 13(3), 77-88.
- Chitarra, M., & Chitarra, A.** (2005). *Pós-colheita de frutas e hortaliças : fisiologia e manuseio*. Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR., São Carlos, SP.
- Dayron, Á.,** Fischer, G., & Flórez, R. (2006). Almacenamiento refrigerado de frutos de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) en empaques con atmósfera modificada. *Agronomía Colombiana*, 24(2), 306 - 316.
- De Moura, S. C. S. R.,** da Rocha Tavares, P. E., Germer, S. P. M., Nisida, A. L. A. C., Alves, A. B., & Kanaan, A. S. (2011). Degradation Kinetics of Anthocyanin of Traditional and Low-Sugar Blackberry Jam. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2488-2496.
- Duque, A.,** Giraldo, G., & Mejía, C. (2007). Variación del color en Mango, Mora y Uchuva en diferentes tratamientos de deshidratación osmótica. *Revista de Investigaciones. Universidad del Quindío*, 10(17), 19-26.
- Emerald.** (2015). A review of the nutrient composition of selected *Rubus* berries. *Nutrition & Food Science*, 45(2), 242-254. doi: 10.1108/NFS-07-2014-0063
- Farinango, M., & Rurales, J.** (2010). Estudio de la fisiología post-cosecha de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) y de la mora variedad Brazos (*Rubus* sp.). *Tesis Escuela Politecnica Nacional*, 1-116.

- Freire, V.** (2012). Alternativas de mejora en el manejo postcosecha y comercialización de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) proveniente de la provincia de Tungurahua., *Tesis Escuela Politécnica Nacional*, Tungurahua - Ecuador.
- Gobernación de Antioquia, C.** (2014). Manual técnico de cultivo de mora bajo buenas prácticas agrícolas. 7-85.
- González, M., & López, A.** (2010). Frutas conservadas por métodos combinados. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 4(2), 58 - 67.
- Goulas, V., & Manganaris, G.** (2011). The effect of postharvest ripening on strawberry bioactive composition and antioxidant potential. *J. Sci Food and Agric*, 91(1907-1914).
- Guevara, J.** (2016). Evaluación del efecto antifúngico de quitosano para el control de podredumbres en mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) durante el período de cosecha. *Tesis de grado Escuela Politécnica Nacional*.
- Hernández-Munoz, P., Almenar, E., Valle, V. D., Velez, D., & Gavara, R.** (2008). Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chem*, 110(2), 428-435. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.02.020.
- INEN, N.** (2010). Frutas Frescas. Mora. Requisitos, 1-8.
- INEN, N.** (2013). Productos vegetales y de frutas. Determinación de sólidos solubles. Método refractométrico, 2, 1-3.
- Joo, M., Lewandowski, N., Auras, R., Harte, J., & Almenar, E.** (2011). Comparative shelf life study of blackberry fruit in bio-based and petroleum-based containers under retail storage conditions. *Food Chem*, 126, 1734-1740. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.12.071.

- Kuskoski, M., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini-Filho, & Feti, R.** (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia, Tecnología y Alimentos*, 25(4), 726-732.
- Leyva, D.** (2009). *Determinación de antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en licores y fruto de mora.*, Universidad Tecnológica de la Mixteca, Oaxaca-México.
- López Ramírez, R., Quiñonez, W., & Echeverri, F.** (2007). Perfil cromatográfico de las antocianinas presentes en algunos frutos colombianos. *Scientia Et Technica*, XIII(33), 275-276.
- Luna, Y.** (2012). Obtención de quitosano a partir de quitina para su empleo en conservación de frutillas y moras. *Tesis de grado Universidad Central del Ecuador*.
- Márquez, C., Ciro, H., & Rojano, B.** (2003). Efecto de un proceso de deshidratación con aire forzado en la composición química y nutricional de la mora de Castilla (*Rubus glaucus*) *Revista Facultad Nacional Agropecuaria Medellín*, 56(1), 1865 - 1876.
- Martínez, V.** (2015). Efecto del pelado sobre la capacidad antioxidante y contenido de polifenoles del tomate de árbol amarillo y morado. *Tesis de grado Universidad Tecnológica Equinoccial*.
- Ministerios de Agricultura Ganadería Acuicultura y Pesca, M.** (2013). La mora de Castilla. Quito - Ecuador. 1-20.
- Montalvo, D., & Brito, B.** (2010). Evaluación de la calidad post-cosecha de las accesiones seleccionadas de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) provenientes de las provincias de Tungurahua y Bolívar. *Tesis. Escuela Politecnica Nacional*, 1-168.

