



UNIVERSIDAD LAICA ELOY ALFARO DE MANABÍ

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial

TEMA:

Incremento de pH como control de *Botrytis*, *Rhizopus*, *Salmonella* y *Escherichia coli* presentes en la frutilla (*Fragaria x ananassa*), Manta 2019

AUTOR:

CEDEÑO MACIAS JESSY STEPHANIE

TUTOR:

PhD. STALIN SANTACRUZ TERÁN

MANTA - MANABÍ - ECUADOR

2019

UNIVERSIDAD LAICA ELOY ALFARO DE MANABÍ

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

TESIS DE GRADO

“ Incremento de pH como control de *Botrythis*, *Rhizopus*, *Salmonella* y *Escherichia coli* presentes en la frutilla (*Fragaria x ananassa*), Manta 2019”

Sometida a consideración del Honorable Consejo de la Facultad de Ciencias Agropecuarias como requisito para obtener el Título de

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

Aprobado por la comisión:

PhD. Stalin Santacruz Terán

TUTOR DE TESIS

Ing. Mirabella Lucas Ormaza Mg.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Robert Mero Santana Mg.

MIEMBRO TRIBUNAL

Ing. Edison Lavayen Delgado Mg.

MIEMBRO TRIBUNAL

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

En calidad de docente tutor de la Facultad de ciencias Agropecuarias de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, certifico:

Haber dirigido y revisado el trabajo de titulación, cumpliendo el total de 400 horas, bajo la modalidad de proyecto de investigación, cuyo tema del proyecto es **Incremento de pH como control de *Botrytis*, *Rhizopus*, *Salmonella* y *Escherichia coli* presentes en la frutilla (*Fragaria x ananassa*)**, el mismo que ha sido desarrollado de acuerdo a los lineamientos internos de la modalidad en mención y en apego al cumplimiento de los requisitos exigidos por el Reglamento de Régimen Académico, por tal motivo CERTIFICO, que el mencionado proyecto reúne los méritos académicos, científicos y formales, suficientes para ser sometido a la evaluación del tribunal de titulación que designe la autoridad competente.

La autoría del tema desarrollado corresponde a: Cedeño Macías Jessy Stephanie, estudiante de la carrera de Ingeniería Agroindustrial, período académico 2019 (1) – 2019 (2), quien se encuentra apto para la sustentación de su trabajo de titulación.

Particular que certifico para los fines consiguientes, salvo disposición de Ley en contrario.

Manta del 2019.

Lo certifico,

PhD. Stalin Gustavo Santacruz Terán

Docente Tutor

Área: Agroindustria

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

Yo CEDEÑO MACIAS JESSY STEPHANIE con C.I. 131355178-8, de la facultad Ciencias Agropecuarias, especialidad Agroindustria, junto con el PhD Stalin Santacruz como tutor, declaro de forma libre y voluntaria que el trabajo sobre **Incremento de pH como control de *Botrytis*, *Rhizopus*, *Salmonella* y *Escherichia coli* presentes en la frutilla (*Fragaria x ananassa*)**, y las expresiones vertidas son autoría del abajo firmante y que se han realizado las correspondientes investigaciones en base a la bibliografía datos en internet y revistas científicas. En consecuencia, asumo la responsabilidad de la originalidad de la misma que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se han respetado las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigente

CEDEÑO MACIAS JESSY STEPHANIE

PhD. STALIN GUSTAVO SANTACRUZ TERÁN

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, doy gracias a Dios por permitirme tener tan buena experiencia dentro de la universidad, y convertirme en un ser profesional en lo que tanto me apasiona, gracias a cada maestro que hizo parte de este proceso integral de formación.

En especial agradezco a mi tutor, el Dr. Stalin Santacruz por cada momento dedicado para aclarar cualquier tipo de duda que me surgiera, ya que fue la persona que me guio desde el inicio de este largo proceso aportando sus conocimientos y orientaciones, que me alentó a tener confianza en mí y mis habilidades a realizar un trabajo independiente.

Gracias a mis padres que fueron mis mayores promotores durante este proceso, gracias a ellos por confiar y creer en mí y en mis expectativas; por brindarme las oportunidades para ser una mejor persona cada día, no solamente en la parte académica sino también por enseñarme a ser una persona humilde, trabajadora y que es necesario de esfuerzo para obtener grandes triunfos

Gracias a la vida por este nuevo triunfo, gracias a todas las personas que me apoyaron y creyeron en la realización de esta tesis.

A todos ellos muchas gracias

Jessy Cedeño

DEDICATORIA

La presente tesis la dedico principalmente a Dios, por ser el inspirador y darme la fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados.

A mis padres, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ellos he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy.

A todas las personas que me han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito en especial a aquellos que nos abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.

INDICE

CAPITULO I

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUCCION | 1 |
| 1.1 | MARCO TEORICO..... | 3 |
| 1.1.1 | La fresa (<i>Fragaria Ananassa</i>) | 3 |
| 1.1.3 | Composición nutricional..... | 3 |
| 1.1.4 | Contaminación por bacterias en la frutilla..... | 4 |
| 1.1.5 | Contaminación por hongos en la frutilla..... | 5 |
| 1.1.6 | Cambio de pH..... | 6 |
| 1.2 | PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 7 |
| 1.3 | JUSTIFICACIÓN | 8 |
| 1.4 | HIPÓTESIS | 9 |
| | OBJETIVOS | 10 |
| 1.5.1 | Objetivo general | 10 |
| 1.5.2 | Objetivos específicos..... | 10 |

CAPITULO II

| | | |
|---------|--|----|
| 2 | METODOLOGÍA..... | 11 |
| 2.1 | LOCALIZACIÓN | 11 |
| 2.2 | VARIABLES..... | 11 |
| 2.2.1 | (Ausencia – Presencia) <i>Botrytis, Rhizopus</i> | 11 |
| 2.2.2 | (Ausencia-Presencia) <i>Salmonella spp</i> y <i>Escherichia coli</i> | 12 |
| 2.3 | DISEÑO EXPERIMENTAL | 13 |
| 2.3.1 | Tipo de diseño..... | 14 |
| 2.3.2 | Análisis estadístico..... | 14 |
| 2.4 | METODO DEL EXPERIMENTO..... | 14 |
| 2.5 | MÉTODO DE ANALISIS | 15 |
| 2.5.1 | Medición del pH..... | 15 |
| 2.5.2 | Método de control de <i>Botrytis</i> y <i>Rhizopus</i> por inmersión en soluciones de pH básico..... | 15 |
| 2.5.2.1 | Actividad antimicrobiana (método de difusión de discos en agar)..... | 15 |

