



**UTMACH**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD**

**CARRERA DE ALIMENTOS**

**Efecto de la aplicación de nanopartículas de iones de cobre sobre el crecimiento de *Fusarium* sp proveniente de la piña.**

**CUENCA CUENCA MICHAEL ANDRES  
INGENIERO EN ALIMENTOS**

**MEDINA SANTOS JOSEPH VINICIO  
INGENIERO EN ALIMENTOS**

**MACHALA  
2022**



**UTMACH**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD**

**CARRERA DE ALIMENTOS**

**Efecto de la aplicación de nanopartículas de iones de cobre sobre el crecimiento de *Fusarium* sp proveniente de la piña.**

**CUENCA CUENCA MICHAEL ANDRES  
INGENIERO EN ALIMENTOS**

**MEDINA SANTOS JOSEPH VINICIO  
INGENIERO EN ALIMENTOS**

**MACHALA  
2022**



**UTMACH**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD**

**CARRERA DE ALIMENTOS**

**TRABAJOS EXPERIMENTALES**

**Efecto de la aplicación de nanopartículas de iones de cobre sobre el crecimiento de *Fusarium* sp proveniente de la piña.**

**CUENCA CUENCA MICHAEL ANDRES  
INGENIERO EN ALIMENTOS**

**MEDINA SANTOS JOSEPH VINICIO  
INGENIERO EN ALIMENTOS**

**AYALA ARMIJOS JOSE HUMBERTO**

**MACHALA  
2022**

# EFECTO DE LA APLICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE IONES DE COBRE SOBRE EL CRECIMIENTO DE FUSARIUM SP PROVENIENTE DE LA PIÑA

*por* Michael Andrés Cuenca Cuenca

---

**Fecha de entrega:** 09-sep-2022 10:44a.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 1887509382

**Nombre del archivo:** CUENCA\_-\_MEDINA\_TESIS\_FINAL.pdf (3.71M)

**Total de palabras:** 15330

**Total de caracteres:** 76753

# EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE IONES DE COBRE SOBRE EL CRECIMIENTO DE FUSARIUM SP PROVENIENTE DE LA PIÑA

## INFORME DE ORIGINALIDAD

1 %

INDICE DE SIMILITUD

1 %

FUENTES DE INTERNET

0 %

PUBLICACIONES

0 %

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1

[issuu.com](https://www.issuu.com)

Fuente de Internet

<1 %

2

Submitted to Universidad Nacional José María Arguedas

Trabajo del estudiante

<1 %

3

Submitted to City University of New York System

Trabajo del estudiante

<1 %

4

Submitted to Universidad Del Magdalena

Trabajo del estudiante

<1 %

5

[repositorio.unh.edu.pe](https://repositorio.unh.edu.pe)

Fuente de Internet

<1 %

6

Théo Lemaire, Elena Vicari, Esra Neufeld, Niels Kuster, Silvestro Micera. "Mechanistic modeling suggests that low-intensity focused ultrasound can selectively recruit myelinated or unmyelinated nerve fibers", Cold Spring Harbor Laboratory, 2020

<1 %

---

7	<a href="https://repositorio.uta.edu.ec">repositorio.uta.edu.ec</a> Fuente de Internet	<1 %
8	Matías Marín Falco. "Estudio de la heterogeneidad regulatoria en cáncer y sus implicaciones en la medicina personalizada", Universitat Politecnica de Valencia, 2021 Publicación	<1 %
9	<a href="https://pesquisa.bvsalud.org">pesquisa.bvsalud.org</a> Fuente de Internet	<1 %
10	<a href="https://catarina.udlap.mx">catarina.udlap.mx</a> Fuente de Internet	<1 %
11	<a href="https://lidisuvige.tk">lidisuvige.tk</a> Fuente de Internet	<1 %
12	<a href="https://repository.uamerica.edu.co">repository.uamerica.edu.co</a> Fuente de Internet	<1 %
13	<a href="https://www.campusvirtualesp.org">www.campusvirtualesp.org</a> Fuente de Internet	<1 %

---

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias

Apagado

Excluir bibliografía

Activo

## CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

Los que suscriben, CUENCA CUENCA MICHAEL ANDRES y MEDINA SANTOS JOSEPH VINICIO, en calidad de autores del siguiente trabajo escrito titulado Efecto de la aplicación de nanopartículas de iones de cobre sobre el crecimiento de *Fusarium sp* proveniente de la piña., otorgan a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tienen potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

Los autores declaran que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

Los autores como garantes de la autoría de la obra y en relación a la misma, declaran que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asumen la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.



---

CUENCA CUENCA MICHAEL ANDRES

0704962976



---

MEDINA SANTOS JOSEPH VINICIO

0705888774

## **DEDICATORIA**

Dedico el presente trabajo de titulación en primer lugar a Dios, a mi familia, que siempre estuvo dispuesta a brindarme su apoyo incondicional, a mi papá ( Elmo) que a la distancia ha sabido apoyarme en todo momento, mis tres madres (Lorgia, Norma y Dioselina) las cuales han sido parte fundamental en todo mi proceso de formación y también a aquellas personas que han sido parte del camino que de una u otra manera me han aportado con un granito de arena para poder culminar mi carrera universitaria.

*Michael Andrés Cuenca Cuenca*

A mis padres, por ser mi ejemplo a seguir y estar siempre pendiente de mi preparación. A mi hermano por ser quien me motiva ser un ejemplo de seguir para él. A mis abuelos, por ser quienes me han formado mentalmente. A mis tíos, familiares y amigos que siempre estuvieron apoyándome. A Angie, por ser la persona que me ha acompañado durante todo este trayecto y ser pieza fundamental para llegar a la culminación de esta etapa.

*Joseph Vinicio Medina Santos*



## **AGRADECIMIENTO**

Le damos gracias a Dios por guiarnos durante esta etapa de preparación académica, iluminando nuestro camino en todo momento para poder llegar a cumplir nuestra meta soñada.

A nuestro tutor, Ing. Humberto Ayala Armijos, por habernos brindado su apoyo y conocimiento a lo largo de todo el proceso de investigación. De igual manera, al Dr. Hugo Romero Bonilla, quien con sus enseñanzas supo establecer el punto de partida de todo este proceso investigativo.

Un especial agradecimiento al Ing. Edison Jaramillo y a la Ing. Ivanna Tuz por su predisposición a permitirnos el desarrollo práctico en sus laboratorios.

A nuestros queridos compañeros por todas aquellas ocasiones, en las que de una u otra forma, su ayuda nos permitió llegar hasta aquí.

A la plantilla docente con la que hemos compartido aulas durante los cinco años de carrera.

*Michael Andrés Cuenca Cuenca*

*Joseph Vinicio Medina Santos*

## RESUMEN

Los controles fitosanitarios para mejorar la producción agrícola han evolucionado con el pasar del tiempo, debido a que cada vez los microorganismos patógenos tienden a generar resistencia ante los fungicidas tradicionales, reduciendo el efecto del fungicida. El cobre ha sido utilizado desde la antigüedad para el control de bacterias y hongos, y en la actualidad muchos fungicidas tienen como compuesto activo al cobre, la diferencia radica en la presentación del mismo, como sal, sulfatos, óxidos o nanopartículas.

Las nanopartículas de metales en la industria agrónoma son de mucha consideración debido a que tienen un mejor efecto que los metales en tamaño tradicionales, necesitando menores concentraciones y reduciendo así el efecto adverso que pueden tener sobre la salud y el ambiente. Nanopartículas de cobre han tenido resultados exitosos como agentes fungistáticos y fungicidas contra diversos hongos patógenos, y especialmente con el género *Fusarium*, con análisis realizados bajo condiciones *in vitro*.

Por lo tanto, esta investigación se enfocó en analizar el efecto que tienen las nanopartículas de iones cobre sobre *Fusarium sp* procedente de piñas *Ananas comosus* L, específicamente del cultivar comercial MD-2, para determinar su efecto como posible método para inhibir al hongo. Para el desarrollo de la misma, se trabajó con piñas degradadas en la postcosecha para aislar las cepas de hongos, detectar la presencia de *Fusarium sp* y analizar los efectos que tiene sobre la calidad general de la piña.

Posteriormente, con las cepas aisladas se procedió a analizar su comportamiento frente a la presencia de 3 concentraciones (3, 6 y 9 ppm) de nanopartículas de cobre en agar PDA. Para analizar el efecto de las soluciones de cobre como posible inhibidor de *Fusarium sp* en piña, se realizó un diseño 3x3 con concentraciones y tiempo de 3, 6 y 9, ppm y minutos, respectivamente. Como punto final se analizó la cantidad de cobre residual que está presente en las piñas luego de realizar la desinfección, mediante espectroscopía de absorción atómica.

Los efectos de la presencia de *Fusarium sp* sobre las piñas fueron; pérdida de firmeza, exudado, pardeamiento de la corteza, manchas en la pulpa y pedúnculo degradado, siendo el primero efecto el más evidente entre los encontrados. La aplicación de nanopartículas de ion cobre como parte de la composición de agar PDA, logró inhibir hasta en un 50,7%

empleando 9 ppm de cobre. Mientras que las siembras realizadas de las piñas desinfectadas declaran la presencia de  $0,5 \times 10^3$  UFC/ml a los 5 días de haber sido tratadas con 9 ppm de cobre durante 9 minutos. Teniendo un residual de cobre menor a 1 ppm en todas las muestras analizadas. De modo que las concentraciones y metodología aplicadas sí logran tener un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de *Fusarium sp*, sin embargo, su efecto es únicamente fungistático.

**Palabras clave:** Nanopartículas, cobre, *Fusarium*, postcosecha, inhibición.

## ABSTRACT

Phytopathological controls to improve agricultural production have evolved over time, due to the fact that pathogenic microorganisms have become resistant to traditional fungicides, reducing its effect. Copper has always been used to control bacteria and fungi, and many fungicides have copper as its active compound, the difference is the copper's presentation, as salt, sulfates, oxides or nanoparticles.

Metal nanoparticles are important in the agronomic industry because they have a better effect than metal traditional size, requiring a lower concentration and reducing the adverse effect that metal may have on health and the environment. Copper nanoparticles have had successful results as fungistatic and fungicidal agents against various fungi genus pathogens, *Fusarium* is one, by in vitro conditions.

Therefore, this research focused on analyzing the effect of copper ion nanoparticles on *Fusarium* sp from pineapples *Ananas comosus* L, specifically the commercial cultivar MD-2, to determine its effect as an inhibitory agent of fungal growth. For the development of this study, post-harvest degraded pineapples were used to isolate the fungal strains, detect the presence of *Fusarium* sp and analyze its effects on the overall quality of the pineapple.

Subsequently, with the isolated strains we proceeded to analyze their behavior in the presence of 3 concentrations (3, 6 and 9 ppm) of copper nanoparticles on PDA agar. To analyze the effect of copper solutions as a possible inhibitor of *Fusarium* sp in pineapple, a 3x3 design was carried out with concentrations and time of 3, 6 and 9, ppm and minutes, respectively. Finally, the amount of residual copper present in the disinfected pineapples was analyzed by atomic absorption spectroscopy.

*Fusarium* sp on pineapples causes loss of firmness, exudate, rind browning, pulp staining and stalk degradation, the first effect being the most evident among those found. The application of copper ion nanoparticles as part of the PDA agar composition of, managed to inhibit up to 50.7% using 9 ppm of copper. While the sowings carried out on disinfected pineapples showed the presence of  $0.5 \times 10^3$  UFC/ml 5 days after being treated with 9 ppm of copper for 9 minutes. Having a copper residual of less than 1 ppm in all the samples analyzed. Thus, the concentrations and methodology applied do managed to have an

inhibitory effect on the development of *Fusarium sp*, however, its effect is only fungistatic.

**Key words:** Nanoparticles, copper, *Fusarium*, post-harvest, inhibition.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
JUSTIFICACIÓN	19
OBJETIVOS	20
Objetivo general:	20
Objetivos específicos:	20
1. MARCO TEÓRICO	21
1.1. Piña	21
1.1.1 Taxonomía	21
1.1.2 Descripción botánica	21
1.1.3 Variedades	22
1.1.4 Condiciones climatológicas	23
1.2 Producción interna de piña	23
1.3 Normativa Ecuatoriana para la piña fresca	23
1.4 Problemas fitosanitarios	24
1.4.1 Fusariosis	25
1.5 Fungicidas utilizados en periodo de postcosecha	25
1.6 Generalidades del cobre	26
1.6.1 Antecedentes del consumo del cobre	26
1.6.2 Presencia del cobre en los alimentos	26
1.7 Nanotecnología en la industria alimentaria	27
1.7.1 Características de las nano partículas ionizadas de cobre	27
1.7.2 Actividad antimicrobiana y fungicida de nanopartículas de cobre	28
1.8 Importancia del cobre en la dieta humana	28
2. METODOLOGÍA	30
2.1 Localización	30
2.2 Materia prima	30
2.3 Presencia y efecto de <i>Fusarium sp</i> en la calidad de las piñas	30
2.3.1 Aislamiento de cepas	30
2.3.2 Tinción de placas	31
2.3.3 Identificación del efecto de <i>Fusarium sp</i> en piñas	31

2.3.4 Preparación de las muestras de estudio	31
2.3.5 Inoculación del hongo	31
2.3.6 Evidencia del efecto del hongo	32
2.4 Cuantificar el efecto de la solución de nanopartículas de iones cobre sobre el crecimiento de <i>Fusarium sp.</i>	32
2.4.1 Preparación de soluciones de nanopartículas de cobre	32
2.4.2 Efecto in vitro	33
2.4.2.1 Elaboración de cultivo	33
2.4.2.2 Siembra de hongo	34
2.4.2.3 Cálculo del porcentaje de inhibición	34
2.4.3 Efecto sobre las piñas	35
2.4.3.1 Desinfección de piña por inmersión.	35
2.4.3.2 Toma de muestra	35
2.4.3.3 Siembra en Petrifilm ®	36
2.5 Cuantificación de iones cobre residuales	36
2.5.1 Preparación de muestras	36
2.6 Análisis de datos	38
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>39</b>
3.1 Presencia y el efecto de <i>Fusarium sp</i> en la calidad de las piñas	39
3.1.1 Presencia de <i>Fusarium sp</i> en piñas postcosecha	39
3.1.2 Efecto del <i>Fusarium sp</i> en la calidad de las piñas	40
3.2 Determinación del efecto de la solución de nanopartículas de iones cobre sobre el crecimiento de <i>Fusarium sp. in vitro.</i>	42
3.2.1. Comparación del crecimiento de <i>Fusarium sp, in vitro</i> , frente a tratamientos con iones cobre.	42
3.2.2. Análisis estadístico de varianza ANOVA	44
3.2.3. Análisis estadístico de diferencias entre tratamientos.	45
3.3 Efecto de la solución de nanopartículas de iones cobre sobre el crecimiento de <i>Fusarium sp</i> en piñas.	47
3.3.1. Comportamiento de de <i>Fusarium sp</i> en piña post cosecha	47
3.3.2. Análisis de varianza ANOVA	49
3.3.3. Prueba de Múltiple rangos	50
3.3.4. Índice de madurez y afección de pedúnculo en piñas desinfectadas	52
3.4 Cobre residual en piñas desinfectadas	54
<b>4. CONCLUSIONES</b>	<b>56</b>