- Morey, A., & Quinde, A.** (2012). Obtención de quitosano y su aplicación en recubrimientos comestibles en mezcla con almidón. *Tesis Universidad de Guayaquil*, 1-124.
- Oliveira, Kwiatkowski, A., Rosa, C. I., & Clemente, E.** (2014). Refrigeration and edible coatings in blackberry (*Rubus spp.*) conservation. *J Food Sci Technol*, *51*(9), 2120-2126. doi: 10.1007/s13197-012-0702-3.
- Oliveira, Pereira, J., Cabo Verde, S., Lima, M., Pinto, P., Oliveira, P. B., . . . Botelho, M.** (2013). Evaluation of potential of gamma radiation as a conservation treatment for blackberry fruits. *Journal of Berry Research*, *3*, 93-101. doi: 10.3233/jbr-130050.
- Ramírez, M., Rojas-Aguilar, N., & Correa-Higuera, L.** (2006). Obtención de un colorante natural alimentario de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) *Ciencia en Desarrollo*, *2*(2), 115-130.
- Sánchez-Domínguez, D., Bautista-Baños, S., & Castillo, P.** (2007). Efecto del quitosano en el desarrollo y morfología de *Alternaria Alternata* (Fr.) Keissi. *Anales de Biología*, 23-32.
- Sánchez, A., Real, V., & Pérez, B.** (2013). Variables determinantes de la madurez comercial en la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth). *Scientia Agroalimentaria*, *1*, 39-44.
- Santacruz, L.** (2011). Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres Colombianos. *Tesis de grado Universidad Nacional de Colombia*, Bogotá.
- Sousa, M. B., Canet, W., Alvarez, M. D., & Fernández, C.** (2007). Effect of processing on the texture and sensory attributes of raspberry (cv. Heritage) and blackberry (cv. Thornfree). *Journal of Food Engineering*, *78*(1), 9-21. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.08.047
- Taiz, L., & Zeiger, E.** (2006). Fisiología Vegetal. *Biblioteca de la universitat Jaume I*, *1*, 551.

- Valenzuela, C., & Arias, J. (2012).** Potenciales aplicaciones de películas de quitosano en alimentos de origen animal: una revisión. *Avances en ciencias veterinarias*, 27(1), 33-47.
- Vargas, M., Gonzáles-Martínez, C., Chiralt, A., & Cháfer, M. (2010).** Quitosano: Una alternativa natural y sostenible para la conservación de frutas y hortalizas. *Agroecología*, 1-10.
- Velásquez-Moreira, A., & Guerrero, A. (2014).** Algunas investigaciones recientes en recubrimientos comestibles aplicados en alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8(2), 5-12.
- Villegas, C., & Albarracín, W. (2016).** Aplicación y efecto de un recubrimiento comestible sobre la vida útil de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth). *Vitae*, 23(3), 202-209. doi: 10.17533/udea.vitae.v23n3a06

ANEXOS

ANEXO A

MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

ANEXO A-1

Para la determinación de compuestos bioactivos la mora fue liofilizada.

Liofilización – procedimiento

- Se trituraron 100 ± 10 g de mora utilizando una licuadora manual (Kitchen Aid), se coló y se colocó en frascos de plástico.
- Estos frascos con la muestra se dejaron en el ultra congelador a -85 °C por una semana.
- La muestra congelada fue liofilizada usando un liofilizador (LABCONCO).
- Finalmente, la muestra liofilizada fue triturada y almacenada en la oscuridad.