| | |
|--|----|
| 2.5.3 Método de control de <i>Salmonella spp</i> y <i>E. coli</i> por inmersión en soluciones de pH básico. | 16 |
| CAPITULO III | |
| 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 18 |
| 3.1 Actividad antimicrobiana (método de difusión de discos en agar) en Hongos | 18 |
| 3.1.1 Efecto Inhibitorio en <i>Botrytis</i> | 18 |
| 3.1.1 Efecto Inhibitorio en <i>Rhizopus</i> | 18 |
| 3.2 Método de control de <i>Botrythis</i> y <i>Rhizopus</i> por inmersión en soluciones de pH básico..... | 19 |
| 3.2.1 <i>Botrytis</i> | 19 |
| 3.2.2 <i>Rhizopus</i> | 20 |
| 3.3 Actividad antimicrobiana (método de difusión de discos en agar) en Bacterias..... | 21 |
| 3.3.1 Efecto Inhibitorio en <i>Salmonella</i> | 21 |
| 3.1.1 Efecto Inhibitorio en <i>E. coli</i> | 21 |
| 3.4 Método de control de <i>salmonella spp</i> y <i>e. coli</i> por inmersión en soluciones de pH básico..... | 22 |
| 3.4.1 <i>Salmonella</i> | 22 |
| 3.4.2 <i>E. coli</i> | 23 |
| CAPITULO IV | |
| 4.1 CONCLUSIONES..... | 25 |
| 4.2 RECOMENDACIONES | 26 |
| BIBLIOGRAFÍA | 27 |
| ANEXOS | 32 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Esquema de análisis de varianza (ANOVA) <i>Botrytis</i> y <i>Rhizopus</i> | 13 |
| Tabla 2. Esquema de análisis de varianza (ANOVA) <i>Salmonella spp</i> y <i>E.coli</i> . 14 | 14 |
| Tabla 3. Halos de inhibición de soluciones a pH 11, 12 y 13 sobre <i>Botrytis</i> | 18 |
| Tabla 4. Halos de inhibición de soluciones a pH 11, 12 y 13 sobre <i>Rhizopus</i> . 19 | 19 |
| Tabla 5. Método de control de <i>Botrytis</i> por inmersión en soluciones de pH básico | 20 |
| Tabla 6. Método de control de <i>Rhizopus spp</i> por inmersión en soluciones de pH básico..... | 20 |
| Tabla 7. Halos de inhibición de soluciones a pH 11, 12 y 13 sobre <i>Salmonella</i> | 21 |
| Tabla 8. Halos de inhibición de soluciones a pH 11, 12 y 13 sobre <i>E.coli</i> | 22 |
| Tabla 9. Método de control de <i>Salmonella</i> por inmersión en soluciones de pH básico..... | 23 |
| Tabla 10. Método de control de <i>E.col spp</i> por inmersión en soluciones de pH básico. | 24 |

RESUMEN

La presente investigación tiene como objetivo utilizar soluciones de pH alcalino como control de *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Botrytis* y *Rhizopus*, en la frutilla (*Fragaria x ananassa*), el cual se direcciona en sumergir la fruta en soluciones de KOH con la finalidad de evaluar el crecimiento microbiano. Así mismo se evaluó la actividad antimicrobiana al pH empleándose el método de difusión de discos en agar donde utilizaron soluciones de KOH de pH 11, 12 y 13. De acuerdo a los resultados del presente estudio las soluciones a un pH 13 como medio de control en un tiempo de 60 min no hubo presencias de bacterias, con respecto a los hongos se observó un descenso de UPC a medida que el pH va en aumento.

Palabras claves: *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Botrytis*, *Rhizopus*, efecto inhibitorio.

ABSTRACT

The present research aims to use alkaline pH solutions as a control of *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Botrytis* and *Rhizopus*, in the strawberry (*Fragaria x ananassa*), which is aimed at submerging the fruit in KOH solutions for the purpose of treatment microbial growth Likewise, the antimicrobial activity at pH was evaluated using the method of diffusion of discs in agar where KOH solutions of pH 11, 12 and 13 are used. According to the results of the present study the solutions at a pH 13 as a control medium in a time of 60 minutes without the presence of bacteria, with respect to fungi a decrease in UPC was recorded as the pH increases.

Keywords: *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Botrytis*, *Rhizopus*, inhibitory effect.

CAPITULO I

1. INTRODUCCION

Las frutas y hortalizas son productos altamente perecederos, un 23 por ciento de éstas se pierden debido a deterioros microbiológicos como el calor que es una fuente importante de destrucción de patógenos y deterioros fisiológicos como es la pérdida de agua, daño mecánico durante la cosecha, envasado y transporte, así mismo sabiendo que los vegetales están en contacto con bacterias a través del suelo o el agua, para disminuir la carga microbiológica deben mantenerse buenas prácticas de trabajo. (Alzamora *et. al.* 2004)

La frutilla se clasifica como un fruto no climatérico, es decir no mejora su calidad gustativa después de cosechada, sólo aumenta el color y disminuye la firmeza, esta fruta se caracteriza por poseer una elevada tasa respiratoria, por lo que tiene una corta vida de almacenamiento, lo que contribuye a una alta pérdida poscosecha (Undurraga y Vargas, 2013). La estimación de pérdidas es difícil de establecer debido a la cantidad de causas que las provocan, sin embargo, de acuerdo a los estudios realizados por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), las principales causas de las pérdidas poscosecha, son por enfermedades que ocasionan pudriciones y por daño mecánico. (Lourdes *et. al.* 2009)

Una fuente importante de deterioro de la frutilla son los organismos que actúan sobre la fruta descomponiéndola como por ejemplo los diversos tipos de pudrición causada por *Botrytis cinérea* que es la mayor causa de pérdidas poscosecha y por el hongo *Rhizopus stolonifer*, cuyas esporas generalmente están presentes en el aire y se propagan fácilmente (Becerra *et. al.* 2013).

En la actualidad el cultivo de frutilla ha presentado un importante nivel de desarrollo en el Ecuador, las diferentes zonas de la región interandina presentan condiciones favorables para la producción de esta fruta, por lo cual la superficie destinada al cultivo de la misma se ha incrementado, sin embargo, la comercialización en fruto

fresco no siempre garantiza buenos rendimientos económicos, siendo necesario aplicar buenas prácticas de manejo como el control de enfermedades (Macas 2013).

En general, las bacterias tienen pH óptimo de crecimiento próximos a la neutralidad; mientras que los mohos se desarrollan en un intervalo de pH más amplio como por ejemplo el *Botrytis* que germina en un rango de pH de 3- 7 con un óptimo pH de 4 (Martínez *et. al.* 2008).

Los principales factores que afectan al crecimiento bacteriano son el tiempo, la temperatura, los nutrientes, el agua disponible y el pH, este último es un factor determinante para controlar el crecimiento bacteriano ya que con un pH bajo se puede detener el desarrollo de bacterias (Chavarrías 2013).

1.1 MARCO TEORICO

1.1.1 La fresa (*Fragaria ananassa*)

La fresa es una planta de la familia de las Rosáceas, subfamilia Rosoidea, tribu Potentilla y género *Fragaria*, los cultivares más utilizados en la actualidad son cruzamientos de las especies: *Fragaria vesca*, *Fragaria chiloensis*, *Fragaria virginiana* y la *Fragaria grandiflora* (Kessel 2018).

Es una planta perenne estolonífera, de pequeña altura, que es cultivada para la producción de sus frutos, los que son altamente apreciados por los consumidores por su delicado sabor, agradable aroma y color rojo intenso (ONUDI 2015).

Macas *et. al.* (2013) informa que la frutilla es un producto de alta demanda, tanto en estado fresco como procesado, debido especialmente a sus características organolépticas, así como por su alto contenido de vitamina C y gran cantidad de ácido elágico, el cual presenta un enorme interés por sus propiedades anticancerígenas y antitumorales

En el Ecuador se puede encontrar el cultivo de la frutilla agrupado en zonas como Pichincha, específicamente en Yaruquí, Pifo, El Quinche y el valle del noroccidente que comprende las parroquias de Pomasqui, San Antonio de Pichincha y Calacalí, su cultivo se ha expandido a otras provincias como Tungurahua y Chimborazo, los principales mercados de destino son Quito, Guayaquil, Cuenca y algunas zonas de la costa del país (Quishpe 2017).