BIBLIOGRAFÍA

57

ANEXOS

64



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Piña MD-2 (inen, 2016)	22
<b>Figura 2.</b> Índice de madurez de la piña (inen, 2016)	24
<b>Figura 3.</b> Tipos de nanomateriales en la industria alimentaria	27
<b>Figura 4.</b> Aislamiento de diferentes hongos	39
<b>Figura 5.</b> Aislamiento de <i>fusarium sp</i>	39
<b>Figura 6.</b> Vista microscópica x100 <i>fusarium sp</i>	40
<b>Figura 7.</b> Efecto del <i>fusarium sp</i> en piñas	41
<b>Figura 8.</b> Piña de control.	41
<b>Figura 9.</b> Crecimiento <i>in vitro</i> de <i>fusarium sp</i> en presencia de cobre	42
<b>Figura 10.</b> Actividad antifúngica de nanopartículas de iones de cobre.	46
<b>Figura 11.</b> Colonias de <i>fusarium sp</i> en piñas post cosecha día 0	47
<b>Figura 12.</b> Colonias de <i>fusarium sp</i> en piñas post cosecha día 5	47
<b>Figura 13.</b> Colonias de <i>fusarium sp</i> en piña, día 0	50
<b>Figura 14.</b> Colonias de <i>fusarium sp</i> en piña, día 5	50
<b>Figura 15.</b> Madurez de piñas desinfectadas (a) control; (b) 3 ppm (c ) 6 ppm (d) 9 ppm. De izquierda a derecha 3, 6, 9 minutos de inmersión	52
<b>Figura 16.</b> Pedúnculo de piñas desinfectadas (a) control; (b) 3 ppm (c ) 6 ppm (d) 9 ppm. De izquierda a derecha 3, 6, 9 minutos de inmersión	53
<b>Figura 17.</b> Cobre residual presente en las piñas analizadas	54

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Variedades de piñas comerciales	22
<b>tabla 2.</b> Lista de alimentos con mayor concentración de cobre	26
<b>tabla 3.</b> Cantidad para preparación de medio de cultivo.	33
<b>tabla 4.</b> Diseño de tratamientos	35
<b>tabla 5.</b> Análisis de varianza anova para crecimiento de micelios	44
<b>tabla 6.</b> Prueba de kruskal-wallis para concentraciones.	44
<b>tabla 7.</b> Pruebas de múltiple rangos para concentración de iones cobre	45
<b>tabla 8.</b> Análisis de varianza para ufc de <i>fusarium sp</i> día 0	49
<b>tabla 9.</b> Análisis de varianza para ufc de <i>fusarium sp</i> día 5	49
<b>tabla 10.</b> Heterogeneidad entre medias de tratamientos	51

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
<b>Anexo A.</b> Obtención de micelios de fusarium sp.	64
<b>Anexo B.</b> Análisis in vitro	65
<b>Anexo C.</b> Desinfección de piñas	66
<b>Anexo D.</b> Digestión ácida	67
<b>Anexo E.</b> Análisis estadísticos	68

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**FAO:** Food and Agriculture Organization of the United Nations/Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

**INEN:** Servicio Ecuatoriano de Normalización

**MD-2:** Tipo es un híbrido conocido como “Honey Golden”, “Golden Sweet” o “piña miel”, resultado de una mezcla compleja de variedades

**NNI:** National Nanotechnology Initiative

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PDA:** Agar Papa Dextrosa

**ppm:** partes por millón, es una medida de concentración

**QP:** Químicamente puro

**sp:** quiere decir especie o especie de

**UFC:** Unidades Formadoras de Colonias

## INTRODUCCIÓN

El cobre (Cu) es un metal presente en la naturaleza y que cumple un rol elemental en los seres vivos, realizando numerosas actividades metabólicas dentro de nuestro organismo tal como la formación de eritrocitos, el mantenimiento de los vasos sanguíneos, ayuda al sistema inmune y cuidado de huesos. Todas estas funciones son necesarias lo que hace que este oligoelemento sea esencial para la vida; siendo importante el consumo de alimentos portadores de cobre debido a que nuestro cuerpo no genera cobre (Zárate, 2022).

Los países que son productores y exportadores de Cu, siendo los principales Chile, Perú, China y Estados Unidos, tienen muy claro que proyectos donde incluyan el uso de cobre benefician en gran medida a su economía interna, debido a que genera ingresos económicos al país; gobiernos suelen optar por invertir en proyectos de investigación que luego vayan a generar flujo monetario, siempre y cuando se mantenga el equilibrio económico-ambiental (Donoso, 2013)

Según Pariona *et al.* (2018), el uso de metales en la industria agrónoma es muy común, tienen un futuro prometedor por su aplicación como fotocatalizadores para la eliminación de pesticidas, o herbicidas, incluso tienen comportamiento bactericida para diferentes microorganismos como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, y fungicida para hongos fitopatógenos del género *Fusarium sp*; empleando metales como Ag, Fe, Zn, Mg, Ti y principalmente Cu, compuesto activo de muchos fungicidas comerciales; mismos que pueden estar presentes en los fungicidas en diferentes presentaciones.

No obstante, algunas presentaciones de Cu son reguladas y limitadas debido a que pueden afectar a los microorganismos de beneficio; por tal, se analizan la inserción de nanopartículas de Cu debido a que su pequeño tamaño permite tener mejores resultados con menor riesgo de causar algún efecto no deseado, necesitando menores concentraciones (López y Ataucuri, 2017).

Por lo tanto, es importante analizar el nivel de efectividad que tienen las nanopartículas de cobre para inhibir el crecimiento y desarrollo de microorganismos patógenos como los hongos.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad, la producción de alimentos tiende a no ser consumida debido a la pérdida por la acción de patógenos, animales o plagas, siendo la pérdida cerca del 40%, problema que tiene una gran incidencia en la estabilidad de la seguridad alimentaria; las enfermedades postcosecha son las que más producen pérdidas en productos hortícolas, causados por la acción de hongos y bacterias, microorganismos que si no se controlan terminan con la podredumbre del producto (Matrose *et al.*, 2021).

Los alimentos más afectados son las verduras y frutas, ya sea para consumo local o internacional, estos tienden a ser susceptibles al efecto de enfermedades producidas por microorganismos patógenos, causando grandes pérdidas económicas para el sector productivo; algunos hongos causantes de aquello incluso han desarrollado resistencia a la aplicación de fungicidas; hongos de los géneros *Penicillium spp*, *Phyllosticta spp* y *Guignardia spp* son ejemplos de patógenos (Gutierrez y Cornejo, 2017).

Fusariosis es un tipo de infección de carácter patógeno que tiene un amplio espectro de afectación, siendo el género *Fusarium sp* responsable por todos los daños atribuidos a esta enfermedad, las plantaciones que son afectadas generan grandes pérdidas a nivel mundial. (Batista *et al.*, 2020). La piña es una de las frutas afectadas por esta enfermedad, se estima que las pérdidas del fruto van entre un 30 a 40 % y en 20% en cuanto a plantaciones, para los países productores de piña que presentan esta enfermedad es un problema muy grave al momento de exportar a mercados de América Central, África y Asia debido a los altos controles que hay (Carnielli *et al.*, 2019).

En Ecuador, el informe de piña producida en el año 2021, emitido por la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (AGROCALIDAD), declaró que se produjo 99940 toneladas de piña, exportadas a 18 destinos a nivel mundial, entre ellos Chile, Estados Unidos, Argentina, Países Bajos, Alemania, Nueva Zelanda y Rusia; teniendo un incremento del 17% con respecto al año anterior. Actualmente se cuentan registrados 36 sitios de producción y 100 centros de acopio, 6 de estos últimos están en la provincia de El Oro (AGROCALIDAD, 2021).

Al cobre (Cu) se lo ha empleado desde hace ya varios años como un ingrediente principal para la formulación de fungicidas, debido a que presenta propiedades en contra del

crecimiento microbiano, especialmente contra organismos patógenos, efectivo contra *Fusarium sp.* Sin embargo, muchos fungicidas no tienen un buen desempeño y tienden a no tener eficiencia al aplicarse. Es por ello que el Cu se presenta en las formulaciones de distintas formas, sulfatos, óxidos, iones, entre otros, causando diferentes resultados entre sí (Shang *et al.*, 2021).

Por tal motivo, el problema de esta investigación es la no declaración del efecto de aplicar soluciones de nanopartículas de iones Cu como un método para el control del crecimiento del hongo *Fusarium sp* que proveniente de piñas.

## JUSTIFICACIÓN

El uso de fungicidas en la industria agrícola permite tener mayores porcentajes de producción de los sembríos, minimizando pérdidas y favoreciendo directamente a la industria alimentaria con el sustento de materia prima; los fungicidas pueden ser de amplio espectro o específicos para alguna especie de patógeno en cuestión (Carmona y Sautua, 2018). El cobre ha sido usado como antimicrobiano desde el año 2000 a.C. hasta la actualidad, siendo pieza clave en los fungicidas inorgánicos que buscan detener el crecimiento, y por ende enfermedades, causadas por patógenos (López *et al.*, 2021).

Autores como Khatami *et al.* (2019) describen que se puede tener un efecto inhibitorio sobre *F. solani* de hasta 90% empleando soluciones de nanopartículas de óxido de cobre (CuO), al aplicar 50 ppm del componente, mientras que con 5 ppm se obtuvo un efecto inhibitorio de 20%. Mientras que, Pham *et al.* (2019) declaran que, al emplear concentraciones de 30 ppm de cobre pueden tener una completa inhibición de *F. oxysporum* a los 3 días de incubación, lo mismo con 7 ppm sobre *Phytophthora capsici* al primer día.

Por lo antes expuesto, la investigación tiene como fin determinar el efecto que tienen las nanopartículas de iones cobre contra *Fusarium sp.* identificado en piña, como un desinfectante para la conservación de piña producida localmente.



## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general:**

Determinar el efecto de nanopartículas de iones cobre para el control de *Fusarium sp*, mediante su aplicación como desinfectante en piñas durante la postcosecha, para disminuir las pérdidas de producción por degradación fúngica.

### **Objetivos específicos:**

- Evidenciar la presencia y el efecto de *Fusarium sp* en la calidad de las piñas
- Determinar el efecto de la solución de nanopartículas de iones cobre contra *Fusarium sp*.
- Determinar la concentración residual de cobre en la cáscara de muestras de piña postcosecha.

# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Piña

#### 1.1.1 Taxonomía

Según Chen *et al.* (2018), la piña, como es conocida coloquialmente, científicamente se llama *Ananas comosus*, y se clasifica de la siguiente manera:

**Orden:** *Bromeliales*

**Familia:** *Bromeliaceae*

**Género:** *Ananas*

**Especie:** *comosus*

Mencionan también que, existen 56 géneros y más de 2794 especies dentro de la Familia *Bromeliaceae* y que el origen de la piña yace de la tierra Guayana, al noroeste de América del Sur.

#### 1.1.2 Descripción botánica

Todo este apartado se describe según lo explicado por Garcidueñas (2013), en donde menciona que, la piña es una herbácea que tiende a vivir durante más de dos años logrando hasta dos etapas de producción, acción que se lleva a cabo a partir de los nuevos brotes de las yemas. Debido al tipo de florecimiento de la planta, la inflorescencia, la piña es una fruta que nace a partir de varias flores fecundadas, por lo tal es considerada como una fruta múltiple, he ahí la razón de su apariencia física como un conjunto de hexágonos múltiples. La planta pueden medir de 1 a 2 m de altura y en de ancho 1 m, con múltiples hojas alrededor que logran crear el espacio de protección para la planta.

El tallo es de apariencia firme, con una altura promedio de 37,5 cm y un diámetro que va desde los 2 a 8 cm en toda su extensión; las hojas pueden llegar a ser hasta 80 unidades por planta, tienen la característica de ser semirrígidas, gracias a su forma de semiluna; la longitud varía de 20 cm hasta los 160 cm para las más jóvenes; las flores pueden ser de 50 a 200 por proceso de producción, mismas que formarán un único fruto y están

conectadas al pedúnculo; la corona contiene pequeñas hojas que brindan protección al fruto comestible, todo lo antes mencionado varía dependiendo de la variedad de piña, las condiciones climatológicas y la calidad de suelo en la que esté sembrada (Garcidueñas, 2013).



**Figura 1.** Piña MD-2 (INEN, 2016)

### 1.1.3 Variedades

La alta demanda de las piñas en la industria alimentaria y la afectación de plagas y enfermedades, ha hecho que los científicos desarrollen nuevas variedades de piñas, conocidas como clones o híbridos. Empezando, con la mezcla de genes de piñas existentes, proyectos desarrollados en el año 1914 por parte de la Asociación de Productores de Piña de Hawái (Garcidueñas, 2013). Zambrano y Merchan (2019), mencionan que las principales variedades de piña son las que están detalladas en la tabla 1.

**Tabla 1.** Variedades de piñas comerciales

<b>Variedad</b>	<b>Características</b>
<b>Cayena lisa</b>	Variedad considerada industrial por su alto rendimiento, puede pesar de 1.5 a 2.5 kg; la pulpa tiene un color amarillo pálido; 13 a 19 °Brix; ácida para el consumidor.
<b>Española Roja</b>	Hojas pequeñas y cortas; el fruto es mediano, como un barril, color de corteza amarillo-naranja.
<b>Golden Sweet o MD2</b>	Es una variedad de la Cayena lisa, tiene un elevado dulzor y el color de la pulpa es amarillo intenso, puede llegar a pesar hasta 6 libras; apetecida para el consumo directo. Es la variedad con la que se trabajará en esta investigación. Es susceptible a enfermedades
<b>Champaka</b>	También es una variedad de la Cayena lisa, es apetecida en el mercado, tiene coloración naranja rojizo en la parte externa y amarilla en la interna.

### **1.1.4 Condiciones climatológicas**

Alrededor del mundo, se pueden encontrar 30 tipos de variedades de piñas que se cultivan en diferentes condiciones de clima, por lo general en regiones de tipo tropical. Son muchos los factores que contribuyen a que la producción de la piña se pueda dar de la forma más adecuada posible. Se tiene como referencia que el rango apropiado de temperatura está entre los 18 y 32 °C; en cuanto a agua, tan sólo son necesarios 5 a 10 cm<sup>3</sup> de lluvia para poder producir correctamente; el suelo puede ser arenoso o de arcilla, con un pH desde los 4.5 hasta 6.5; altitudes que van desde 0 hasta más de 1400 msnm, todo esto hace que la piña tenga menos cuidado que algunas de las otras frutas carnosas (Wali, 2019). Razón por la cual en Ecuador se puede encontrar producción de piña durante todo el año, pudiendo ser sembrada en las diferentes regiones del país, en donde las condiciones climáticas varían unas de otras.