ANEXO A-2

DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

1. Se preparó carbonato sódico al 20 % (p/v) disolviendo 20 g en 100 ml de agua destilada, se deja enfriar antes de enrasar por la reacción exotérmica que se produce.
2. En un balón de aforo de 10 ml se colocó:
 - 5 ml de agua destilada
 - 0,10 ml de muestra
 - 0,5 ml de folin
 - 2 ml de carbonato sódico al 20 %

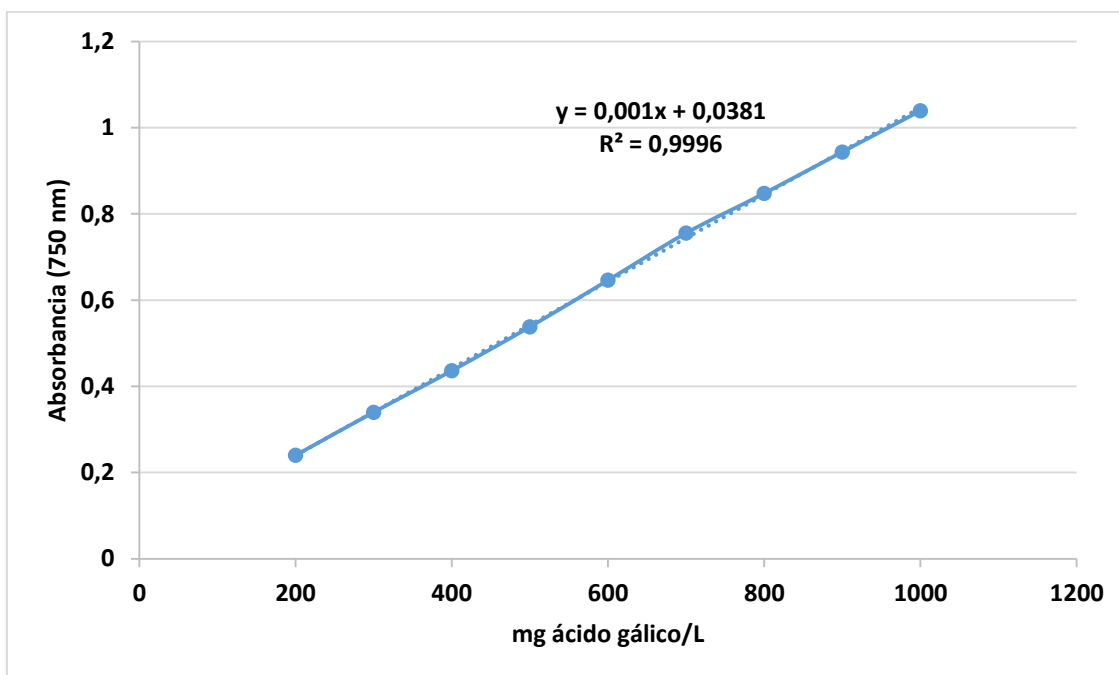
Y se aforó con agua destilada

3. Se dejó incubar a la luz 30 min.
4. Finalmente se realizó la medición de la absorbancia en un espectrofotómetro HACH DR 5000 a 750 nm.

ANEXO A-3

CURVA DE CALIBRACIÓN:

Con el ácido gálico se prepararon las siguientes diluciones: 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 mg/L.



ANEXO A-4

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

1. Se preparó el reactivo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) disolviendo 0,0023 g de DPPH en 100 ml de metanol al 80 %. Para esto se disuelve primero el reactivo DPPH en 50 ml de metanol al 80 % y se enrasa a 100 ml con el sobrante de metanol al 80 %, se disuelve completamente colocando en un agitador orbital STUART SSL1.
2. En las cubetas para la medición se prepararon:
 - **Blanco:** 3000 μ l de metanol.
 - **Control:** 2000 μ l de DPPH + 65 μ l de agua destilada.

El blanco se utiliza para calibración del espectrofotómetro, el control se utiliza en la fórmula para calcular la actividad antioxidante.