1.1.3 Composición nutricional

La importancia que tienen los nutrientes de las frutas en general, radica en que forman parte de la dieta diaria equilibrada que se debe seguir para preservar una buena salud, aspecto que llama el interés de los consumidores, en el caso de la frutilla una porción de 100 gramos (g) de fruta contiene: agua (89.9%), calorías (37

kcal), proteínas (0.7 g), grasas (0.5 g), hidratos de carbono (8.4 g), vitamina A (3.33 mg), vitamina B1 (0.03 mg), vitamina B2 (0.07 mg), vitamina B (0.6 mg), vitamina C (59 mg), calcio (21 mg), fósforo (21 mg), hierro (1 mg), sodio (1 mg) y potasio (164 mg). Además, contiene ácidos orgánicos, mismos que tienen propiedades antioxidantes e inhiben el desarrollo de células cancerígenas. Además, posee bajos niveles de azúcares (fructosa y glucosa) por lo que se recomienda para personas diabéticas (Parra 2018).

1.1.4 Contaminación por bacterias en la frutilla

La transmisión de enfermedades producida por el consumo de alimentos es un fenómeno muy conocido en todo el mundo, con los estudios realizados se ha constatado el incremento de las enfermedades por consumir alimentos contaminados con diferentes microorganismos patógenos, dentro de las bacterias que son causantes de la contaminación en alimentos y provocan enfermedades de índole infeccioso se encuentran *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, (Carrasco *et. al.* 2017)

- ***Escherichia coli***

E. coli es el indicador principal de contaminación fecal en alimentos y agua contaminada, ella está presente en todas las heces de animales y humanos, así como también en las aguas residuales y está estrechamente relacionada a enfermedades en humanos y animales; su pronta detección e identificación es de gran importancia para la prevención de enfermedades gastrointestinales y la protección del medio ambiente manteniendo los ríos y causes que son usados como fuentes de riego (Ríos 2018).

- ***Salmonella spp***

El género *Salmonella* también forma parte de la familia Enterobacteriaceae y es causante de la enfermedad conocida como salmonelosis y al igual que *E. coli* es transmitida por la ingestión de alimentos contaminados, los cuales tienen contacto directo con los manipuladores que carecen de una buena higiene o con heces fecales de animales (Ríos 2018).

1.1.5 Contaminación por hongos en la frutilla

Debido a que la fresa es un fruto no climatérico, y altamente sensible al daño mecánico, lo cual la hace muy susceptible a la invasión de algunos organismos patógenos, posee una vida postcosecha muy corta y entre las causas de pérdida de calidad de los frutos de fresa se encuentra su sensibilidad al deterioro por ataque de hongos fitopatógenos, entre los que se encuentran *Botrytis cinérea* y *Rhizopus stolonifer*, los cuales ocasionan importantes pérdidas postcosecha (Olalde *et. al.* 2012)

- ***Botrytis cinérea***

La pudrición por *Botrytis* o moho gris causada por *Botrytis cinérea* es la mayor causa de pérdidas postcosecha en fresa, esta enfermedad ataca las flores, sobre todo, cuando se presentan períodos prolongados con alta humedad relativa y al fruto durante su desarrollo, maduración y transporte, en la fruta aparece como una mancha amarillenta de consistencia acuosa, que posteriormente se extiende entoda la frutilla para cubrirse posteriormente de un polvo gris, que corresponde a las esporas del hongo, en algunos casos esta enfermedad es capaz de atacar hasta el 95% de frutos después de 48 horas de cosechados (Muñoz 2011).

- ***Rhizopus stolonifer***

Rhizopus stolonifer es un agente causal de la enfermedad conocida como pudrición blanda, puede crecer y desarrollarse a temperaturas que van desde los 10 hasta los 33°C y humedades relativas variables, se ve seriamente afectado por temperaturas menores a los 5°C, es un hongo que se encuentra como saprófito sobre pedazos de fruta o cualquier material orgánico, su micelio es aéreo, este hongo se puede reproducir sexual y asexualmente (Olalde *et. al.* 2012).

1.1.6 Cambio de pH

Los microorganismos con un crecimiento óptimo de exceso de pH 8, comúnmente entre 9 y 10, se definen como alcalófilos, estos se encuentran entre procariotas, arqueas, eucariotas y en ambientes altamente alcalinos, tales como lagos de soda o suelos carbonatados. (Lunestad, *et. al.* 2018).

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las frutas y hortalizas son componentes esenciales de la dieta humana y hay evidencia considerable de los beneficios de salud y nutricionales asociados con su consumo, sin embargo diversos microorganismos patógenos son frecuentemente vinculados con frutas y vegetales que se consumen crudos, dentro de ellos se destacan *Salmonella spp.*, y *E. coli*, entre otros, por lo tanto la desinfección de estos alimentos antes de su consumo es recomendable (OMS 2018).

Quishpe (2017) señala que el bajo rendimiento de la frutilla en el Ecuador es un problema que muchos productores aún no lo perciben a pesar de que en ocasiones se manifiesta incluso con el ataque de plagas y enfermedades que limitan el rendimiento y afectan a la calidad de la fruta, cuando se cosecha o recolecta por una inadecuada manipulación ocurren lesiones físicas o mecánicas que provocan defectos irreversibles volviéndose propensos a microorganismos patógenos, esto en compañía del ambiente agravan el problema, hay que considerar que esta fruta tiene una de las tasas respiratorias más altas de todos los frutos frescos, y debido a sus características como forma, tamaño, aroma, y grosor es importante el inmediato almacenamiento adecuado

Las lesiones producidas en los frutos durante la cosecha y posterior manipulación postcosecha se convierten en puntos de ataque preferenciales de diferentes microorganismos patógenos entre los que destacan los hongos *Botrytis cinérea* y *Rhizopus* (Borja 2010).

Los tratamientos postcosecha en frutas y hortalizas pueden ayudar a disminuir las pérdidas por descomposición debidas al ataque de microorganismos, tales como *Botrytis*, *Rhizopus* así como controlar la contaminación de la fruta con agentes patógenos como *Salmonella spp.*, y *E. coli* (García et. al. 2017)

1.3 JUSTIFICACIÓN

Para asegurar la calidad e inocuidad de las frutas y hortalizas es necesario minimizar la contaminación de los productos con microorganismos patógenos que puedan afectar la salud del consumidor, existen diversos métodos para reducir la flora superficial de frutas y hortalizas, en general los métodos utilizados se basan en procesos físicos como la remoción mecánica, los tratamientos térmicos, la irradiación y los métodos químicos involucran el uso de agentes como desinfectantes superficiales (Garmendia y Vero, 2006).

Vélez (2015) mencionó que las frutillas tienen las desventajas de ser muy perecederas debido a su elevada respiración y carencia de barrera exterior que limita la retención del agua, además la conservación de la misma es limitada por la poca resistencia a los daños mecánicos y al ataque microbiológico lo que hace que su vida útil sea muy corta y aumenta las pérdidas posteriores a la cosecha.

Uno de los principales factores en el desarrollo del cultivo e incluso en la poscosecha de la fruta, es el manejo de las enfermedades que, en su gran mayoría, son de carácter fúngico; seguidas por algunos problemas bacterianos, debido a esto se han realizado diversas investigaciones para controlar los microorganismos en la frutilla (Cano 2013)

Tomando en cuenta lo anterior en el presente trabajo, se estudiará el uso de soluciones de pH básico como medio de control de *Botrytis*, *Rhizopus*, *Salmonella* y *Escherichia coli* presentes en la frutilla (*Fragaria x ananassa*)

1.4 HIPÓTESIS

El tratamiento por inmersión en solución de pH básico sirve como control de *Botrytis*, *Rhizopus*, *Salmonella* y *Escherichia coli* presentes en la frutilla (*Fragaria x ananassa*).

OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo general

Utilizar soluciones de pH básico como control de *Botrytis*, *Rhizopus*, *Salmonella spp* y *Escherichia coli* en la frutilla. (*Fragaria x ananassa*),

1.5.2 Objetivos específicos

1. Estudio *in vitro* del uso de soluciones de álcali a pH de 11, 12 y 13 como medio de control para *Botrytis* y *Rhizopus* en la frutilla.
2. Estudiar el uso de soluciones de álcali a pH de 11, 12 y 13 como medio de control para *Salmonella spp* y *Escherichia coli* en la frutilla.

CAPITULO II

2. METODOLOGÍA

2.1 LOCALIZACIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de alimentos y Laboratorio de análisis de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Laica "Eloy Alfaro" de Manabí, ubicada en la ciudad de Manta, con latitud sur 0°57'10" y longitud oeste 80°44'43" con una altitud promedio de 20 msnm.

2.2 VARIABLES

2.2.1 (Ausencia – Presencia) *Botrytis*, *Rhizopus*

Variables independientes

A. pH

A₁ - 11

A₂ - 12

A₃ - 13

Variables dependientes

Presencia *Botrytis*

Presencia *Rhizopus*

2.2.2 (Ausencia-Presencia) *Salmonella spp* y *Escherichia coli*

Variables independientes

B. pH

B₁ - 11

B₂ - 12

B₃ - 13

C. Tiempo de inmersión

C₁ - 20 minutos

C₂ - 40 minutos

C₃ - 60 minutos

Variables dependientes

Presencia *Salmonella spp.*

Presencia *Escherichia coli*

2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

2.3.1 Tipo de diseño

Para este estudio se utilizará dos tipos de diseños completamente al azar, el primer diseño unifactorial y el segundo diseño bifactorial.

2.3.2 Análisis estadístico

El análisis estadístico para el tratamiento se utilizará un análisis de varianza ADEVA con una prueba de significancia TUKEY al 5 %. Todos los datos serán analizados por triplicado y los resultados serán procesados por el programa Infostat 2016.

Tabla N°1 Esquema de análisis de varianza (ANOVA) *Botrytis* y *Rhizopus*

| Fuente de variación | | G.L |
|---------------------|-------------------|-----|
| Total | $(t \cdot r - 1)$ | 8 |
| Tratamientos | $(t - 1)$ | 2 |
| Repetición | $r - 1$ | 2 |
| Error experimental | $(t - 1) (r - 1)$ | 4 |

Tabla N°2 Esquema de análisis de varianza (ANOVA) *Salmonella spp* y *E.coli*

| Fuente de variación | | G.L |
|---------------------|---------------|-----|
| Total | $(t*r-1)$ | 26 |
| Tratamientos | $(t-1)$ | 8 |
| Repetición | $r-1$ | 2 |
| Factor A | 2 | |
| Factor B | 2 | |
| Interacción (AxB) | 4 | |
| Error experimental | $(t-1) (r-1)$ | 16 |

2.4 MANEJO DEL EXPERIMENTO

Se obtuvieron 96 frutillas (*Fragaria x ananassa*) del mercado central de la ciudad de Manta con un peso aproximadamente de 20g c/u, estas se clasificaron por la uniformidad en su grado de madurez a escala 4, además se aseguró que no haya evidencias de daños por microorganismos y mecánicos. Se transportaron a laboratorio, se realizó un respectivo lavado con agua destilada estéril, para el análisis microbiológico de las bacterias se utilizaron 36 frutillas para *Salmonella* y 36 para *e. Coli*; con respecto a los hongos se utilizaron 12 frutillas tanto para *Botrytis* como *Rhizopus*.

2.5 MÉTODO DE ANALISIS

2.4.1 Medición del pH

La medición del pH se realizó de acuerdo a la metodología descrita por la Norma Oficial Methods of Analysis - Association of Official Analytical Chemists (AOAC 1975).

2.4.2 Método de control de *Botrytis* y *Rhizopus* por inmersión en soluciones de pH básico.

Las frutillas se inocularon a una concentración de 10^4 UPC/ml para *Botrytis* y 10^5 UPC/ml para *Rhizopus* (Camacho *et. al.* 2017), luego de ello las frutas se sometieron a una inmersión de 300 ml de agua destilada con 0.098g, 0.96g y 2.02g de hidróxido de potasio obteniéndose soluciones alcalinas con un pH 11, 12 y 13. Posteriormente, se retiraron las frutillas de la solución y se procedió a realizar un enjuague con agua destilada para posteriormente realizarle el respectivo análisis microbiológico. Para ello, la toma de muestra se realizó por el método de hisopado y el análisis de la presencia/ausencia de *Botrytis* y *Rhizopus* se realizó de acuerdo a la metodología descrita por la Norma Técnica Ecuatoriana 1529-2013. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

2.4.2.1 Actividad antimicrobiana (método de difusión de discos en agar)

En primer lugar, se inoculó *Botrytis* y *Rhizopus* en cajas Petri que contienen agar Sabouraud dextrosa. Para evaluar la actividad microbiana al pH se utilizaron soluciones alcalinas de pH 11, 12, 13 y un control con agua destilada

El análisis de control antimicrobiano se realizó de acuerdo al método de difusión en agar según la técnica estandarizada por el National Committee For Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2009). Se depositó aproximadamente 20 µL del agente en estudio en disco del papel filtro (Fisher Scientific Q2) de 5 mm de diámetro. Posteriormente, estos discos fueron colocados en placas que contienen el medio inoculado con *Botrytis* y *Rhizopus* a analizar. Las placas se incubaron a una temperatura de 25 °C por 24 horas. Al final de ello, se midieron los halos de inhibición del crecimiento fúngico. En todos los casos la evaluación se realizó por triplicado.

2.4.3 Método de control de *Salmonella spp* y *E. coli* por inmersión en soluciones de pH básico.

Las frutillas se inocularon a una concentración de 10⁶ UFC/ml para *Salmonella* y *E. coli* (Ledesma *et. al.* 2018), para luego ser sometidas a una inmersión de 300 ml de agua destilada con 0.098g, 0.96g y 2.02g de hidróxido de potasio obteniéndose soluciones alcalinas de pH 11, 12 o 13. Las frutillas se mantuvieron sumergidas en las soluciones por tiempos de 20, 40, 60 minutos. Posteriormente, se retiraron de la solución y se procedió a realizar un enjuague con agua destilada.

2.4.3.1 Determinación presencia / ausencia de *Salmonella spp*

El análisis de la presencia/ausencia de *Salmonella spp* se realizaron de acuerdo a la metodología descrita por la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1529-15:2009 con ciertas modificaciones. Una vez que se han sumergido las frutillas en las soluciones de pH, y posteriormente enjuagadas con agua destilada, la toma de muestra se realizó por el método de hisopado, posteriormente se siguió la metodología de la norma antes descrita. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

2.4.3.2 Determinación de *Escherichia coli*

El análisis de la presencia/ausencia de *E. coli* se realizó de acuerdo a la metodología descrita por la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1529-8:2025 con ciertas modificaciones. Una vez que se han sumergido las frutillas en las soluciones de pH alcalinas, y posteriormente enjuagadas con agua destilada, la toma de muestra se realizó por el método de hisopado, luego se realizó los pasos subsiguientes de acuerdo a la norma descrita. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

2.4.3.3 Actividad antimicrobiana (método de difusión de discos en agar)

Primeramente, se inoculó *Salmonella Spp* y *E. coli* en cajas Petri que contienen agar Shigella. Para evaluar la actividad microbiana al pH se utilizaron soluciones de hidróxido de potasio de pH 11, 12, 13 y un control de agua destilada.