### **1.2 Producción interna de piña**

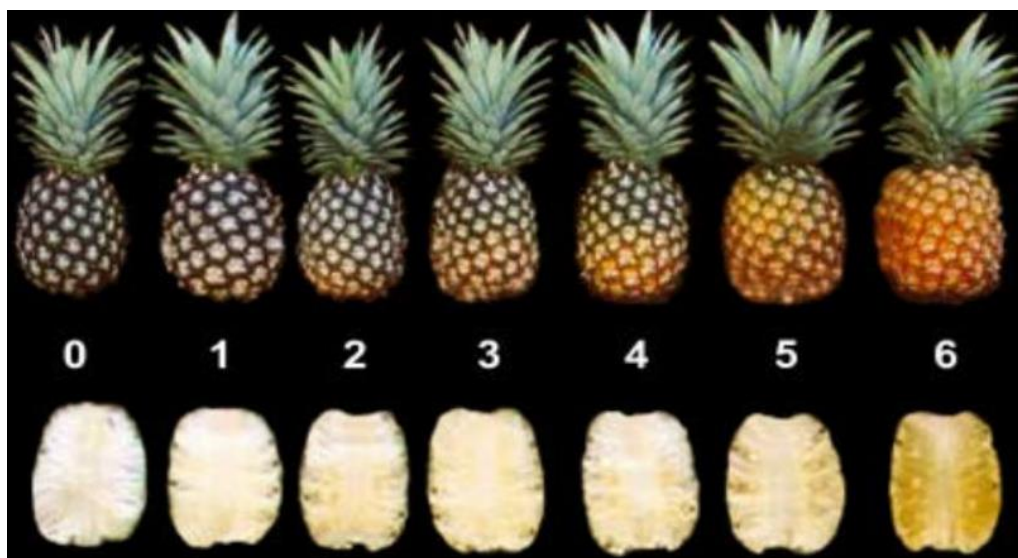
Lo bueno del cultivo de la piña es que está disponible durante todo el año en el país, existiendo una gran cantidad de materia prima para poder abastecer a todos los mercados objetivos de las empresas productoras de piña. El MAGAP (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca) establece que aproximadamente existen unas 1500 hectáreas de producción en la provincia de Guayas (Centanaro *et al.*, 2019). Por su parte, la AGROCALIDAD en su boletín informativo de producción de piña en 2021, menciona que se enviaron 99.940 toneladas hacia 18 destinos a nivel mundial, entre ellos Chile, Estados Unidos, Alemania y Rusia; en comparación con el 2020 la demanda aumentó un 17 % y que sólo en la provincia de El Oro hay 6 centros de acopio de los 100 que hay en el país (Agrocalidad, 2021)

### **1.3 Normativa Ecuatoriana para la piña fresca**

La Normativa INEN 1338-2016 establece una clasificación para la piña de acuerdo al grado de calidad de la fruta, esto va a ser muy independiente del tamaño que la misma posee, se divide en tres:

- Grado extra, las piñas no deben tener un cambio de color en la cascara causado por la maduración, deformaciones mínimas aceptables, poseer recta la corona sin ningún tipo de brotes.
- Grado I: al igual que el grado extra, además del daño en la piña no puede ser mayor al 10%.
- Grado III: sólo se admiten mínimas cicatrices o fisuras y el daño del fruto no debe sobrepasar el 20% de la piña (NTE INEN, 2016)

El estado de madurez en las piñas se determina según lo descrito por NTE INEN, 2016, menciona que existen 3 tipos de estadios, como se puede apreciar en la figura 2. El rango va de 0 a 6, donde el primer estadio es “fruta en estado verde” se encuentra en el rango de 0 a 1, seguido por el segundo de “fruta pintona” que se encuentra en el rango de 2 a 4, finalmente el tercero “fruta madura” que se encuentra en el rango de 5 a 6.



**Figura 2.** Índice de madurez de la piña (INEN, 2016)

#### **1.4 Problemas fitosanitarios**

Al igual que muchos cultivos, la piña presenta serios problemas en relación a los microorganismos que pueden afectar a su correcto desarrollo y producción, teniendo problemas con plagas, enfermedades y malezas. Estas causan diversos daños, tanto a la planta como al fruto final, dependiendo de la amenaza que se esté tratando. Siendo este el motivo principal por el cual muchos cargamentos de piña no logran llegar a su lugar de

destino, se maduran o deterioran tiempo antes del previsto, causando millonarias pérdidas económicas a quienes se dedican a este negocio (Castro y Umaña, 2017).

#### **1.4.1 Fusariosis**

El género *Fusarium sp* abarca variedad de hongos que tienen una característica diferencial en cada una de ellos, pudiendo encontrar hongos de tipo saprófitos, fitopatógenos, micotóxicos, entre otros; en lo que respecta a la piña, de tal manera que la enfermedad que producen estos hongos, fusariosis, es la mayor amenaza para las plantaciones de piña. Las variedades que se comercializan son muy débiles frente a este patógeno invasivo, sobre todo aquellos ejemplares que son destinados para la exportación. El hongo puede afectar a la fruta entera, corona, hojas, pedúnculo, rebrotes, y en el peor de los casos, afecta a la planta por completo, pudiendo estar presente en la superficie del fruto o planta durante largos periodos, incluso, empezando el daño cuando ya está en el lugar de venta (O'Donnell *et al.*, 2015).

#### **1.5 Fungicidas utilizados en periodo de postcosecha**

El periodo de postcosecha en las piñas y las frutas en general es una etapa vulnerable debido a que son propicias para que cualquier microorganismo patógeno puede atacar, es por este motivo que la mayoría de las procesadoras de frutos utilizan Tiabendazol como sustancia química, mismo que actúa como fungicida de amplio espectro, este químico se deriva del Bencimidazol y ayuda a controlar la podredumbre en el fruto ayudando a controlar la invasión de microorganismos patógenos (Murray *et al.*, 2019).

El Tiabendazol es un producto que actúa como protector y brinda una propiedad curativa al fruto, motivo por el cual este fungicida es utilizado en las plantas de acopio de fruta, especialmente en el área de lavado y desinfección. Posteriormente se aplica el químico en los tanques de agua los cuales generan un lavado a presión o tipo ducha, este proceso le va a conferir protección ante los patógenos, brillo, firmeza del fruto y finalmente va a generar una función fisiológica debido a que va a ajustar el intercambio de gases retrasando la maduración del fruto (Ortiz, 2020).

## 1.6 Generalidades del cobre

### 1.6.1 Antecedentes del consumo del cobre

El cobre es el metal con el que el ser humano ha venido trabajando desde tiempos remotos, el ser humano ha venido utilizando este tipo de material sin saber el poder antimicrobiano que posee. Luego, el hombre notó el efecto que causa este metal en los alimentos, por ejemplo, donde al utilizar utensilios y ollas de este material notaban que se conservaban de mejor manera, o en el caso de la cocción, se demostró que en vasijas de cobre los alimentos de cocinaban mucho más rápido. Todos estos procesos se han venido dando con el transcurso de la historia y es por ello que en la actualidad existen muchos estudios sobre el uso del cobre contra el combate de microorganismos patógenos (Jaramillo y Garay, 2022).

### 1.6.2 Presencia del cobre en los alimentos

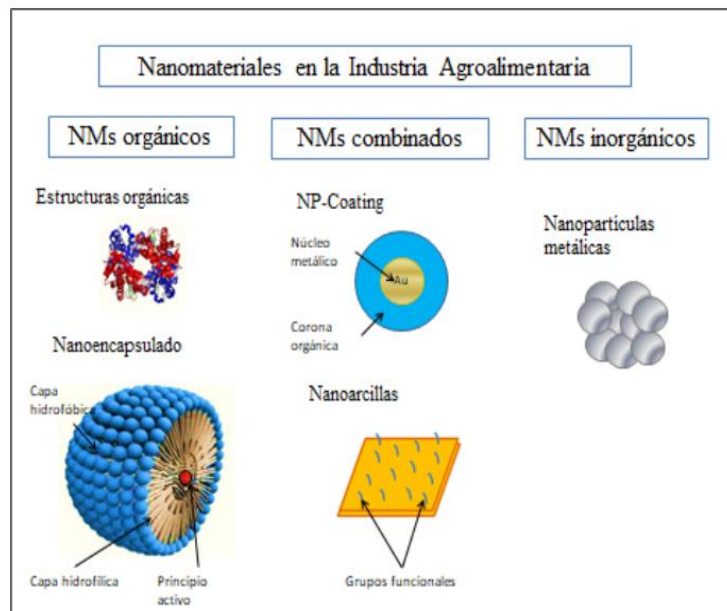
El cobre es un mineral necesario para nuestra alimentación, por este motivo se debe consumir en cantidades previamente determinadas por entidades reguladoras, FAO, OMS entre las más importantes. Si bien sabemos nuestro organismo no es capaz de poder producir este mineral por lo que obligadamente tenemos que buscarlo en los diferentes tipos de alimentos y el agua (Mehrani *et al.*, 2019). Cabe recalcar que, el cobre varía según su origen, dependiendo por ejemplo, del tipo de suelo en que son sembrados, por otro lado en las industrias lácteas utilizan recipientes de cobre lo cual va a aportar al alimento una concentración mayor de este mineral. Finalmente se puede decir que los alimentos que mayor concentración tienen de cobre son: los mariscos, los huevos, las papas, cereales, legumbres, cacao, carne, entre otros, tabla 2 (Llontop, 2016).

**Tabla 2.** Lista de alimentos con mayor concentración de cobre

<b>MARISCOS</b>	<b>VÍSCERAS</b>	<b>LEGUMBRES</b>	<b>SEMILLAS</b>	<b>VARIOS</b>
Crustáceos	Hígado	Lentejas	Maní	Cereales
Almejas	Riñones	Garbanzos	Nueces	Huevos
Ostras	Cerebro	Soya	Almendras	Integrales
				Frutos secos
				Champiñones

## 1.7 Nanotecnología en la industria alimentaria

La National Nanotechnology Initiative (NNI), define que la nanotecnología es un control y comprensión de materia hasta una escala de nanómetros, comprende una dimensión aproximadamente de 1 y 100 nanómetros donde suceden algunos fenómenos que permiten realizar actividades novedosas en los alimentos. La nanotecnología es una ciencia muy extensa la cual abarca diferentes ramas de estudio como lo es la ingeniería, la tecnología, biología, física; dividiéndose según el origen o su naturaleza de las nanopartículas, como metálicos, derivados del carbono, nano fibras o combinaciones. Todo esto con la finalidad de poder realizar actividades modernas que satisfagan las necesidades de las personas como, nano encapsulación de nutrientes, vitaminas, colorantes, elaboración de pesticidas, elaboración de fármacos, como se observa en la figura 3 (Usón, 2017).



**Figura 3.** Tipos de nanomateriales en la industria alimentaria

### 1.7.1 Características de las nano partículas ionizadas de cobre

El cobre tiene características bacteriostático y fungistático al igual que la plata, el cobre actúa como agente estático, inhibiendo el crecimiento de hongos y bacterias patógenos, sin embargo, otra característica muy importante es el valor del cobre con respecto a la plata, el cobre posee un menor precio. De forma que es una alternativa de control económica y amigable con el ecosistema, siendo necesario detallar que las nanopartículas



de cobre es un producto muy importante en industrias de plásticos, papel, pinturas, tinta, entre otros (Guajardo, 2013).

### **1.7.2 Actividad antimicrobiana y fungicida de nanopartículas de cobre**

La composición física y química del cobre ha demostrado ser efectivas ante microorganismos que se encuentran en todo tipo de superficies, es por ello que este metal se lo ha utilizado como un componente en los materiales de estructuras hospitalarias como: camas en centros de salud, manijas de puertas, componentes sanitarios, entre otros, demostrando mayor efectividad antimicrobiana a comparación del acero inoxidable y el aluminio (Gutierrez y Cornejo, 2017).

Las nanopartículas de cobre al igual que las aleaciones de plata y zinc han demostrado tener propiedades antimicrobianas, es por ello que muchos investigadores se ven a la necesidad de generar nuevos productos que causen un efecto positivo, atacando de manera eficaz a microorganismos patógenos en las frutas, todo esto se con el fin de que sea un método sustentable y amigable con el ecosistema, disminuyendo la cantidad de otros productos demasiado tóxicos al medio ambiente (Esparza, 2015).

El proceso de actividad antimicrobiana se debe a que el cobre causa la ruptura de la membrana celular al entrar en contacto con las células afectando significativamente al material genético (ADN), proteínas y lípidos causando una desnaturalización de la célula, finalmente todo este proceso se lleva a cabo sabiendo que el cobre en la célula es letal según la concentración a la que se encuentre (Jaramillo y Garay, 2022).

### **1.8 Importancia del cobre en la dieta humana**

El cobre es un oligoelemento, también conocido como elementos traza, este elemento forma parte de las cupro-proteínas y enzimas cobre dependientes las cuales su función principal es intervenir en reacciones oxidativas, por ende estas moléculas se encuentran en nuestro organismo en pequeñas cantidades (menos de 5 mg/kg) y son los encargados de realizar diferentes funciones biológicas tales como: el crecimiento, metabolismo, actividad cardiaca, sistema inmune entre otras, cabe recalcar que el déficit o el exceso en la ingesta de este oligoelemento pueden acarrear problemas de salud en las personas (Baca et al., 2015).

La cantidad de cobre que se presente en las personas adultas varía entre 50 a 120 mg, este mineral se encuentra localizado o se encuentra almacenado en partes específicas como: músculo, piel y esqueleto, es necesario recalcar que la mayor parte de la concentración están en hígado y cerebro (Taboada, 2017). Según datos de *La American Society of Parenteral and Enteral Nutrition* determinó una dosis diaria de 0,3 a 0,5 mg de cobre, este dato es muy importante ya permite realizar diversos estudios, teniendo en cuenta la cantidad máxima en la que el cuerpo humano puede ingerir este mineral ya que un exceso podría causar afecciones graves al ser humano.

## CAPÍTULO II.

### 2. METODOLOGÍA

#### 2.1 Localización

La fase experimental fue realizada en el laboratorio de Sanidad Vegetal, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y en los laboratorios de Electroquímica LI-EQ y Bioconversión LI-BC, ambos de la Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud; en la Universidad Técnica de Machala, ubicada en la ciudad de Machala, capital de la provincia de El Oro, Ecuador.

#### 2.2 Materia prima

Para la presente investigación se usó como muestra de estudio a la piña de variedad *Ananas comosus* L, específicamente del cultivar comercial MD-2 conocida como piña miel, cosechadas en una etapa de no maduración (Mercado *et al.*, 2019). Los ejemplares en buen estado de sanidad fueron obtenidos en el mercado mayorista de Machala, Todas las piñas que empleadas para esta investigación fueron seleccionadas según la norma **NTE INEN 1836 - Frutas frescas. Piña**. Bajo las siguientes especificaciones:

- Nivel de madurez: 0
- Grado: “extra”
- Peso: mediana  $1000 \leq m \leq 1500$  g (Hawaiana Champaca f-153 y MD2)
- Diámetro: mediana  $110 \leq d \leq 120$  mm (Hawaiana champaca f-153 y MD2)

#### 2.3 Presencia y efecto de *Fusarium sp* en la calidad de las piñas

Este apartado se llevó a cabo en dos instancias, primero se verificó la existencia de *Fusarium sp* y luego se determinó los efectos que tiene la presencia de este hongo sobre la calidad de la piña.

##### 2.3.1 Aislamiento de cepas

Castro y Umaña, (2017), mencionan que, en la superficie de las piñas hay una gran diversidad de hongos, por lo que en esta investigación se tomó en cuenta dicha afirmación y se aislaron y purificaron 5 tipos de hongos provenientes de la piña. Mismos que fueron sembrados en agar Papa Dextrosa Agar, de aquí en adelante PDA, se siguió la

metodología, con variaciones, propuesta por Umaña *et al.* (2018), se tomó una muestra superficial de la fruta contaminada para depositarla sobre agar PDA adicionado con cloranfenicol para inhibir el crecimiento bacteriano.