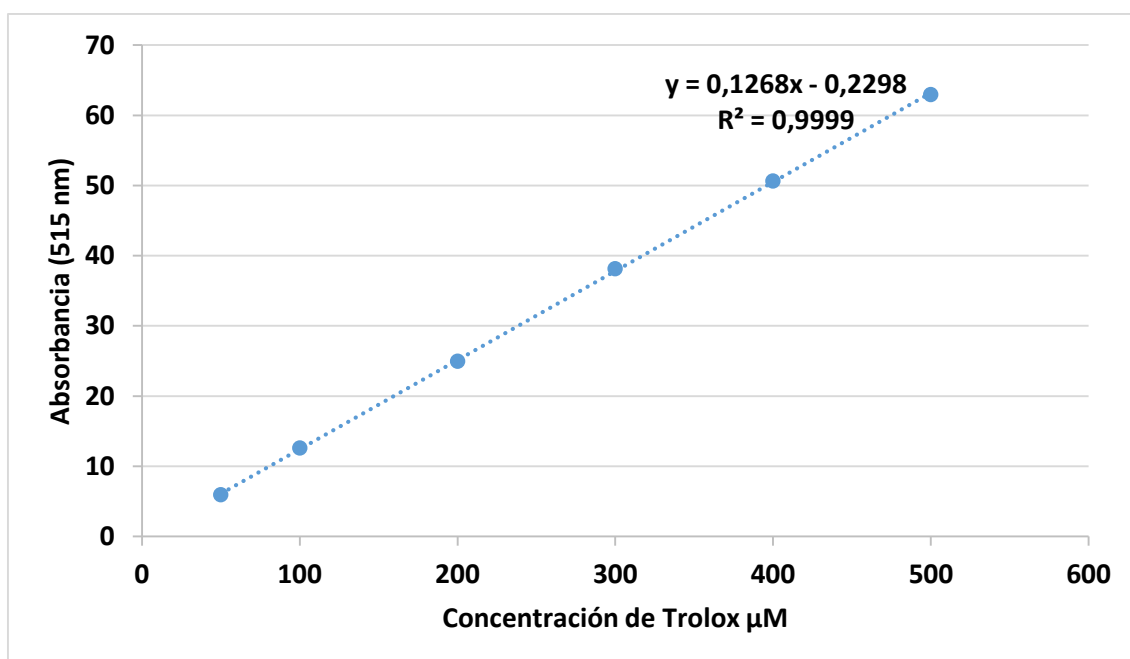
3. Para la medición de las muestras se colocó en las cubetas 2000 μl de DPPH + 65 μl de muestra (dilución 1:20).
4. Se incubaron las muestras en oscuridad durante 1 hora.
5. La medición se realizó en un espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC modelo 4001/4 a 515 nm.

ANEXO A-5

CURVA DE CALIBRACIÓN:

Se preparó la solución madre de Trolox (500 μM) disolviendo 0,0125 g de Trolox en 100 ml de etanol/agua (50:50;v:v). Para esto se colocó primero 50 ml de etanol y se esperó a que se atempere para enrasar con agua destilada por la reacción exotérmica que se produce.

El Trolox se disolvió con etanol al 50 % preparando soluciones de: 50, 100, 200, 300, 400 y 500 μM .



Cálculo del porcentaje de inhibición del DPPH

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

Donde:

Abs_{muestra}= La absorbancia de la muestra medida a 515 nm luego de 1 hora de incubación.

Abs_{Control}= La absorbancia del control medida a 515 nm luego de 1 hora de incubación.

ANEXO B

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO Y LOS BUFFERS PARA DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS

ANEXO B-1

Preparación del extracto

En tubos de centrifuga de 15 ml se pesaron 0,5 g de muestra liofilizada y se añadieron 5 ml de etanol al 80 %. Luego se centrifugó por 10 min a 4000 rpm en una centrifuga HETTICH ROTINA 380 y el sobrenadante se pasó filtrando a balones de aforo de 10 ml. El proceso se realizó por duplicado y luego de pasar los dos sobrenadantes se aforó con etanol al 80 %.

Preparación de los buffer

Preparación de soluciones en balón de aforo de 100 ml

Cloruro de potasio 0,2 N: 1,4912 g de ClK + agua destilada.

Acetato de sodio: 8,2878 g de acetato de sodio + agua destilada.

Ácido clorhídrico 0,2 N: 1,66 ml de HCl + agua destilada.

Ajuste de pH de los buffers

Buffer 1: 25 ml de ClK (0,2 N) + 67 ml de HCl (0,2 N).

Buffer 4,5: 50ml de acetato de sodio + 25 ml de HCl (0,2 N).

ANEXO C

PREPARACIÓN DEL 2-6 DICLOROINDOFENOL Y CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINACIÓN DE VITAMINA C.