Como análisis de control antimicrobiano se empleó el método de difusión en agar según la técnica estandarizada por el National Committee For Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2009). Se depositaron aproximadamente 20 µL del agente en estudio en disco del papel filtro (Fisher Scientific Q2) de 5 mm de diámetro posteriormente estos discos fueron colocados en placas que contenían el medio inoculado con *Salmonella Spp* y *E. coli*. Las placas se incubaron a una temperatura de 37 °C por 24 horas. Al final de ello, se midieron los halos de inhibición del crecimiento de patógenos. En todos los casos la evaluación se realizó por triplicado

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Actividad antimicrobiana (método de difusión de discos en agar) en Hongos

3.1.1 Efecto Inhibitorio en *Botrytis*.

Los resultados del efecto inhibitorio de pH frente al hongo *Botrytis* mostraron una diferencia estadística significativa entre los tratamientos y el control, donde el menor halo de inhibición se obtuvo para el pH 11 con 8 mm y el mayor con 11,67 mm para el pH 13 (Tabla 3), siendo este último el mejor tratamiento del estudio.

Tabla 3. Halos de inhibición de soluciones a pH 11, 12 y 13 sobre *Botrytis*.

| pH | Diámetro del halo inhibición (mm) |
|----|-----------------------------------|
| C | 0,00 A |
| 11 | 8,00 B |
| 12 | 10,00 B C |
| 13 | 11,67 C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

3.1.2 Efecto Inhibitorio en *Rhizopus*.

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos del efecto inhibitorio frente a *Rhizopus*. Se obtuvo una diferencia significativa entre el control y los tratamientos, en donde el pH 12 muestra el mejor tratamiento para el estudio con 11,44 mm.

Tabla 4. Halos de inhibición de soluciones a pH 11, 12 y 13 sobre *Rhizopus*.

| pH | Diámetro del halo inhibición (mm) |
|-----------|--|
| C | 0,00 A |
| 13 | 11,00 B |
| 11 | 11,00 B |
| 12 | 11,44 B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

La inhibición de *Botrytis* y *Rhizopus* en presencia de un pH básico podrían deberse a un efecto de secado del microorganismo, resultante de una deshidratación osmótica por la diferencia de concentraciones de hidróxido entre el medio y el microorganismo. Sin embargo, Haro (2004) evaluó el estudio de la Conservación de Arándanos (*Vaccinium corymbosum*) mediante Deshidratación Osmótica y Secado por Aire donde se observó que el nivel de humedad bajo inhibe en la mayoría de los microorganismos que afectan a la estabilidad de la fruta

3.2 Método de control de *Botrytis* y *Rhizopus* por inmersión en soluciones de pH básico

3.2.1 *Botrytis*

En la tabla 5 se muestra los resultados sobre el control de *Botrytis* por inmersión en soluciones de pH básico en donde podemos observar un descenso de UPC a medida que el pH básico va en aumento, mostrando así valores de $1,4 \times 10^4$ a pH 11 y a pH 13 con $2,0 \times 10^3$ UPC.

Tabla 5. Método de control de *Botrytis* por inmersión en soluciones de pH básico. UPC de *Botrytis spp.*

| pH | UPC |
|-----------|---------------------|
| 11 | 1,4x10 ⁴ |
| 12 | 4,0x10 ³ |
| 13 | 2,0X10 ³ |
| C | 1,0X10 ⁴ |

3.2.2 *Rhizopus*

En los resultados obtenidos sobre el control de *Rhizopus* (Tabla 6) se observó un descenso de UPC a medida que va aumentando el pH básico, en donde se obtuvo 5,0X10³ UPC a pH 11 y 1,0X 10³ UPC a un pH de 13.

Tabla 6. Método de control de *Rhizopus spp* por inmersión en soluciones de pH básico. UPC de *Rhizopus spp.*

| pH | UPC |
|-----------|----------------------|
| 11 | 5,0X10 ³ |
| 12 | 3,4X 10 ³ |
| 13 | 1,0X 10 ³ |
| C | 1,0X 10 ⁴ |

El efecto de secado del microorganismo por deshidratación osmótica es mayor cuando se utilizan soluciones de pH más elevado, mismo que contiene una mayor concentración de hidróxido. Donde Villa *et. al.* (2009) evaluaron cambios composicionales y microbiológicos asociados a ciclos sucesivos de deshidratación osmótica y como resultado de este tratamiento se redujo la presencia de microorganismos tales como hongos, levaduras y mesofilos.

3.3 Actividad antimicrobiana (método de difusión de discos en agar) en bacterias.

3.3.1 Efecto Inhibitorio en *Salmonella spp.*

En los resultados obtenidos en el efecto inhibitorio de pH frente a la bacteria patógena de *Salmonella* descritos en la tabla 7, se observó diferencia significativa entre los tratamientos y el control, donde el pH 13 tuvo mayor efecto inhibitorio con 11,22 mm

Tabla 7. Halos de inhibición por inmersión en soluciones de pH 11, 12, y 13 sobre *Salmonella spp.*

| pH | Diámetro del halo inhibición (mm) |
|----|-----------------------------------|
| C | 0,00 A |
| 12 | 9,56, B |
| 11 | 9,89 B |
| 13 | 11,22 B |

No existen estudios del uso de soluciones de pH básico para el control de *Salmonella*. En el presente estudio el incremento de la concentración de hidróxido produjo una mayor inhibición de *Salmonella*.

3.1.2 Efecto Inhibitorio en *E. coli*.

En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos del efecto inhibitorio en la bacteria *E. coli*, donde se observó diferencia significativa entre tratamientos y el control. El menor halo de inhibición se obtuvo para pH 13 con 10,33 mm y el mayor con 12,11 mm para pH 12 siendo este último, estadísticamente igual al obtenido para pH 11.

Tabla 8. Halos de inhibición de inmersión en soluciones de pH 11, 12 y 13 sobre *E. coli*.

| pH | Diámetro del halo inhibición (mm) |
|----|-----------------------------------|
| C | 0,00 A |
| 13 | 10,33 B |
| 11 | 11,56 C |
| 12 | 12,11 C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Contrariamente a lo esperado, la solución a pH 13 produjo una menor inhibición que las soluciones de menores pH. No existen estudios del uso de soluciones de pH básico para el control de *E. coli*. Sin embargo, Cholan *et. al.* (2019) evaluaron el efecto de un extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* sobre el crecimiento de *E. coli* y *Salmonella* en donde se observaron que los promedios de los diámetros de los halos de inhibición a mayor concentración del extracto en *E. coli* disminuyó.

3.4 Método de control de *salmonella spp* y *e. coli* por inmersión en soluciones de pH básico.

3.4.1 *Salmonella*

En la tabla 9 se muestran los resultados de control de *Salmonella* por inmersión en soluciones de pH básico por diferentes tiempos de inmersión. No hubo crecimiento a pH de 12 y 13. Por otro lado, todos los tratamientos tuvieron menor número de UFC y fueron diferentes al control ($p > 0,05$).