### **2.3.2 Tinción de placas**

Para poder hacer la identificación microscópica se preparó un frotis siguiendo la metodología de López *et al.* (2014), se colocó azul de lactofenol sobre un portaobjeto, y con la ayuda de un asa esterilizada, se procedió a retirar una muestra del micelio presente en la placa de aislamiento, para depositarla sobre la gota antes mencionada; finalmente se observó en el microscopio la estructura que presenta el hongo para determinar a qué género corresponde.

### **2.3.3 Identificación del efecto de *Fusarium sp* en piñas**

Con la finalidad de observar el efecto de *Fusarium sp* sobre la calidad de la piña se evaluaron de manera cualitativa varios atributos (textura, color, aroma y defectos).

### **2.3.4 Preparación de las muestras de estudio**

A fin de reducir microorganismos de competencia en la superficie de las muestras, estas fueron higienizadas, eliminando corona, restos de pedúnculo y toda materia extraña, además, se lavaron las piñas con una solución desinfectante de grado alimentario, y finalmente, se realizó una inmersión en alcohol de 99° GL durante 3 minutos, realizando movimientos rotativos para que el alcohol esté en contacto permanente con toda la superficie. Se dejó reposar las piñas en la cámara de flujo laminar con luz natural y ventilación durante 15 minutos para evaporar el alcohol excedente en las piñas (Rivera, 2014).

### **2.3.5 Inoculación del hongo**

Se usará el método descrito por Rivera (2014). Este método requiere de la desinfección de la cámara de flujo laminar en la cual se trabajó, se roció alcohol de 99° GL en toda la superficie y con la ayuda de un algodón se limpió el área de trabajo, logrando así eliminar cualquier presencia microbiológica extraña que esté presente. Además, durante la inoculación de los micelios del hongo en las piñas, se utilizaron instrumentos esterilizados (sacabocado y pinza). La piña, limpia, lavada y desinfectada, fue colocada dentro de la

cámara de flujo laminar y con la ayuda del sacabocado se tomó una muestra de las placas con el hongo aislado, *Fusarium sp.*, para colocarlo en la superficie de la piña, repitiendo el procedimiento en otro lugar paralelo al primero ya inoculado, uno cerca de la corona y el otro cerca del pedúnculo. Se dejó una piña sin inocular, como muestra testigo. Se hizo la misma metodología en 8 piñas para tener mejores resultados.

Las piñas inoculadas se almacenaron en una cámara húmeda, lugar donde el hongo pudo crecer bajo las condiciones de humedad y temperatura ambiente, durante un periodo mínimo de 4 días.

### **2.3.6 Evidencia del efecto del hongo**

Se evaluó los cambios que han tenido las piñas infectadas en comparación con la muestra patrón, considerando variables cualitativas como la textura, penetración del hongo, crecimiento del micelio sobre la superficie de la piña, cambios en el color, generación de olores o si las muestras han expulsado líquido hacia el exterior de su corteza (lixiviación) (Blanco *et al.*, 2022). Estas anomalías fueron comparadas con los defectos usuales en la postcosecha de piña según los reportes de diversos autores y que se atribuían al patógeno estudiado.

### **2.4 Cuantificar el efecto de la solución de nanopartículas de iones cobre sobre el crecimiento de *Fusarium sp.***

Para la determinación del efecto, se llevó a cabo desde dos puntos de vista, *in vitro* para tener un análisis del hongo en crecimiento bajo condiciones de laboratorio; y directamente sobre las piñas, ambiente natural que se encuentra el hongo sobre la materia prima en cuestión.

#### **2.4.1 Preparación de soluciones de nanopartículas de iones de cobre**

Se empleó el equipo NEC-4000, siguiendo su metodología, que permite obtener agua ionizada con el componente antes mencionado. Se siguió la metodología descrita por el fabricante. El insumo fue agua destilada, este equipo está dotado de un microprocesador electrónico y electrodos de intercambio que se activan cuando la corriente continua pasa por los electrodos obligando a ceder iones de cobre. Se tuvo que tener una bomba de agua para facilitar el paso constante y uniforme de agua a través del equipo, de forma que el

agua resultante esté ionizada a la concentración que se requiere. Preparando la solución inicial a 15 ppm y a partir de esta, obtener las concentraciones de 3, 6 y 9 ppm de cobre, por dilución.

## 2.4.2 Efecto in vitro

### 2.4.2.1 Elaboración de cultivo

Todo este apartado se llevó a cabo bajo las indicaciones descritas por Daza *et al.* (2020) con algunas variaciones. Una vez obtenidas las soluciones de iones cobre se procedió a calcular la cantidad de agar Papa Dextrosa Agar (PDA) necesario para realizar la siembra in vitro. Se usó un agar comercial de marca TM MEDIA con certificación ISO 9001:2015, mismo que declara que se debe de emplear 39 g para elaborar 1 litro de cultivo líquido. En esta investigación se hizo la práctica por triplicado para cada una de las tres concentraciones de iones cobre, por lo tanto, para calcular la cantidad de agar que se requiere se debe de seguir la información de la tabla 3.

**Tabla 3.** Cantidad para preparación de medio de cultivo.

Concentración de cobre (ppm)	Réplicas	Cantidad de agar por placa (ml)	Cantidad total de agar líquido (ml)
3	3	20	60
6	3	20	60
9	3	20	60

Para los cálculos de agar se hizo la relación con la cantidad declarada por el fabricante, por lo tanto, si para 1 L se necesitan 39 g, para 60 mL se necesitan 2,34 g de agar para cada una de las concentraciones. Adicionalmente, siguiendo la relación, se realizó la preparación de un medio de cultivo para la siembra del testigo de la cepa, así mismo por triplicado. Se pesó los 2,34g para cada concentración y se mezcló con el agua ionizada (*con cobre*) en un matraz Erlenmeyer (para la elaboración del agar para los testigos se utilizó agua destilada común, sin la adición de cobre), luego se calentó la solución en baño María hasta que esta tenga un tono transparente y libre de grumos, todo esto con el fin de que se diluya todo el agar en el agua.

Todos los medios preparados para las tres concentraciones y los testigos, se los llevó a la autoclave para eliminar cualquier presencia de microorganismos y obtener un cultivo estéril, al finalizar dicho proceso se realizó el plaqueo lo más pronto posible procurando que los medios no se solidifiquen.

#### **2.4.2.2 Plaqueo de agar**

Las cajas Petri que se emplearon en este paso fueron de naturaleza plástica, por lo que no fue necesario realizar un proceso de esterilización, cada caja Petri fue identificada con la concentración que va a tener, además de la fecha en la que se hizo la práctica.

Para este apartado se siguió la metodología descrita por Nieto y Bailón, (2018). Para los cálculos se tomó como base de referencia que se utilizaban 20 mL de agar por caja Petri, se debe de verter lo suficiente para que cubra toda la superficie de la placa y tenga aproximadamente medio centímetro de grosor de cultivo. Una vez hecho el plaqueo de todas las concentraciones se esperó a que este se solidifique, evitando movimientos bruscos y contacto mínimo para no tener contaminación alguna.

#### **2.4.2.3 Siembra de hongo**

Con la ayuda de un sacabocado se realizó el retiro de un disco de la cepa madre y se sembró en el centro de la placa, evitando que el mismo tenga contacto con la superficie que resta del agar, para poder tener buenos resultados y evitar que el hongo se esparce. Durante cada inoculación se realizó la esterilización del sacabocado, flameando en el mechero para evitar contaminación por contacto.

#### **2.4.2.4 Cálculo del porcentaje de inhibición**

Se tomó como referencia el diámetro del crecimiento de la cepa inoculada, contrastando con el testigo que se hizo, las mediciones deben ser cada dos días y finalizan el día en que el testigo cubra por completo toda la superficie de la placa. Para el cálculo del porcentaje se usó la descrita a continuación (Asanova *et al.*, 2018).

$$\%Inhibición = \frac{DC - DT}{DC} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

donde:

DC = diámetro de muestra control

DT = diámetro de muestra con tratamiento

### 2.4.3 Efecto sobre las piñas

#### 2.4.3.1 Desinfección de piña por inmersión.

Se usaron 3 tiempos (3, 6, 9 minutos) y 3 concentraciones (3, 6, 9 ppm) para el proceso de desinfección por inmersión. Se utilizó el método descrito por Mejía y Torres, (2015) en donde describen un proceso de lavado en tanques como parte de la desinfección utilizando el químico *Triadimefon*, en nuestro caso cobre, para eliminar cualquier tipo de hongos en el fruto y seguir con el respectivo procesamiento de la fruta. Se usaron tres recipientes para realizar la desinfección de la fruta, cada recipiente contiene una concentración determinada de forma ascendente, de esta manera se procede a introducir una piña en el recipiente que le corresponde, que consta de una concentración y tiempo establecidos, hasta llegar a emplear las 9 piñas, más el control, por duplicado (para ello se sigue lo descrito en la tabla 4).

**Tabla 4.** Diseño de tratamientos

Tiempo (min)	Concentración (ppm)		
	3	6	9
3	1**	2**	3**
6	4**	5**	6**
9	7**	8**	9**

Cada número indica la denominación del tratamiento. \* = unidad de piña empleada. Se debe contabilizar 2 piñas más para el tratamiento de control (0)

#### 2.4.3.2 Toma de muestra

Una vez que concluyó el tiempo de desinfección, se procedió hacer un breve enjuague con agua destilada esterilizada, 100 ml por cada tratamiento, sobre toda la superficie de la piña, teniendo en consideración que el agua esté en contacto con el pedúnculo, corona y corteza.



### **2.4.3.3 Siembra en Petrifilm ®**

Se usaron placas Petrifilm ® de la marca 3M, para el recuento de mohos y levaduras para reducir el tiempo, como sabemos, el método convencional de siembra conlleva la preparación de los medios, genera un mayor gasto económico y espacio de incubación, entre otras características que hacen que sea menos viable para el desarrollo de la práctica, debido a la cantidad de muestras a analizar. Según la Guía informativa de 3M Petrifilm recomienda seguir la siguiente metodología:

- Se recogió la muestra del agua restante del paso anterior y se extrajo 1 ml. Realizado duplicado por cada tratamiento.
- Se levantó la película superior de la placa y se le aplicó la muestra de manera perpendicular a la placa. Se soltó la película superior dejando que caiga sobre la muestra y con la ayuda de un dispersor se presionó firmemente para distribuir de manera homogénea la muestra en la placa.
- Finalmente se incubó a 25-28°C durante 48 horas en posición horizontal con la película transparente hacia arriba. Para tener mejores resultados, se incubó por 12 horas más, para luego contabilizar las unidades formadoras de colonias (UFC).

Se realizaron dos siembras por cada tratamiento. Apartados, 3.4.3.2 y 3.4.3.3 se realizaron nuevamente a los 5 días de haber realizado la primera siembra, con el objetivo de comparar la carga inicial y futura.

## **2.5 Cuantificación de iones cobre residuales**

Las piñas que se usaron para este apartado, fueron tratadas bajo las mismas condiciones explicadas en el apartado 3.4.3.1, pero únicamente empleando 9 minutos de inmersión, de modo que se usaron 4 piñas, una de control (sin desinfección) y una por cada concentración.

### **2.5.1 Preparación de muestras**

Una vez transcurridos 7 días, se procedió a cortar un hexágono (incluyendo cáscara y pulpa) de cada piña de ubicaciones aleatorias, proceso que se llevó a cabo por triplicado en las 4 muestras. Luego se llevó a la estufa a 60°C durante 48 horas para secar la muestra

y posteriormente se realizó una digestión ácida siguiendo la metodología expuesta por Ordaz (2019), siguiendo el procedimiento a continuación.

1. Se pesó 0,500 g de muestra triturada para adicionarla a un tubo de ensayo.
2. Se agregó 5ml de HNO<sub>3</sub> QP a la muestra y se agitó para su correcta homogeneización.
3. Se colocó el tubo de ensayo a la plancha a una temperatura de 180°C, hasta conseguir que la muestra entre a un estado pastoso.
4. Se dejó enfriar la muestra unos segundos.
5. Se adicionó 5 ml de HCl QP a la muestra, este procedimiento se realiza con la finalidad de formar cloratos.
6. Una vez más se colocó el tubo de ensayo en la plancha a una temperatura aproximada de 180°C hasta que la muestra quede en total sequedad.
7. Nuevamente se deja enfriar la muestra unos segundos.
8. Se agregó 10 ml de HCl QP, se colocó en la plancha para disolver la muestra y facilitar el trasvase.
9. Se trasladó la muestra en un balón de 50 ml, aforado con agua destilada.
10. Se envió la muestra a un laboratorio para su respectivo análisis de cobre residual, mediante la técnica de espectroscopia de absorción atómica.

Los parámetros de análisis por el método espectrofotometría de absorción atómica son:

**Absorbancia:** 0,215

**Slit:** 0,70

**Equipo utilizado:** Perkin Elmer 300

**Energía:** 67

**Margen de error:** ± 0,003 %

**Longitud de Onda:** 324,80

## **2.6 Análisis de datos**

Para el análisis de los datos obtenidos se tomó como ayuda al software Statgraphics Centurion Versión 19.3.03, en donde se llevaron a cabo pruebas de varianza ANOVA esperando un valor  $p \leq 0.05$ ; obtención de desviaciones estándar y pruebas de múltiples rangos por el método de 95% de LSD, y para la elaboración de gráficas, de aquellas, dos superficies de respuesta se la realizaron en el Minitab 20, versión 20.3.0.0. además de usar el procesador de gráficas de Excel Profesional Plus 2016 para el análisis de las curvas de comportamiento del crecimiento del hongo, y generación de modelos matemáticos.