ANEXO C-1

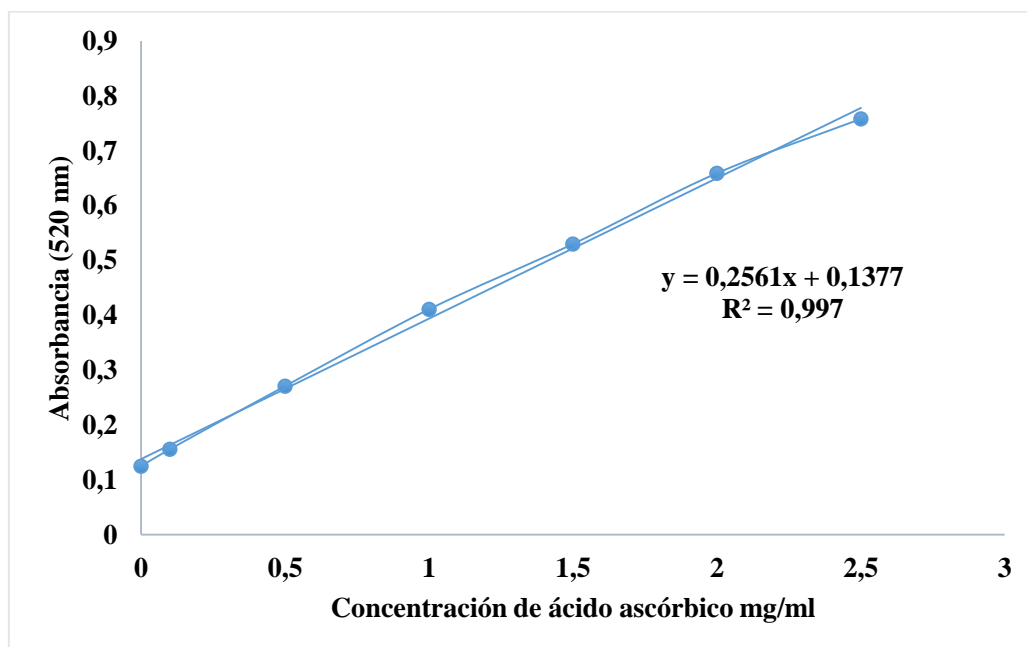
PREPARACIÓN DEL DIF

Se colocaron 0,06 g de DIF en 1000 ml de agua destilada, se calentó y se agitó hasta que se disolvió completamente. Luego se filtró y se midió la absorbancia del DIF que debe estar a $0,980 \pm 0,1$.

ANEXO C-2

CURVA DE CALIBRACION

En un balón de aforo de 10 ml se disolvió 1 g de ácido ascórbico con agua destilada, esta solución equivale a una concentración de 100 mg/ml. Para los estándares de la curva de calibración las diluciones fueron: 0; 0.1; 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5 mg/ml de ácido ascórbico en un volumen final de 100 ml.



ANEXO D

DESARROLLO DEL TRABAJO – FOTOGRAFÍAS

ANEXO D-1. COSECHA DE LA MORA DE CASTILLA Y APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTO.



Figura 11. Mora en estado de madurez 4



Figura 12. Eliminación de fruta en mal estado y pedúnculos



Figura 13. Aplicación del recubrimiento en la fruta



Figura 14. Eliminación del exceso de recubrimiento



Figura 15. Secado del recubrimiento



Figura 16. Fruta envasada

ANEXO D-2. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS.

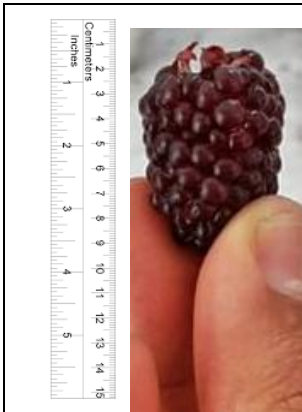


Figura 17. Medición de Longitud y ancho



Figura 18. Pesado de la mora



Figura 19. Balanza infrarrojo



Figura 20. Colorímetro



Figura 21. Texturómetro y refractómetro



Figura 22. Titrador automático

ANEXO D-3. ANÁLISIS DE COMPUESTOS BIOACTIVOS.



Figura 23. Muestra centrifugada



Figura 24. Agitación muestras



Figura 25. Extractos

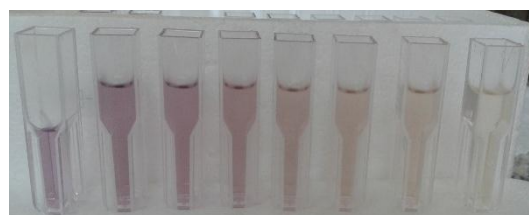


Figura 26. Muestras en cubetas



Figura 27. Diluciones para la curva de calibración



Figura 28. Espectrofotómetro