Tabla 9. Método de control de *Salmonella spp.* por inmersión en soluciones de pH básico. UFC sobre *Salmonella spp.*

| pH | TIEMPO | UFC |
|-----------|---------------|------------|
| 13 | 60 min | 0,00 A |
| 12 | 20 min | 0,00 A |
| 13 | 40 min | 0,00 A |
| 13 | 20 min | 0,00 A |
| 12 | 40 min | 0,33 A |
| 12 | 60 min | 0,33 A |
| 11 | 40 min | 0,67 A |
| 11 | 60 min | 1,00 A |
| 11 | 20 min | 3,33 A B |
| C | 20 min | 4,67 A B |
| C | 40 min | 8,67 B |
| C | 60 min | 32,00 C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

3.4.2 *E. coli*

Los resultados de control de *E. coli* por inmersión en soluciones de pH básico (tabla 10) mostraron que hubo diferencia significativa en donde el tratamiento el menos efectivo fue a pH 13 por 20 min y su mejor efectividad al 60 min donde no hubo presencia de UFC. Por otro lado, todos los tratamientos tuvieron menor número de UFC y fueron diferentes al control

Tabla 10. Método de control de E. coli por inmersión en soluciones de pH básico. UFC sobre e. Coli spp.

| pH | TIEMPO | UFC |
|-----------|---------------|-------------|
| 13 | 60 min | 0,00 A |
| 12 | 20 min | 2,67 A B |
| 11 | 20 min | 3,33 A B |
| C | 20 min | 13,00 A B C |
| C | 40 min | 14,33 B C |
| 11 | 40 min | 25,00 C D |
| 12 | 40 min | 31,33 D |
| C | 60 min | 37,33 D E |
| 12 | 60 min | 46,33 E F |
| 13 | 40 min | 53,67 F |
| 11 | 60 min | 77,67 G |
| 13 | 20 min | 91,00 H |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

CAPITULO IV

4.1 CONCLUSIONES

- En el estudio *in vitro* con el uso de soluciones de hidróxido de potasio se concluye que al llegar a un pH 13 las UPC tanto *Botrytis* como *Rhizopus* disminuyeron.
- En la investigación *in vitro* en soluciones del pH alcalino como medio de control en las bacterias del presente estudio, al llegar a un tiempo de inmersión de 60 min no hubo presencia de las mismas.
- Respondiendo a la hipótesis planteada, las soluciones de pH 13 sirven como control de *Botrytis*, *Rhizopus*, *Salmonella* y *Escherichia coli* presentes en la frutilla (*Fragaria x ananassa*).

4.2 RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar el estudio de inhibición en otros hongos y/o bacterias que atacan a la fresa en su cosecha y poscosecha

Se recomienda realizar investigaciones con otras variedades de frutilla que se encuentren en el mercado para realizar una comparación con esta investigación

BIBLIOGRAFÍA

- Alzamora, S. M., Guerrero, S. N., Nieto, A. B., & Vidales, S. L..2004. Conservación de frutas y hortalizas mediante tecnología combinada. FAO (en línea). Roma. Consultado 10 abril 2019. Disponible en <http://www.fao.org/3/a-i0480s.pdf>
- Becerra, C., Robledo, P., & Delfilippi, B.2013. Cosecha y Postcosecha de la frutilla. (S. V. Pablo Undurraga D, Ed.) Manual de la frutilla (en línea). Centro de investigaciones agropecuarias, 103pp. Consultado 15 abril 2019. Disponible en <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR39084.pdf>
- Bonet, J. 2010. Desarrollo y caracterización de herramientas genómicas en fragaria diploide para la mejora del cultivo de fresa. (en línea). Barcelona. Consultado 10 mayo 2019. Disponible en <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/42009/jbg1de1.pdf;jsessionid=6FCB57F54C50422C2C20A337DE5CBC68?sequence=1>
- Borja, E. 2010. Estudio de la conservación de fresas (fragaria vesca) mediante tratamientos térmicos (en línea) Ambato, Ecuador. Consultado 20 abril 2019. Disponible en <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/865/1/AL427%20Ref.%203273.pdf>
- Cano, M. A. 2013. Estrategias biológicas para el manejo de enfermedades en el cultivo de la fresa (fragaria spp). (en línea) Revista colombiana de ciencias hortícolas, 7(2), pp 265. Consultado 10 mayo 2019. Disponible en <http://www.scielo.org.co/pdf/rcch/v7n2/v7n2a11.pdf>
- Carrasco, I, Caro, J. 2017. Enfermedades transmitidas por los alimentos: una mirada puntual para el personal de salud. (en línea). México. 37 (3): 95-104. Consultado 10 mayo 2019. Disponible en <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2017/ei173e.pdf>

- Chavarrías, M. 2013. El pH de los alimentos y la seguridad alimentaria. Consultado 10 mayo 2019. Disponible en <https://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/el-ph-de-los-alimentos-y-la-seguridad-alimentaria.html>
- Cholán, K.; Zavaleta, G.; Saldaña, J.; & Blas, W. 2019 Efecto del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) sobre el crecimiento de *Salmonella typhi* y *Escherichia coli* Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/arnal/v26n2/a12v26n2.pdf>
- García-Robles, J. M., Medina-Rodríguez, L. J., & Mercado-Ruiz, J. 2017. Evaluación de desinfectantes para el control de microorganismos en frutas y hortalizas (en línea), Revista Iberoamericana de Tecnología Poscosecha, 18, pp 10. Consultado 27 mayo 2019. Disponible en <http://www.redalyc.org/pdf/813/81351597002.pdf>
- Garmenia, G, Mero, S. 2006. Métodos para la desinfección de frutas y verduras (en línea). Barcelona, Pag.18. Consultado 13 mayo 2019. Disponible en http://www.horticom.com/revistasonline/horticultura/rh197/18_27.pdf
- Gil, E., Duque, A., Dumar, V. 2018. Obtención y caracterización fisicoquímica, microbiológica y sensorial de productos mínimamente procesados de fresa (*Fragaria x ananassa*) mediante el uso de recubrimientos comestibles. (en línea). Artículo científico. Medellín. 85(207). Consultado 29 octubre 2019. Disponible en http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0012-73532018000400183.
- Haro, A (2004). Estudio de la Conservación de Arándanos (*Vaccinium corymbosum*) cv. Elliot, mediante Deshidratación Osmótica y Secado por Aire. Determinación de Condiciones Experimentales Óptimas de Procesamiento. Universidad Austral de Chile. Consultado 20 enero 2020. Disponible en <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2004/fah2921e/doc/fah2921e.pdf>

- Jiménez, A. 2016. Supervivencia y parámetros cinéticos de *Escherichia coli* en zumos de frutas naturales (en línea). Universidad de Valladolid. pp 6. Consultado 23 mayo 2019. Disponible en <http://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/18307/TFG-M-N516.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Kessel, A. 2012. Mejora genética de la fresa (*Fragaria Ananassa*) a través de métodos biotecnológicos. (en línea). Ministerio de educación superior. Cuba, 33(3), pp 34-41. Consultado 27 octubre 2019. Disponible en <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v33n3/ctr05312.pdf>
- Ledesma, R., Rodríguez, J., Muñoz, J. 2018. Evaluación del procedimiento de lavado por inmersión de papayas (*Carica papaya* L.) según empaque de empresa exportadora. (en línea). Congreso Internacional Inocuidad de los Alimentos. México. Consultado 29 octubre 2019. Disponible en [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/382-1752-1-PB%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/382-1752-1-PB%20(1).pdf)
- Lourdes, M. y Gonzales, A. 2009. Estimación de los daños físicos y evaluación de la calidad de la fresa durante el manejo poscosecha y el transporte simulado. politécnica de valencia (España) y de Guanajuato (México) (en línea). Valencia, España. Pag.33. Consultado 22 abril 2019. Disponible en <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/6473/tesisUPV3131.pdf>
- Macas, P., Cárdenas, F. 2013. Evaluación de tres fungicidas químicos para el control de *Botrytis cinérea* en el cultivo de frutilla (*Fragaria chiloensis*), en el cantón Otavalo, provincia de Imbabura. (en línea). Universidad Técnica de Babahoyo. Babahoyo. Consultado 10 mayo 2019. Disponible en <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/49000/284/10/T-UTB-FACIAG-AGR-000069.03.pdf>
- Macas, R. 2013. Evaluación de tres fungicidas químicos para el control de *Botrytis cinérea* en el cultivo de frutilla (*Fragaria chiloensis*), en el cantón Otavalo, provincia de Imbabura (en línea) Universidad Técnica de Babahoyo. Pág. 1. Consultado 02 Junio 2019. Disponible en