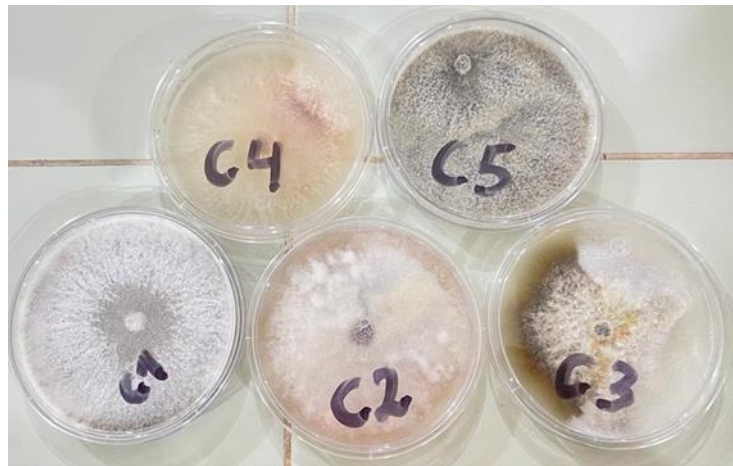
## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 3.1 Presencia y el efecto de *Fusarium sp* en la calidad de las piñas

##### 3.1.1 Presencia de *Fusarium sp* en piñas postcosecha

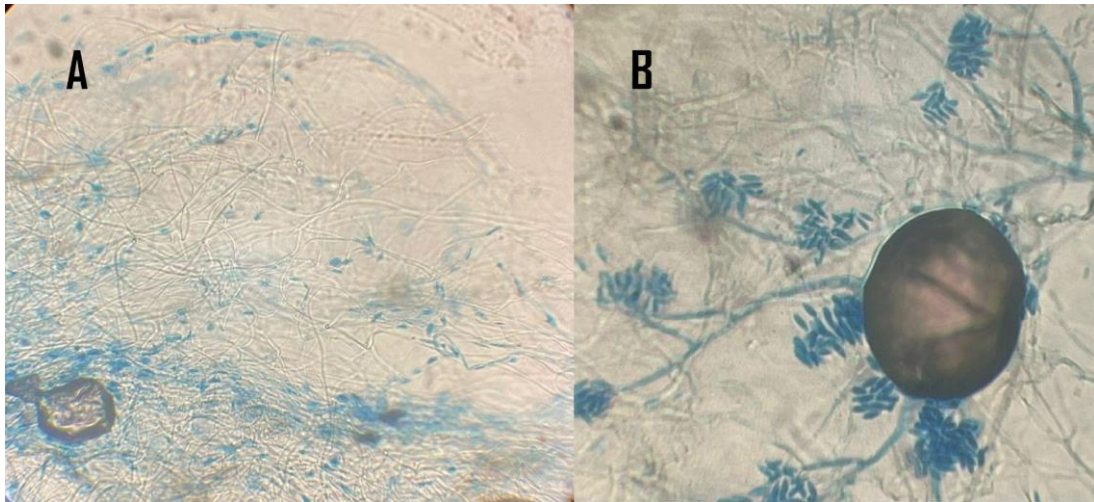
En la figura 4 se puede identificar claramente el crecimiento de varios hongos que se diferencian unos de otros por la forma, color, grosor del micelio, entre otras características, comprobando la existencia de varias colonias en una sola muestra de piña. En la figura 5 y 6 se identifican macro y microscópicamente, respectivamente, la presencia de hongo *Fusarium sp*, identificada como “Cepa 5” debido a que reunía características propias de este género.



**Figura 4.** Hongos aislados



**Figura 5.** *Fusarium sp* aislado

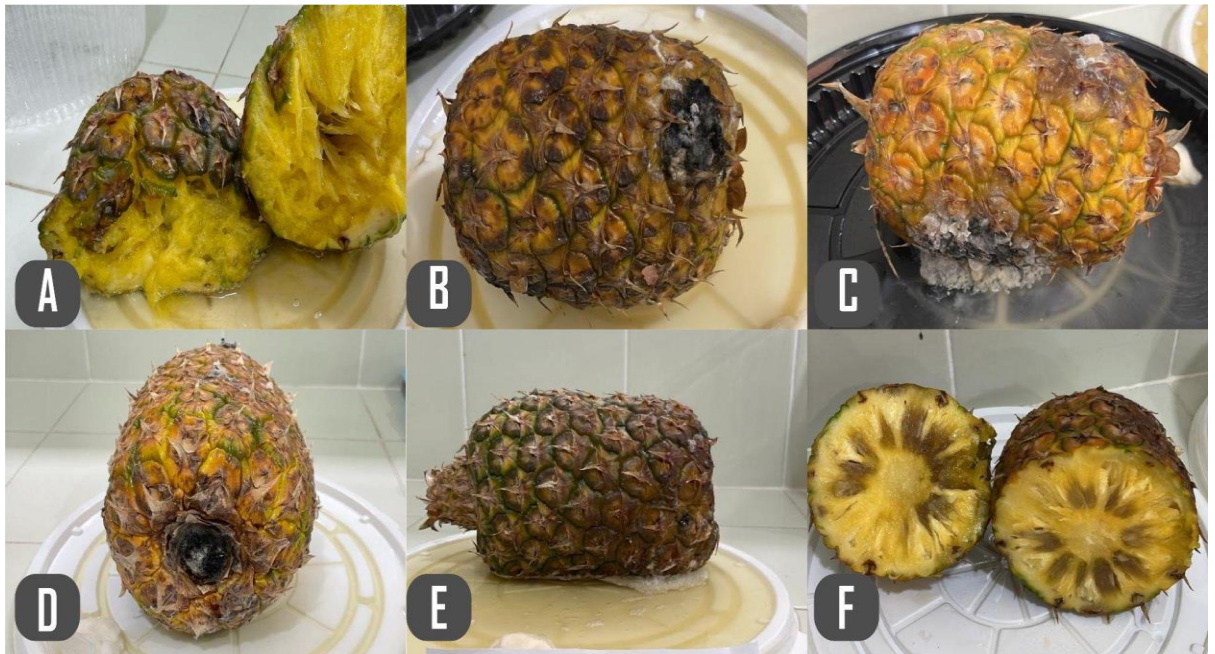


**Figura 6.** Vista microscópica x100 *Fusarium sp*

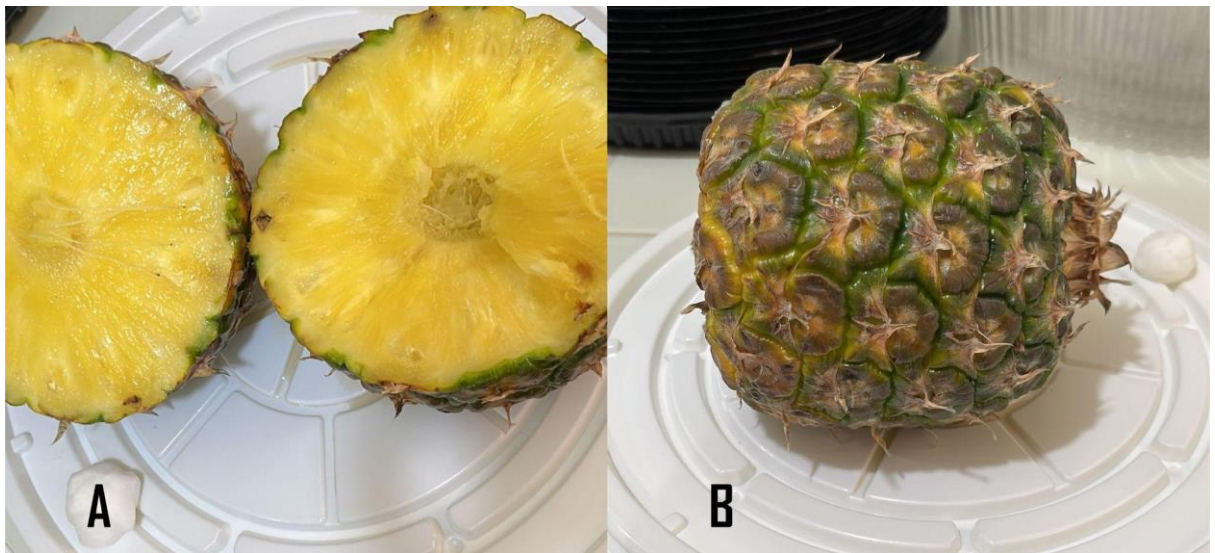
Salazar *et al.* (2020); Hernández *et al.* (2019) y Leyva *et al.* (2017), mencionan que las colonias aisladas de *Fusarium sp.* en medio PDA, tienen una apariencia algodonosa de color blanco tal como se observa en la Figura 5 (identificación macroscópica). Puede tener coloraciones en los contornos que pueden ser amarillo, gris, rojo, púrpura, o violeta, (en nuestro caso, gris blanquecino) dependiendo de la especie que se esté analizando, además del nivel de purificación y materia de procedencia, debido a que las cepas pueden mutar de un tratamiento a otro. Microscópicamente, los mismos autores describen que los hongos del género en cuestión son característicos por formar macroconidios, microconidios y polifialides, mismos que pueden estar o no agrupados, tal cual se evidencia en la figura 5, en donde **A** representa a los microconidios y **B** a los macroconidios en presencia de ramificaciones polifialides.

### **3.1.2 Efecto del *Fusarium sp* en la calidad de las piñas**

El efecto que causa el *Fusarium sp* en la piña es muy evidente, toda la calidad de la piña cambia por completo, los resultados visuales son los que se describen a continuación.



**Figura 7.** Efecto del *Fusarium sp* en piñas



**Figura 8.** Piña de control.

En la figura 7 se evidencia que la presencia del hongo en el fruto, genera la degradación de la textura de firme a blanda (A); pardeamiento exterior (B); crecimiento del micelio en la superficie del fruto (C); afectación al pedúnculo (D); lixiviados en cantidades desde 19 hasta 50 mL (E); presencia de manchas negras en la fruta, radio promedio de 5 cm (F).

Efectos que no se observan en la piña que se utilizó como control, figura 8. En A la pulpa no presenta signos de lesiones o pérdida de firmeza, y aún mantiene el color y brillo

característico de la variedad MD-2, caso igual en **B** (misma piña que **A**), se nota que, a pesar de estar bajo el mismo tiempo y condiciones de exposición al ambiente, no se ha madurado ni ha presentado síntomas similares a las piñas que sí fueron inoculadas con el hongo (muestras de la figura 7).

Resultados que fueron comparados con los obtenidos por Blanco *et al.* (2022) y Masís (2019); en donde claramente mencionan, que las plantas que presentan sintomatología por presencia de *Fusarium sp.*, y logran producir un fruto, tienden a tener pudrición en el tejido, exudados o lixiviados, o apariciones de manchas dentro y fuera del fruto. Además, que comúnmente se suele tener ambigüedad de la enfermedad causante, debido a que los síntomas pueden ser similares, pero que se confirman con el estado de salud de la planta, o con otras pruebas más avanzadas, como lo es el análisis microbiológico o microscópico, tal cual se realizó en los apartados de arriba. Vilaplana *et al.* (2018), obteniendo resultados similares, menciona que, la especie más severa en cuanto a fusariosis, es *F. verticillioides*, misma que puede llegar a matar la planta por completo, o extender el periodo de muerte hasta producir un fruto de muy mala calidad y con deformidades.

### 3.2 Efecto de la solución de nanopartículas de iones cobre sobre *Fusarium sp.* *in vitro*.

#### 3.2.1. *Fusarium sp.*, *in vitro*, frente a tratamientos con iones cobre.

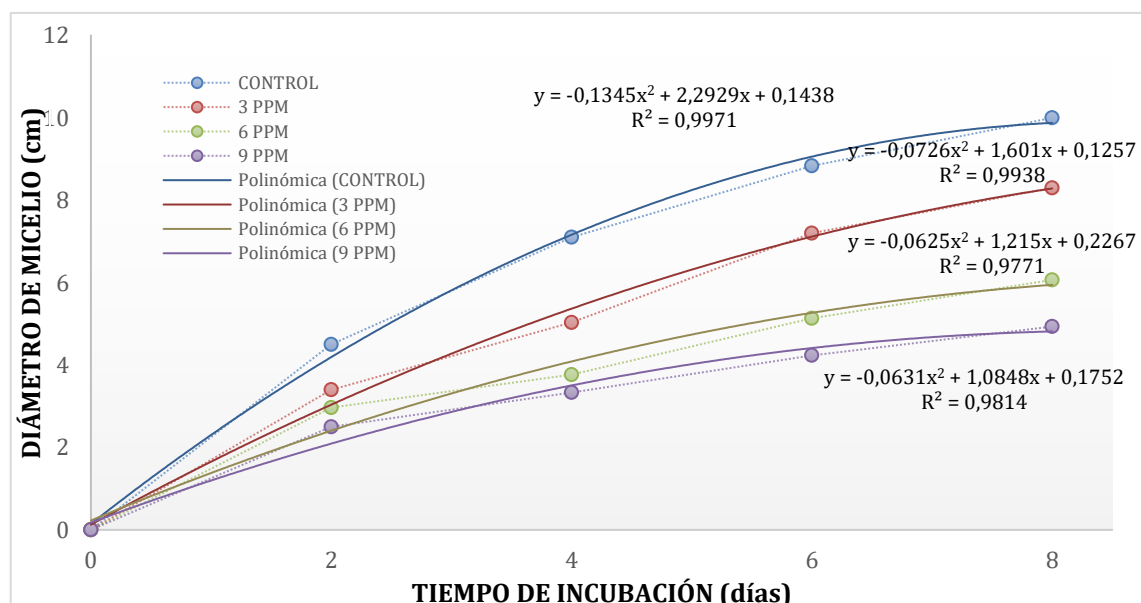


Figura 9. Crecimiento *in vitro* de *Fusarium sp.* en presencia de cobre

Como se puede observar en la figura 9, a partir del segundo día hay un crecimiento notable en todos los tratamientos, siendo de mayor el obtenido por la muestra de control, con 4,50 cm de promedio, y relativamente similares para los tres tratamientos, 3,4; 2,97 y 2,5 cm, para los tratamientos 3, 6 y 9 ppm, respectivamente; con un valor  $p = 0,0002$  para este conjunto de datos, teniendo diferencia significativa entre cada tratamiento con el control. De la misma forma que al trazar una línea de tendencia de tipo polinómica, se obtienen correlaciones por encima de 0,97, lo que indica que los valores obtenidos para cada concentración tienen una estrecha relación entre sí; razón por la cual la correlación polinómica es la que mejor se ajusta a este modelado. Además, la tendencia del crecimiento es a ralentizarse conforme se avance en los días, debido a la presencia de las partículas de cobre.

Con el tratamiento de 9 ppm, se logró reducir el crecimiento del micelio, en un 50,7% en comparación con el tratamiento de control, logrando reducir de 10 a 4,93 cm de diámetro, mientras que con 6 y 3 ppm se obtuvo un resultado final de 6,07 y 8,3 cm, respectivamente, de forma que sería relativamente 9 ppm la concentración ideal para poder reducir en mayor medida el crecimiento del micelio.

Morais *et al.* (2022) mencionan que, a los 14 días de haber iniciado la incubación, empleando *F. guttiforme*, obtienen valores entre 4 a 10 cm de diámetro para una cepa control, mientras que, Krzysko *et al.* (2019) describen valores de control en promedio de 8,5 cm para cepas de *F. graminearum*; por su parte Al-Rajhi *et al.* (2022) menciona que su control tuvo un diámetro de 8,2 cm para *F. incarnatum*. Por lo que los valores que se han obtenido en la investigación están acordes a los encontrados por los autores, pudiendo ser las pequeñas diferencias debido al comportamiento independiente de cada especie perteneciente al género *Fusarium*, además de que no se conoce la especie de la cepa que se está manejando.



### 3.2.2. Análisis estadístico de varianza

**Tabla 5.** Análisis de varianza ANOVA para crecimiento de micelios

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón - F	Valor - P
Entre grupos	82,1527	3	27,3842	3,51	0,0210
Intra grupos	437,147	56	7,80619		
Total (Corr.)	519,299	59			

**Tabla 6.** Prueba de Kruskal-Wallis para Concentraciones.

Concentraciones	Tamaño Muestra	Rango Promedio
0	15	39,8667
3	15	34,1333
6	15	26,8
9	15	21,2

Estadístico = 9,97854 Valor-P = 0,0187487

Para el análisis de los datos se usó un nivel  $p \leq 0,05$ . En la tabla 5 se obtuvo diferencia significativa entre las concentraciones empleadas debido a que el valor  $p \leq 0,05$ . Lo que se corrobora con lo mostrado en la figura 9, en sentido de que si se aumenta la concentración de cobre en la preparación del agar sobre el cual se siembra el hongo, este va a tender a ralentizar su crecimiento conforme pasen los días, en comparación con aquel que crezca sobre las condiciones normales. No obstante, las concentraciones que se han empleado, no son lo suficientemente fuertes como para detener o inhibir el crecimiento del micelio de *Fusarium sp.*

De igual manera, en la tabla 6, se observa un valor  $p \leq 0,05$ , lo que indica que cada mediana de datos para cada uno de los tratamientos tiene diferencia estadísticamente significativa entre sí. Resultados que se analizan más a fondo con la prueba de múltiples rangos.

### 3.2.3. Análisis estadístico de diferencias entre tratamientos.

**Tabla 7.** Pruebas de Múltiple Rangos para Concentración de iones cobre

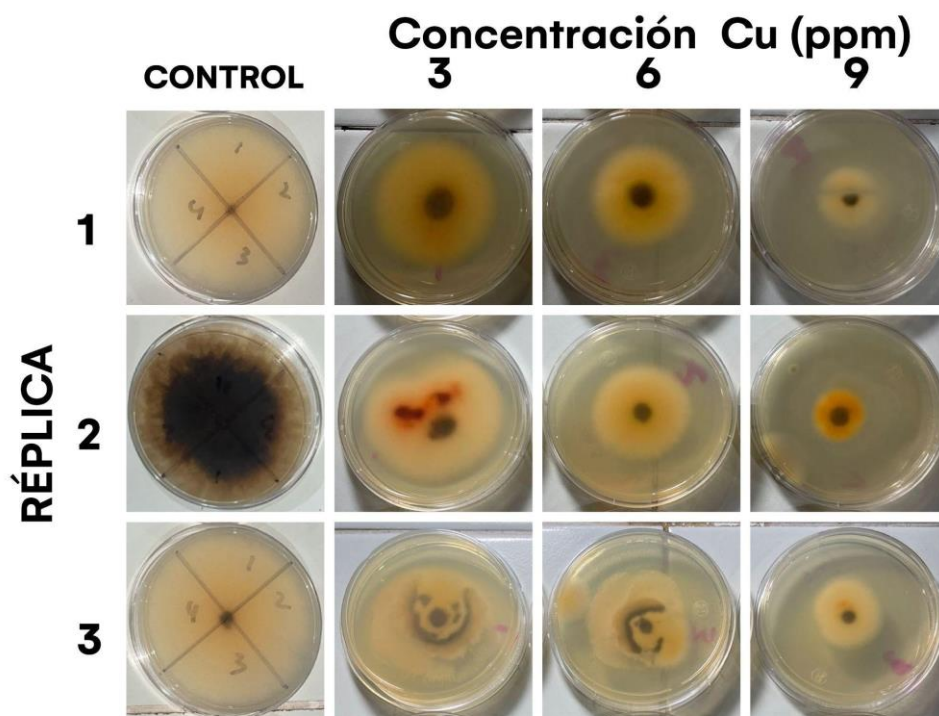
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 3	*	1,70	1,16321
0 - 6	*	3,93	1,16321
0 - 9	*	5,07	1,16321
3 - 6	*	2,23	1,16321
3 - 9	*	3,37	1,16321
6 - 9		1,13	1,16321

*Contraste 0 (control) \* indica diferencia significativa*

La tabla 7 indica la relación que existe entre cada tratamiento para los datos obtenidos a los 8 días de incubación, mismos que reflejan una notable diferencia entre el hongo de control en comparación con los tres tratamientos, 3, 6 y 9 ppm. Los tratamientos de 6 y 9 ppm no son estadísticamente significativos, debido a que la diferencia de rango de uno a otro es muy pequeña, entre 6,07 y 4,93 cm, para los tratamientos de 6 y 9 ppm, respectivamente. Por lo tanto, estadísticamente, entre las dos concentraciones antes mencionadas, la primera es suficiente para poder causar un efecto significativo para el control de *Fusarium sp* con nanopartículas de cobre, bajo condiciones *in vitro*.

Ahnert *et al.* (2019) mencionan que, al usar soluciones de CuSO<sub>4</sub> sobre *F. solani*, en concentraciones de 10 - 20 mmol/L pudieron inhibir por completo el crecimiento de las colonias, teniendo un efecto fungistático al sexto día de análisis al usar una concentración de 5 mmol/L. Galal *et al.* (2021) por su parte, estudiaron el uso de nanopartículas de cobre contra *F. oxysporum* obteniendo un resultado fungicida al usar concentraciones de 250 ug/mL. Lo que detalla que a mayores concentraciones de las que se usaron en la investigación se obtienen resultados letales sobre especies específicas de *Fusarium*. También se debe a que al estar el hongo en condiciones *in vitro*, tiene más resistencia a ser susceptible ante agentes de control, como lo es el cobre, razón por la cual la máxima dosis no pudo detener su crecimiento.

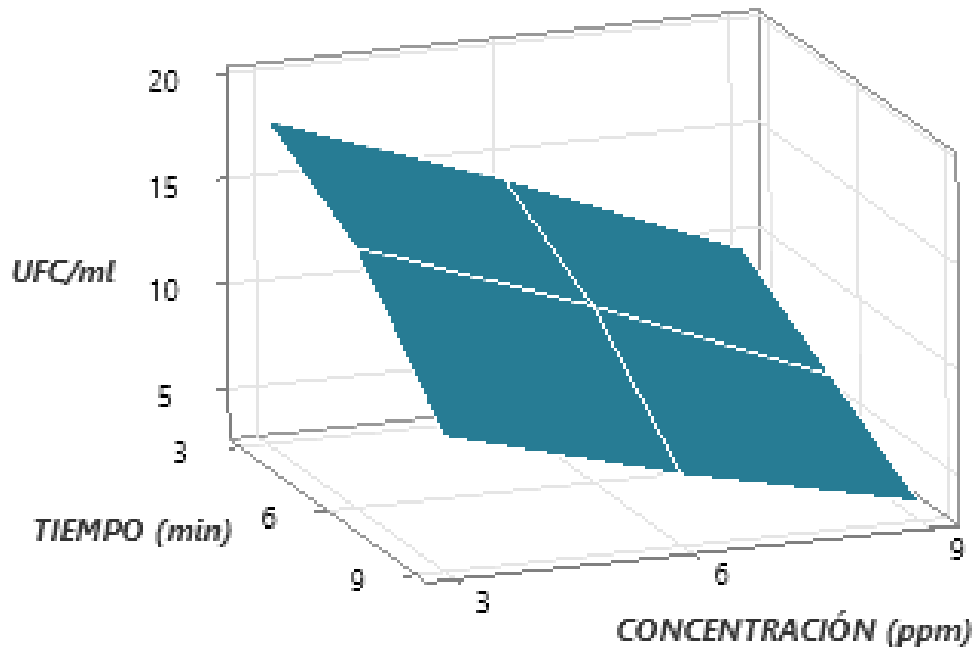
Los resultados son más visibles en la figura 10, en donde se muestra el tamaño del micelio que crece en los controles en comparación con los que han crecido con presencia de cobre en el agar. Como se mencionó en la metodología, la cepa que se empleó para el desarrollo de esta investigación fue purificada, por lo que estuvo en constante cambio hasta poder estar libre de otros hongos o bacterias. Así mismo, el hecho de obtener nuevos micelios a partir de esta, genera cambios en su apariencia física, tal como se puede observar en la figura 10, en donde, a pesar de provenir de la misma cepa, se evidencia un cambio visual en la superficie de crecimiento. No obstante, mantuvo la misma característica de ser afectado por la acción del cobre, siendo el crecimiento paralelo a sus semejantes.



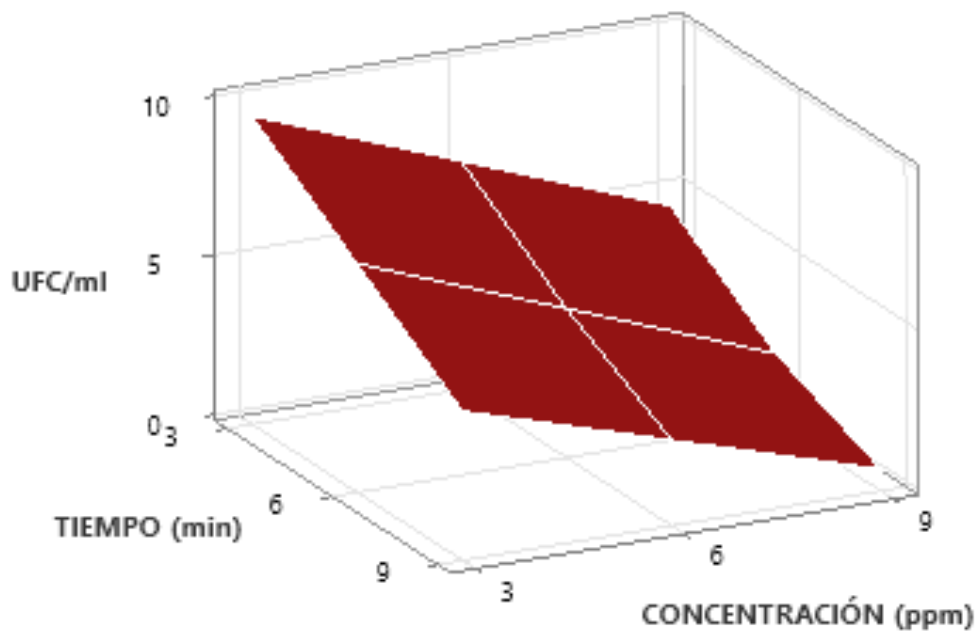
**Figura 10.** Actividad antifúngica de nanopartículas de iones de cobre.

### 3.3 Efecto de la solución de nanopartículas de iones cobre sobre el crecimiento de *Fusarium sp* en piñas.

#### 3.3.1. Comportamiento de u *Fusarium sp* en piña post cosecha



**Figura 11.** UFC de *Fusarium sp* en piñas post cosecha día 0



**Figura 12.** UFC de *Fusarium sp* en piñas post cosecha día 5

Las figuras 11 y 12, muestran el claro comportamiento de las colonias de *Fusarium sp*, frente a la acción de diferentes tiempos de inmersión y concentración, existiendo un comportamiento inversamente proporcional entre la cantidad de UFC y la concentración de cobre en conjunto con el tiempo de inmersión. El mejor tratamiento aparente, es sumergir las piñas en el tratamiento **9**, dado que se obtuvo  $3.5 \times 10^3$  y  $0.5 \times 10^3$ , ambas con  $DS \pm 0.707$ , para las colonias a los 0 y 5 días, respectivamente; en comparación con los valores obtenidos con las piñas del tratamiento **0**, día 0 tuvo  $27 \times 10^3 \pm 1,414$  y al día 5,  $49.5 \times 10^3 \pm 0.707$  UFC/mL. De modo que se pudo reducir a los 5 días de desinfección, un 98,14% comparando el tratamiento 9 con el control. Resultados que eran los esperados debido al antecedente que se tuvo sobre la inoculación *in vitro*, donde conforme se aumentó la concentración de cobre se redujo el crecimiento.

Otros autores como León y Mattos (2021), investigaron al proteinato de cobre sobre *F. verticillioides*, logrando un porcentaje de inhibición mínimo de 87,67 %, teniendo mejores resultados cuando combinaba la solución de cobre con otros componentes biológicos. Por otra parte, Pariona *et al.*, (2018). empleando concentraciones mínimas de 0,1 mg/mL ya tiene resultados positivos, con inhibición del 58% y con concentraciones de 1 mg/mL logra una inhibición mayor al 78%. Resultado similar fue obtenido por Alburqueque y Gusqui (2018)., donde obtienen un porcentaje de inhibición de 72,25 % empleando sulfato de cobre V.

Los resultados que se obtuvieron en las investigaciones antes citadas en comparación con los declarados en esta investigación, difieren en cierta medida debido a que las metodologías que emplearon fueron diferentes a la planteada, por ejemplo, la suspensión de colonias del hongo, mientras que en la nuestra fue con discos de micelio aislado. Además, la presentación de cobre no fue la misma, por lo que el nivel de resistencia del hongo y efecto directo del cobre varía. Sin embargo, la mayoría de los resultados se encuentran dentro del tercer cuartil de porcentaje de inhibición, además de que la presencia de cobre, en todos los casos, tiende a reducir la cantidad de UFC del género *Fusarium* en un gran porcentaje.

### 3.3.2. Análisis de varianza ANOVA

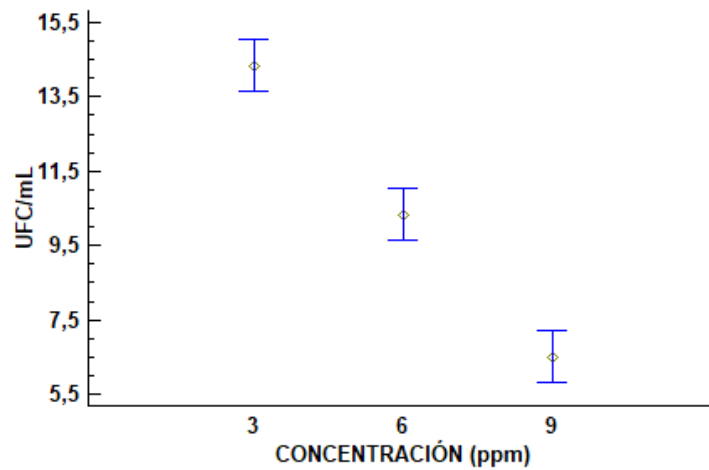
**Tabla 8.** Análisis de varianza para UFC de *Fusarium sp* día 0

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón - F	Valor - P
A: Concentración	184,111	2	92,0556	74,54	0,0000
B: Tiempo	172,111	2	86,0556	69,68	0,0000
Residuos	16,056	13	1,23504		
Total (Corregido)	372,278	17			

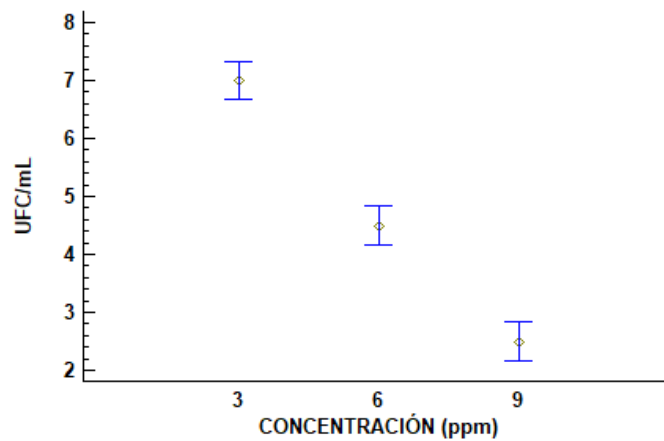
**Tabla 9.** Análisis de varianza para UFC de *Fusarium sp* día 5

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón - F	Valor - P
A: Concentración	61,0	2	30,5	108,14	0,0000
B: Tiempo	65,33	2	32,6667	115,82	0,0000
Residuos	3,67	13	0,282051		
Total (Corregido)	130,00	17			

Tanto en la tabla 8 como en la tabla 9, se puede observar que entre los factores estudiados, concentración y tiempo, existe un efecto estadísticamente significativo sobre el crecimiento de *Fusarium sp*, además de que son iguales entre sí por tener el mismo valor  $p$ , empleando un nivel de confianza del 95,0%. Caso que se puede evidenciar con los promedios generales mostrados en las figuras 13 y 14 en donde se plasman las medias de Fisher LSD con 95 %. De igual manera, al realizar el mismo análisis para cada tiempo de inmersión, se tienen valores menores a  $p=0,05$ ; teniendo un valor  $p$  de 0,0028; 0,0244; 0,0080, para el día 0; y 0,0075; 0,0027; 0,0251, para el día 5, en los tiempos de inmersión de 3, 6 y 9 minutos respectivamente. Indicando que al aplicar cobre sí se da un efecto estadísticamente significativo entre cada tiempo de inmersión empleado.