<http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/49000/284/8/T-UTB-FACIAG-AGR-000069.01.pdf>

- Martínez, M.A. & Moreno, Z.Y. 2008. Estandarización de una metodología para la evaluación de eficacia de productos preventivos para la protección de cultivos preventivos para el control de Botrytis en condiciones semi controladas. Universidad Javeriana (en línea). Bogotá. Consultado 27 mayo 2019. Disponible en <https://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis104.pdf>
- Muñoz, C. 2011. Combate biológico del moho gris (Botrytis cinérea) bajo dos condiciones de almacenamiento, del fruto de fresa (Fragaria x ananassa) C.V. ALBIÓN. (en línea). Ambato. Consultado 10 mayo 2019. Disponible en http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/878/1/Tesis_t003agr.pdf
- Olalde, V., Mena, H., Ceja, L., Venegas, J. 2012. antagonismo in vitro de aislados bacterianos de fresa comercial y silvestre vs. Botrytis cinérea Y Rhizopus stolonifer. (en línea). Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable. México 8(3). pp. Consultado 10 mayo 2019. Disponible en 103-110.file:///C:/Users/Usuario/Downloads/53767-152668-1-PB%20(1).pdf
- OMS, 2018. Aumentar el consumo de frutas y verduras para reducir el riesgo de enfermedades no transmisibles (en línea). Consultado 23 mayo 2019. Disponible en https://www.who.int/elena/titles/fruit_vegetables_ncds/es/
- ONUDI. 2015. Cultivo de la frutilla. Ministerio del medio ambiente. (en línea). Chile. Consultado 10 mayo 2019. Disponible en https://www.unido.org/sites/default/files/2016-11/straw_0.pdf
- Parra, E. 2018. producción y comercialización de frutilla (fragaria sp) en la parroquia Yaruquí, cantón Quito, provincia de Pichincha. (en línea). Ibarra. Consultado 10 mayo 2019. Disponible en <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/8658/1/03%20AGN%20041%20TRABAJO%20DE%20GRADO.pdf>

- Quishpe, P. 2017. Evaluación de fertilización mineral y órgano/mineral con fertirriego en el cultivo de frutilla *Fragaria x ananassa* (Weston) Duchesne; variedad albión. (en línea). Quito. Consultado 10 mayo 2019. Disponible en <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/9674/1/T-UCE-0004-17.pdf>
- Ríos, R. 2018. Detección de *Escherichia coli* Y *Salmonella* spp. en fresa en la región centro norte de México. (en línea). Saltillo. Consultado 10 mayo 2019. Disponible en <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/45453/R%c3%ados%20Valad%c3%a9z%20Roberto.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rodríguez, L.; Jiménez A.; Murillo, W.; Rueda A. & Méndez. (2017) Activated Antimicrobial activity of peels and seeds of *Citrus limonia* and *Citrus sinensis* Actual Biol, Vol. 39, núm. 106
- Vélez, k (2015). Efecto de la aplicación de un recubrimiento a base de gelatina y ácido cítrico en la vida útil de las fresas (*Fragaria Vesca*). Manta. Consultado 18 enero del 2019. Disponible en <https://repositorio.ulead.edu.ec/bitstream/123456789/48/1/ULEAM-AGROIN-0005.pdf>
- Villa, C; Nieto, J & Pinzon, M. (2009). Cambios composicionales y microbiológicos asociados a ciclos sucesivos de deshidratación osmótica de tomate de árbol. Colombia. Consultado 20 enero del 2020. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v7n1/v7n1a05.pdf>

ANEXOS

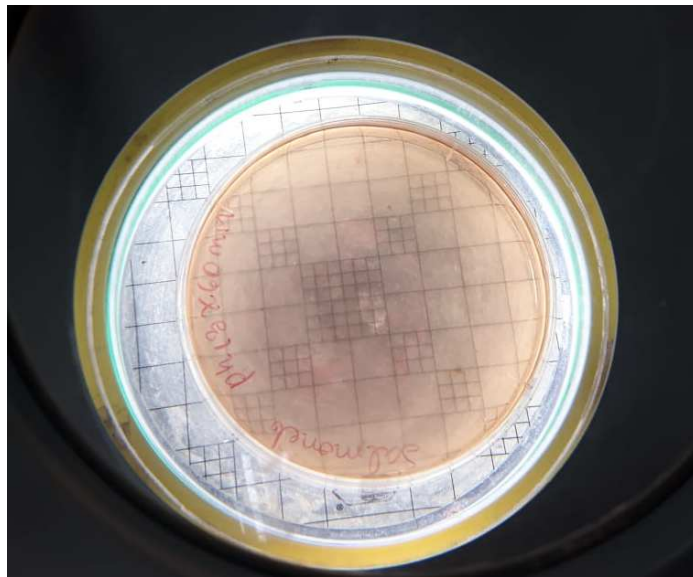
Anexo No 1 Fresas sumergidas en concentraciones de pH 11, 12 y 13



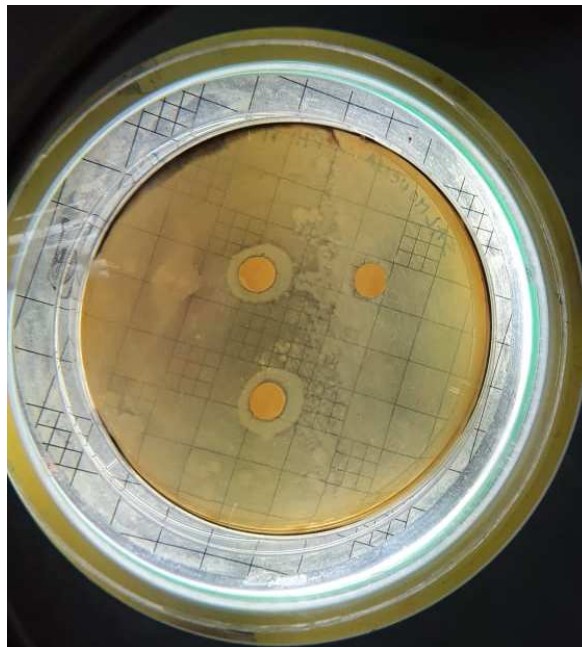
Anexo No 2 Inoculación por aspersión en hongos a una concentración de 10^4 UFC/ml y 10^5 UPC/ml



Anexo No 3 Análisis microbiológico de *Salmonella* spp a pH 13 en 60 min



Anexo No 4 Halo de inhibición en *Salmonella* spp a pH 12



Anexo N° 5 Resultado halo de inhibición *E. coli*

Análisis de la varianza

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|--------------------|----|----------------|-------------------|------|
| Halo de inhibición | 30 | 0,95 | 0,95 | 7,95 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|---------|--------|----|--------|--------|---------|
| Modelo. | 361,69 | 3 | 120,56 | 183,19 | <0,0001 |
| pH | 361,69 | 3 | 120,56 | 183,19 | <0,0001 |
| Error | 17,11 | 26 | 0,66 | | |
| Total | 378,80 | 29 | | | |