**Figura 13.** Colonias de *Fusarium sp* en piña, día 0



**Figura 14.** Colonias de *Fusarium sp* en piña, día 5

Teniendo un promedio de  $6,33 \pm 2,80 \times 10^3$  UFC/ml y  $2,33 \pm 1,86 \times 10^3$  UFC/ml para el tratamiento **9**, en cada una de las dos mediciones realizadas, como promedio entre los tres tiempos de inmersión que se llevaron a cabo.

### 3.3.3. Prueba de Múltiple rangos

Todos los valores reportados en la presente tienen una validez significativa, como se ha demostrado anteriormente, sin embargo, al realizar un análisis entre las medias de cada grupo por factor de datos obtenidos, se detectó que hay un comportamiento estadísticamente igual entre algunas de ellas, al analizar mediante el método de LSD 95%, planteado en la tabla 10.

**Tabla 10.** Heterogeneidad entre medias de tratamientos

Concentración (ppm)	Tiempo (min)					
	3 (+)	6 (+)	9 (+)	3 (-)	6 (-)	9 (-)
3	a 1	a 1	a 2	a 1	a 2	a 3
6	b 1	b 1	b 2	b 1	b 2	b 3 *
9	c 1	c 2	b 3	c 1	c 2 *	b 2

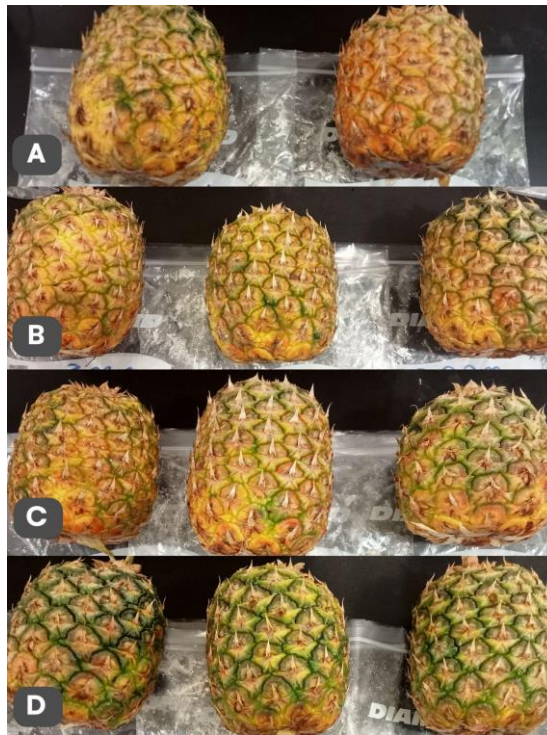
(+) indica mediciones tomadas en el día 0, (-) indica mediciones tomadas en el día 5. Letras diferentes en la misma columna y números diferentes en filas indican diferencia significativa  $p \leq 0,05$ . \* mejores tratamientos.

La información plasmada en la tabla 10 permite identificar al mejor tratamiento entre los 9 establecidos en la investigación. En los resultados obtenidos de las muestras sembradas en ambos días se puede notar que no hay diferencia significativa al emplear 6 o 9 ppm de cobre bajo 9 minutos de inmersión, como sí ocurre a los 3 y 6 minutos. Para los tratamientos con 3 y 6 ppm de la primera siembra (día 0), es lo mismo emplear 3 o 6 minutos de inmersión, debido a que son significativamente iguales. Mientras que, al analizar las piñas a los 5 días, aquellas que se desinfectaron con 9 ppm durante 6 y 9 minutos, se obtuvieron valores sin diferencia significativa entre sí, por lo que estadísticamente, no existe razón para incrementar el tiempo de inmersión bajo esta concentración.

Por lo tanto, los mejores tratamientos para la primera siembra fue el desinfectar las piñas durante 9 minutos en la solución de cobre a 6 y 9 ppm; para la segunda siembra se tienen 3 opciones estadísticamente viables, desinfectar las piñas durante 9 minutos con 6 o 9 ppm, o, sumergir las piñas en 9 ppm durante 6 o 9 minutos. Cuantitativamente, el tratamiento 9 es el ideal para lograr mayor efectividad, no obstante, es el que requiere de un mayor gasto económico, por lo tanto, los mejores tratamientos son el 6 y 8.



### 3.3.4. Índice de madurez y afección de pedúnculo en piñas desinfectadas



**Figura 15.** Madurez de piñas desinfectadas (A) control; (B) 3 ppm (C) 6 ppm (D) 9 ppm. De izquierda a derecha 3, 6, 9 minutos de inmersión

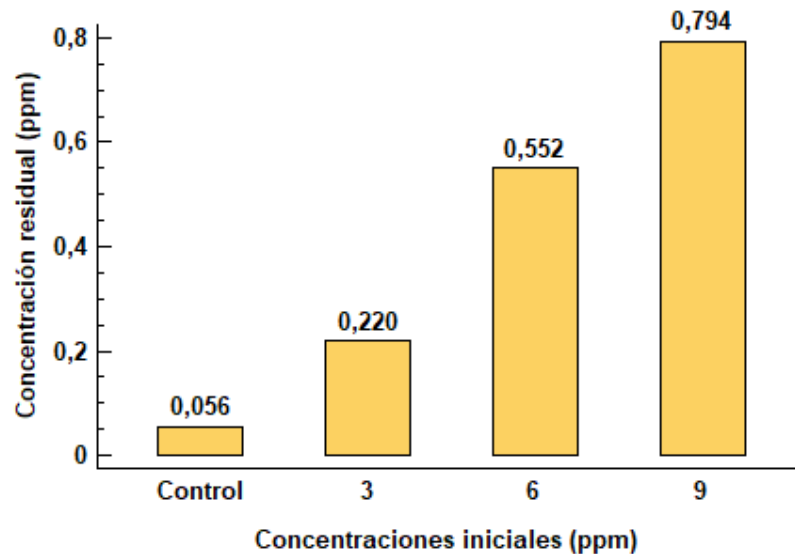
La figura 15 hace una comparación directa entre todos los tratamientos que se llevaron a cabo, luego de los 5 días, para la desinfección de piñas con soluciones de nanopartículas de cobre. Se muestra el duplicado del control debido a que no se tomaron tiempos de inmersión. Hay una clara disminución del estado de madurez según se incremente la concentración de nanopartículas de iones cobre en las soluciones desinfectantes, tomando como referencia lo expuesto en la norma INEN 1338-2016, las piñas de control estarían dentro del tercer estadio; piñas desinfectadas con 3 y 6 ppm, en el segundo estadio; y las piñas desinfectadas con 9 ppm dentro del primer estadio. Lo que es de beneficio para poder tener más días de vida de anaquel de piñas que sean desinfectadas con soluciones a 9 ppm.



**Figura 16.** Pedúnculo de piñas desinfectadas (A) control; (B) 3 ppm (C) 6 ppm (D) 9 ppm. De izquierda a derecha 3, 6, 9 minutos de inmersión

En la figura 16, los pedúnculos de las piñas luego de los 5 días de desinfección. Las piñas de los tres niveles de tratamientos no presentan una afectación sustancial en cuanto a desarrollo de micelio o degradación de su pedúnculo. No obstante, las piñas de los tratamientos 3, 4 y 9, generaron un leve enrojecimiento en menos del total de la superficie del pedúnculo; mientras que en las piñas control sí se desarrolló un daño total, con crecimiento de micelio, además de pudrición parcial de las hojas del pedúnculo.

### 3.4 Cobre residual en piñas desinfectadas



**Figura 17.** Cobre residual presente en las piñas analizadas

En la figura 14 se plasman los valores del análisis de absorción atómica, en donde todas las muestras analizadas tienen resultados positivos y cumplen con un patrón de incremento. Se podría pensar que la muestra de control no presentaría concentración alguna de cobre sobre su composición, debido a que no fue desinfectada con soluciones de nanopartículas de iones cobre, no obstante, el análisis muestra un resultado de 0,056 ppm, que, a pesar de ser mínimo, ya representa una cantidad. Resultado acorde a lo planteado por Peralta (2020) en donde menciona que la piña es una buena fuente de nutrientes y minerales, de estos últimos menciona al Cu, Mg, I y Mn, pero no declara su valor presente. Mientras que Hernández *et al.* (2021), no declaran presencia alguna de cobre en la composición de la piña, pero sí de Ca, Mg, P, K, Na, Zn y Fe. con valores de 0,12-109 mg/100 g de muestra.

Los resultados de las tres muestras que fueron desinfectadas, siguen presentando la tendencia de aumento según se incrementa la concentración de cobre, como era de esperarse, pero ninguna sobrepasa 1 ppm de concentración residual, siendo menor que la mínima cantidad empleada para la desinfección de las piñas. Teniendo porcentajes residuales de 7,33; 9,2; 8,82 para los tratamientos de 3, 6 y 9 ppm, respectivamente,

valores que no cumplen una tendencia lineal debido a que son independientes entre sí, por tal motivo el porcentaje de residuo de los 6 ppm es mayor que el de 9 ppm.

Taylor *et al.* (2020), mencionan que, la media estimada de ingesta de cobre por vía de alimentos es de 0.93–1.3 mg para personas adultas, y que el Instituto de Medicina de los Estados Unidos establece una dieta de ingesta estimada de 1.0–1.7 mg Cu, pudiendo ser 1.3–2.2 mg Cu mediante suplementos. Por su lado, Bost *et al.* (2016) declara que, dosis por debajo de los 0.8 mg tienden a tener pérdidas por absorción, caso contrario ocurre con dosis de 2.4 mg. Todos los rangos son por día. Razón por la cual, los valores que se encuentran en las piñas, como residual, cumplen con los estándares permisibles para el consumo humano, debido a que consumir piña desinfectada con cobre, sólo sería una parte del total de la ingesta diaria de una personas, aumentando la cantidad de cobre con los otros alimentos ingeridos.

## CAPÍTULO IV

### 4. CONCLUSIONES

- Las muestras aisladas de las piñas degradadas presentan las mismas características macro y microscópicas que las del género *Fusarium*. Los efectos de este género sobre las piñas fueron; pérdida de firmeza, exudado, pardeamiento de la corteza, manchas en la pulpa, pedúnculo degradado.
- El crecimiento de *Fusarium sp* sobre agar PDA preparado con soluciones de nanopartículas de iones cobre, se reduce hasta en un 53 %, en comparación con el que crece sobre una superficie de agar común, empleando un tratamiento de 9 ppm de cobre, sin embargo, no logra detener el crecimiento del micelio por completo.
- Con la desinfección de piñas por inmersión en soluciones de cobre, se logró tener un efecto fungistático, reduciendo la cantidad de colonias del hongo en todos los tratamientos, comparando los resultados de la siembra al día 0 con los del día 5 de haber sido desinfectadas.
- La cantidad de cobre residual presentes en las piñas se redujo a menos de 1 ppm en todas las muestras analizadas, detectando presencia de cobre, naturalmente, en la piña sin desinfectar.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahnert-Dos Santos, R., García-Silva, J., Ralph-Falqueto, A., Barreto-da Silva, M., Romais-Schmidt, E., y Alves-Fernandes, A. (2019). Antifungal Activity of Copper, Zinc and Potassium Compounds on Mycelial Growth and Conidial Germination of *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. *Microbiology Research Journal International*, 1–11. <https://doi.org/10.9734/mrji/2019/v29i630179>
- Albuquerque-Andrade, D., y Gusqui-Mata, R. (2018). Eficacia de fungicidas químicos para el control in vitro de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas. *Arnaldoa*, 25(2). <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.252.25209>
- Al-Rajhi-H, A., Yahya, R., Alawlaqi, M., Fareid, M., Amin, B., y Abdelghani, T. (2022). Copper Oxide Nanoparticles as Fungistat to Inhibit Mycotoxins and Hydrolytic Enzyme Production by *Fusarium incarnatum* Isolated from Garlic Biomass. *Bioresources*, 3042–3052. <https://doi.org/10.15376/biores.17.2.3042-3056>
- Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario (2021). Boletín Informativo. Producción de Piña.
- Asanova, A., Polonskiy, V., Manukovsky, N., y Khizhnyak, S. (2018). Fungistatic Activity of Engineered Nanoparticles. *Nanotechnologies in Russia*, 13(5–6), 277–280. <https://doi.org/10.1134/S1995078018030023>
- Baca-Ibáñez, S., Ríos-Paico, P., y Rojas-Naccha, J. (2015). Importancia del magnesio en la dieta humana. *Agroind Sci*, 5, 177–187. <https://doi.org/https://doi.org/10.17268/agroind.science.2015.02.10>
- Batista, B. G., de Chaves, M. A., Reginatto, P., Saraiva, O. J. y Fuentefria, A. M. (2020). Human fusariosis: An emerging infection that is difficult to treat. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53, 1–7. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0013-2020>
- Blanco-Meneses, M., Castro-Zuñiga, O., y Umaña-Rojas, G. (2022). Estudio preliminar de especies de *Fusarium* presentes en piña (*Ananas comosus*) en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 46, (1), 48–64. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost/article/view/49867/49878>
- Bost, M., Houdart, S., Oberli, M., Kalonji, E., Huneau, J. F. y Margaritis, I. (2016). Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 35, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.02.006>

- Carmona, M., y Sautua, F. (2018). Epidemias de roya amarilla del trigo. Nuevas razas en el mundo, monitoreo y decisión de uso de fungicidas. *Agronomía y Ambiente*, 38(1), 37–58
- Carnielli-Queiroz, L., Bueno Fernandes, P. M., Ribeiro Fernandes, A. A., y Aires Ventura, J. (2019). A rapid and reliable method for molecular detection of *Fusarium guttiforme*, the etiological agent of pineapple fusariosis. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 62(e19180591), 1–11. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180591>
- Castro-Chinchilla, J., y Umaña-Rojas, G. (2017). Frecuencia de los hongos asociados al desarrollo de mohos postcosecha en el pedúnculo de la piña en dos zonas de Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 41(2), 18-24. <https://doi.org/https://doi.org/10.15517/rac.v41i2.31296>
- Centanaro-Quiroz, P., Damián-Quito, L., Angulo-González, A., y Villavicencio-Yanos, J. (2019). Limitantes para la industrialización de piña en el litoral ecuatoriano. *Pro Sciences: Revista de Producción, Ciencias e Investigación*, 3(29), 65–73. <https://doi.org/10.29018/issn.2588-1000vol3iss29.2019pp65-73>
- Cheng, Y., Bartholomew, D. y Qin, Y. (2018). Biology of the Pineapple Plant. In *Genetics and Genomics of Pineapple* (pp. 27–40). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-00614-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-00614-3_2)
- Daza-Gutiérrez, S., Foronda-Vallejo, M., Jiménez-Molina, A., y Sanga-Jiménez, W. (2020). Propuesta de investigación: caracterización del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* causante del marchitamiento vascular en cultivos de gulupa (*Passiflora edulis sims*) y su control con el hongo antagonista *Trichoderma spp.* *Con-ciencia y técnica*, 4(1), 106–110.
- Donoso-Muñoz, M. J. (2013). El mercado del cobre a nivel mundial: evolución, riesgos, características y potencialidades futuras. The copper market worldwide: trends, risks, characteristics and potential future growth. *Revista Chilena de Ingeniería*, 21(2), 248–261. <https://doi.org/10.4067/S0718-33052013000200008>
- Esparza-Rivera, E. (2015). *Actividad Antimicrobial de Nanopartículas de Cobre y Óxido de Zinc contra Hongos y Bacterias Fitopatógenas* [tesis de grado, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro]. Repositorio digital UAAAN. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/6670>
- Galal, G., Abd-Elhalim, B., Abou-Taleb, K., Haroun, A., y Gamal, R. (2021). Toxicity assessment of green synthesized Cu nanoparticles by cell-free extract of *Pseudomonas silesiensis* as antitumor cancer and antimicrobial. *Annals of Agricultural Sciences*, 66(1), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2021.01.006>