Test:Bonferroni Alfa=0,05 DMS=1,33745

Error: 0,6581 gl: 26

| pH | Medias | n | E.E. | |
|----|--------|---|------|---|
| 0 | 0,00 | 3 | 0,47 | A |
| 13 | 10,33 | 9 | 0,27 | B |
| 11 | 11,56 | 9 | 0,27 | C |
| 12 | 12,11 | 9 | 0,27 | C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Anexo N° 6 Resultado UFC *E. coli*

Análisis de la varianza

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|----------|----|----------------|-------------------|-------|
| UFC | 36 | 0,98 | 0,98 | 13,55 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|-----------|----------|----|---------|--------|---------|
| Modelo. | 29061,64 | 11 | 2641,97 | 132,28 | <0,0001 |
| pH Tiempo | 29061,64 | 11 | 2641,97 | 132,28 | <0,0001 |
| Error | 479,33 | 24 | 19,97 | | |
| Total | 29540,97 | 35 | | | |

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=13,15675

Error: 19,9722 gl: 24

| pH | Tiempo | Medias | n | E.E. | |
|------|--------|--------|---|------|-------|
| pH13 | T60 | 0,00 | 3 | 2,58 | A |
| pH12 | T20 | 2,67 | 3 | 2,58 | A B |
| pH11 | T20 | 3,33 | 3 | 2,58 | A B |
| C | T20 | 13,00 | 3 | 2,58 | A B C |
| C | T40 | 14,33 | 3 | 2,58 | B C |
| pH11 | T40 | 25,00 | 3 | 2,58 | C D |
| pH12 | T40 | 31,33 | 3 | 2,58 | D |
| C | T60 | 37,33 | 3 | 2,58 | D E |
| pH12 | T60 | 46,33 | 3 | 2,58 | E F |
| pH13 | T40 | 53,67 | 3 | 2,58 | F |
| pH11 | T60 | 77,67 | 3 | 2,58 | G |
| pH13 | T20 | 91,00 | 3 | 2,58 | H |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Anexo N° 7 Resultado halo de inhibición *Salmonella*

Análisis de la varianza

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|--------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| Halo de inhibición | 30 | 0,89 | 0,88 | 12,91 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|---------|--------|----|-------|-------|---------|
| Modelo. | 296,13 | 3 | 98,71 | 70,00 | <0,0001 |
| pH | 296,13 | 3 | 98,71 | 70,00 | <0,0001 |
| Error | 36,67 | 26 | 1,41 | | |
| Total | 332,80 | 29 | | | |

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,88090

Error: 1,4103 gl: 26

| pH | Medias | n | E.E. | |
|----|--------|---|------|---|
| 0 | 0,00 | 3 | 0,69 | A |
| 12 | 9,56 | 9 | 0,40 | B |
| 11 | 9,89 | 9 | 0,40 | B |
| 13 | 11,22 | 9 | 0,40 | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo N° 8 Resultado UFC *Salmonella*

Análisis de la varianza

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|----------|----|----------------|-------------------|-------|
| UFC | 36 | 0,96 | 0,94 | 51,73 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|-----------|---------|----|--------|-------|---------|
| Modelo. | 2750,75 | 11 | 250,07 | 51,74 | <0,0001 |
| pH Tiempo | 2750,75 | 11 | 250,07 | 51,74 | <0,0001 |
| Error | 116,00 | 24 | 4,83 | | |
| Total | 2866,75 | 35 | | | |

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,47230

Error: 4,8333 gl: 24

| pH | Tiempo | Medias | n | E.E. | |
|------|--------|--------|---|------|-----|
| pH13 | T60 | 0,00 | 3 | 1,27 | A |
| pH12 | T20 | 0,00 | 3 | 1,27 | A |
| pH13 | T40 | 0,00 | 3 | 1,27 | A |
| pH13 | T20 | 0,00 | 3 | 1,27 | A |
| pH12 | T40 | 0,33 | 3 | 1,27 | A |
| pH12 | T60 | 0,33 | 3 | 1,27 | A |
| pH11 | T40 | 0,67 | 3 | 1,27 | A |
| pH11 | T60 | 1,00 | 3 | 1,27 | A |
| pH11 | T20 | 3,33 | 3 | 1,27 | A B |
| C | T20 | 4,67 | 3 | 1,27 | A B |
| C | T40 | 8,67 | 3 | 1,27 | B |
| C | T60 | 32,00 | 3 | 1,27 | C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo N° 9 Resultado halo de inhibición *Rhizopus*

Análisis de la varianza

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|--------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| Halo de inhibición | 30 | 0,76 | 0,74 | 19,95 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|---------|--------|----|--------|-------|---------|
| Modelo. | 336,74 | 3 | 112,25 | 28,00 | <0,0001 |
| pH | 336,74 | 3 | 112,25 | 28,00 | <0,0001 |
| Error | 104,22 | 26 | 4,01 | | |
| Total | 440,97 | 29 | | | |

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,17110

Error: 4,0085 gl: 26

| pH | Medias | n | E.E. | |
|----|--------|---|------|---|
| 0 | 0,00 | 3 | 1,16 | A |
| 13 | 11,00 | 9 | 0,67 | B |
| 11 | 11,00 | 9 | 0,67 | B |
| 12 | 11,44 | 9 | 0,67 | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo N° 10 Resultado UFC *Rhizopus*

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|----------|----|----------------|-------------------|------|
| UFC | 12 | 0,99 | 0,99 | 8,03 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|---------|----------|----|----------|--------|---------|
| Modelo. | 70555,58 | 3 | 23518,53 | 304,78 | <0,0001 |
| pH | 70555,58 | 3 | 23518,53 | 304,78 | <0,0001 |
| Error | 617,33 | 8 | 77,17 | | |
| Total | 71172,92 | 11 | | | |

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=22,96880

Error: 77,1667 gl: 8

| pH | Medias | n | E.E. | |
|----|--------|---|------|---|
| 13 | 24,00 | 3 | 5,07 | A |
| 12 | 76,33 | 3 | 5,07 | B |
| 11 | 105,00 | 3 | 5,07 | C |
| 0 | 232,33 | 3 | 5,07 | D |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo N° 11 Resultado halo de inhibición *Botrytis*

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|--------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| HALO DE INHIBICION | 12 | 0,97 | 0,95 | 14,03 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|---------|--------|----|-------|-------|---------|
| Modelo. | 240,25 | 3 | 80,08 | 73,92 | <0,0001 |
| PH | 240,25 | 3 | 80,08 | 73,92 | <0,0001 |
| Error | 8,67 | 8 | 1,08 | | |
| Total | 248,92 | 11 | | | |

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,72148

Error: 1,0833 gl: 8

| PH | Medias | n | E.E. | |
|----|--------|---|------|-----|
| 0 | 0,00 | 3 | 0,60 | A |
| 11 | 8,00 | 3 | 0,60 | B |
| 12 | 10,00 | 3 | 0,60 | B C |
| 13 | 11,67 | 3 | 0,60 | C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo N° 12 Resultado UFC *Botrytis*

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|----------|----|----------------|-------------------|------|
| UFC | 12 | 0,99 | 0,98 | 7,29 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|---------|----------|----|----------|--------|---------|
| Modelo. | 61985,58 | 3 | 20661,86 | 224,79 | <0,0001 |
| pH | 61985,58 | 3 | 20661,86 | 224,79 | <0,0001 |
| Error | 735,33 | 8 | 91,92 | | |
| Total | 62720,92 | 11 | | | |

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=25,06805

Error: 91,9167 gl: 8

| pH | Medias | n | E.E. | |
|----|--------|---|------|---|
| 13 | 47,00 | 3 | 5,54 | A |
| 12 | 101,00 | 3 | 5,54 | B |
| 11 | 134,67 | 3 | 5,54 | C |
| 0 | 243,67 | 3 | 5,54 | D |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)