- Garcidueñas, J. (2013). *Caracterización morfológica y molecular de piña Ananas comosus (L.) híbrido MD-2 y su establecimiento in vitro* [tesis de maestría, Universidad Autónoma Chapingo]. <https://repositorio.chapingo.edu.mx/handle/123456789/1246>
- Guajardo-Pacheco, J. (2013). *Síntesis de nanopartículas de cobre mediante novedosa ruta química* [tesis de doctorado, Centro de Investigaciones en Materiales Avanzados]. Repositorio CIMAV. <http://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1004/769>
- Gutiérrez, M. y Cornejo, A. (2017). *Análisis Técnico-Económico para la fabricación de elementos de cobre antimicrobiano y su comercialización en el sector de la salud*. [tesis de grado, Pontificia Universidad Católica del Perú]. Repositorio PUCP. <http://hdl.handle.net/20.500.12404/9465>
- Hernández-Amasifuen, A., Pineda-Lázaro, A., y Noriega-Córdova, H. (2019). Aislamiento e identificación de *Fusarium oxysporum* obtenidos de zonas productoras de “ají paprika” *Capsicum annum L. (Solanaceae)* en el distrito de Barranca, Perú. *Arnaldoa*, 26(2), 689–697. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.22497/arnaldoa.262.26211>
- Hernández-Ramírez, G., Ortega-Ibarra, E., y Ortega-Ibarra, I. (2021). Composición nutricional y compuestos fitoquímicos de la piña (*Ananas comosus*) y su potencial emergente para el desarrollo de alimentos funcionales. *Boletín de Ciencias Agropecuarias Del ICAP*, 7(14), 24–28. <https://doi.org/10.29057/icap.v7i14.7232>
- INEN (2016). NTE INEN 1836. Frutas frescas. Piña. Requisitos
- Jaramillo-Romero, R., y Garay-Aucay, D. (2022). *Aplicación de nanopartículas de cobre ionizadas para la conservación de jugo natural de naranja*. [tesis de grado, Universidad Técnica de Machala]. Repositorio digital UTMACH. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/18618>
- Khatami, M., Varma, R. S., Heydari, M., Peydayesh, M., Sedighi, A., Agha Askari, H., Rohani, M., Baniasadi, M., Arkia, S., Seyedi, F. y Khatami, S. (2019). Copper Oxide Nanoparticles Greener Synthesis Using Tea and its Antifungal Efficiency on *Fusarium solani*. *Geomicrobiology Journal*, 36(9), 777–781. <https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1621963>
- Krzysko-Lupicka, T., Walkowiak, W., y Białoń, M. (2019). Comparison of the Fungistatic Activity of Selected Essential Oils Relative to *Fusarium graminearum* Isolates. *Molecules*, 24(2). <https://doi.org/10.3390/molecules24020311>



- León-Ttacca, B., y Mattos-Calderón, L. (2021). Control de hongos fitopatógenos asociados a semillas de palto *Persea americana* Mill. (Lauraceae) In Vitro. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 5(3), 2690–2701. [https://doi.org/10.37811/cl\\_rcm.v5i3.483](https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v5i3.483)
- Leyva-Mir, S., Vega-Portillo, H., Villaseñor-Mir, H., Tlapal-Bolaños, B., Vargas-Hernández, M., Camacho-Tapia, M., y Tovar-Pedraza, J. (2017). Caracterización de especies de *Fusarium* causantes de pudrición de raíz del trigo en el Bajío, México. *Anim. Sci., Ex Agro-Ciencia*, 33(2), 142–142. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902017005000404>
- López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., y Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación En Discapacidad*, 3(1), 10–18. [www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx)
- López-Lima, D., Mtz-Enriquez, A. I., Carrión, G., Basurto-Cereceda, S., y Pariona, N. (2021). The bifunctional role of copper nanoparticles in tomato: Effective treatment for Fusarium wilt and plant growth promoter. *Scientia Horticulturae*, 277, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109810>
- López, G. y Ataucuri, J. (2017). Estudio sobre metodologías aplicadas para la síntesis de nanopartículas de cobre (NPsCu) y plata (NPsAg) en diferentes formas y tamaños. *Tecnia*, 27(2), 45–52. <https://doi.org/10.21754/tecnica.v27i2.174>
- Llontop-Gonzales, J. A. (2016). *Presencia de cobre en piscos de producción artesanal*. [tesis de grado, Universidad Alas Peruanas]. Repositorio UAP. <https://repositorio.uap.edu.pe/handle/20.500.12990/7911>
- Masís, F. (2019). *Diagnóstico de enfermedades bióticas en el cultivo de piña, híbrido MD-2, en la finca Agroexport piña E y R S.A, Pital, San Carlos* [tesis de grado, Universidad de Costa Rica]. Repositorio del SIBDI-UCR <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/handle/123456789/11134>
- Matrose, N. A., Obikeze, K., Belay, Z. A., y Caleb, O. J. (2021). Plant extracts and other natural compounds as alternatives for post-harvest management of fruit fungal pathogens: A review. *Food Bioscience*, 41. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100840>
- Mehrani, Z., Ebrahimzadeh, H., Asgharinezhad, A. A., y Moradi, E. (2019). Determination of copper in food and water sources using poly m-phenylenediamine/CNT electrospun nanofiber. *Microchemical Journal*, 149. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.103975>

- Mejia-Carrillo, K. G., y Torres-Burgos, C. C. (2015). *Proyecto de factibilidad para la creación de una empresa de acopio y exportación de piña cayena lisa hacia el mercado chileno, ubicada en el cantón Mira en la provincia del Carchi*. [tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiana]. Repositorio digital. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/8805>
- Mercado-Ruiz, J. N., Tortoledo-Ortiz, O., García-Robles, J. M., Báez-Sañudo, R., Gracia-Moreno, B. Y., Ávila-Prado, J., Corella-Salazar, D. A., Cruz-Félix, M. C., Velásquez-Jiménez, D., y Zuñiga-Martínez, B. S. (2019). Calidad comercial de piña MD2 (*Ananas comosus* L.) Tratada en postcosecha con ácido 2-hidroxibenzoico. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 20(2). ISSN: 1665-0204.
- Morais-Da Silva, E., Dias-Neto, J., Rodrigues-dos Santos, E., Fernandes-Moreira, V., Alves-Veloso, R., Maurilio-De Souza, C., Rodrigues-Do Nascimento, I., de Souza-Aguiar, W., Diany-Dias, M., Leão-Urzêdo, E., Cavalheiro-Adorian, G., de Oliveira, M., y Siebeneichler, S. (2022). Eucalyptus (*Corymbia Citriodora*) Essential Oil and Biofertilizer Present Fungistatic Effect on *Fusarium gutiforme*. *American Academic Scientific Research Journal for Engineering*, 88, 133–144. <https://doi.org/http://asrjetsjournal.org/>
- Murray, R., Candan, A., y Vázquez, D. (2019). Manual de postcosecha de frutas (R. Murray, A. Candan, y D. Vázquez, Eds.; 2º Edición revisada). <https://inta.gov.ar/documentos/manual-de-postcosecha-de-frutas>
- Nieto-Melo, L., y Bailon-Aijón, C. (2018). Evaluación de la germinación in vitro de *Epidendrum oxypetalum* HÁGSATER y *E. Santiago* en presencia de hongos micorrícicos aislados de orquídeas de ecosistemas altoandinos. *Ciencia: Desarrollo E Innovación*, 2(2), 11–16. <https://revistas.udca.edu.co/index.php/rcdi/article/view/481>
- O'Donnell, K., Ward, T., Robert, V. A. R. G., Crous, P., Geiser, D., y Kang, S. (2015). DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. *Phytoparasitica*, 43(5), 583–595. <https://doi.org/10.1007/s12600-015-0484-z>
- Ordaz-Estrada, D. (2019). *Optimización del método clásico de digestión para la determinación de bismuto por absorción atómica*. [tesis de grado, Universidad Tecnológica de Manzanillo]. Repositorio digital. <http://utem.edu.mx/wp-content/uploads/2020/banco/tsuqai-2017-8.pdf>
- Ortiz-Gimeno, M. (2020). *Nuevos materiales con propiedades antifúngicas para el tratamiento postcosecha de cítricos*. [tesis de maestría, Universidad Politécnica de Valencia]. Repositorio institucional UPV. <http://hdl.handle.net/10251/152178>

- Pariona, N., Hermida-Montero, L., Mtz-Enriquez, A., Sánchez-Rangel, D., Carrión, G., López-Lima, D., Rosas-Saito, G., Rodriguez-Hass, B., y Duran-Barradas, Z. (2018). Síntesis de nanopartículas de cobre para el control de hongos fitopatógenos. *Revista ECIPerú*, 15(2), 109–115.  
<https://doi.org/10.33017/RevECIPeru2018.0017/Resumen>
- Pham, N. D., Duong, M. M., Le, M. V., Hoang, H. A. y Pham, L. K. (2019). Preparation and characterization of antifungal colloidal copper nanoparticles and their antifungal activity against *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora capsici*. *Comptes Rendus Chimie*, 22(11–12), 786–793.  
<https://doi.org/10.1016/j.crci.2019.10.007>
- Rivera, E. (2014). *Actividad antimicrobiana de nanopartículas de cobre y óxido de zinc contra bacterias y hongos fitopatógenos*. [tesis de grado, Universidad Autónoma Agraria San Antonio]. Repositorio digital.  
<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/6670>
- Salazar-González, C., Lagos-Mora, L., Díaz-Rodríguez, V., Mora-Chaves, S., y Betancourth-García, C. (2020). Caracterización de *Fusarium* sp. asociado con la pudrición basal de la cebolla de rama. *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*, 23(1), 2–8. <https://doi.org/10.31910/rudca.v23.n1.2020.1471>
- Shang, H., Ma, C., Li, C., Zhao, J., Elmer, W., White, J. C., y Xing, B. (2021). Copper Oxide Nanoparticle-Embedded Hydrogels Enhance Nutrient Supply and Growth of Lettuce (*Lactuca sativa*) Infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. lactucae. *Environmental Science and Technology*, 55(20), 13432–13442.  
<https://doi.org/10.1021/acs.est.1c00777>
- Taboada-Lugo, N. (2017). El zinc y el cobre: micronutrientes esenciales para la salud humana. *Acta Médica Del Centro*, 11(2), 79–83.
- Taylor, A. A., Tsuji, J. S., Garry, M. R., McArdle, M. E., Goodfellow, W. L., Adams, W. J., y Menzie, C. A. (2020). Critical Review of Exposure and Effects: Implications for Setting Regulatory Health Criteria for Ingested Copper. *Environmental Management*, 65(1), 131–159. <https://doi.org/10.1007/s00267-019-01234-y>
- Umaña-Castro, J., Orozco-Cayasso, S., Umaña-Castro, R., y Molina-Bravo, R. (2018). Identificación molecular y características fisiológicas de aislamientos de *Trichoderma* para el biocontrol de dos patógenos en la piña. *Revista de Ciencias Ambientales*, 53(1), 125–138. <https://doi.org/10.15359/rca.53-1.7>
- Usón-Colomer, P. (2017). *Aplicaciones de la nanotecnología en la industria alimentaria*. [tesis de maestría, Universidad de Zaragoza].  
<https://zaguan.unizar.es/record/76261?ln=es#>

- Vilaplana, R., Pérez-Revelo, K., y Valencia-Chamorro, S. (2018). Essential oils as an alternative postharvest treatment to control fusariosis, caused by *Fusarium verticillioides*, in fresh pineapples (*Ananas comosus*). *Scientia Horticulturae*, 238, 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.052>
- Wali, N. (2019). Pineapple (*Ananas comosus*). *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*, 367–373. doi:10.1016/b978-0-12-812491-8.00050-3
- Zambrano-Alban, P., y Merchan-Fuentes, V. (2019). *Polifenoles totales y actividad antioxidante en la cáscara de piña (Ananas comosus, L. Merrill) en dos variedades (Golden sweet y Cayena lisa)* [tesis de grado, Universidad de Guayaquil]. Repositorio institucional UG. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/43474>
- Zárate-Ochoa, E. (2022). *Síntesis de nanopartículas de cobre por el método de ALSL, y su uso potencial en inhibición de E. coli* [tesis de maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio institucional CICESE. <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3691>

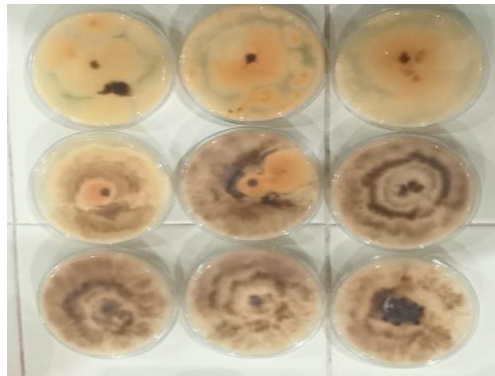
## ANEXOS

**Anexo A.** Obtención de micelios de *Fusarium* sp.

**Figura A1.** Piñas seleccionadas para el aislamiento de *Fusarium* sp



**Figura A2.** Purificación de micelios



**Figura A3.** Desinfección de piñas en alcohol



**Anexo B. Análisis in vitro**

**Figura B1.** Agar PDA preparado con cobre



**Figura B2.** Plaqueo



**Figura B3.** Cepa madre



## Anexo C. Desinfección de piñas

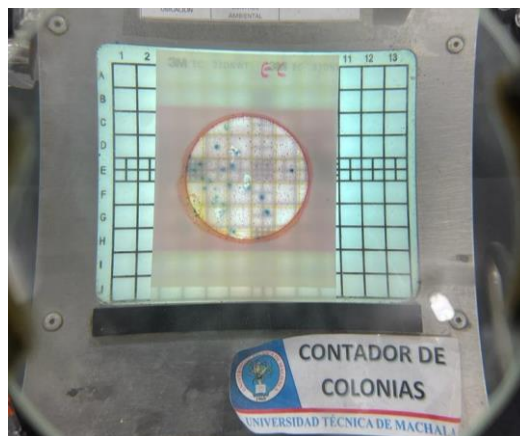
Figura C1. Placas Petrifilm



Figura C2. Piñas empleadas para la desinfección



Figura C3. Recuento de UFC



## Anexo D. Digestión ácida

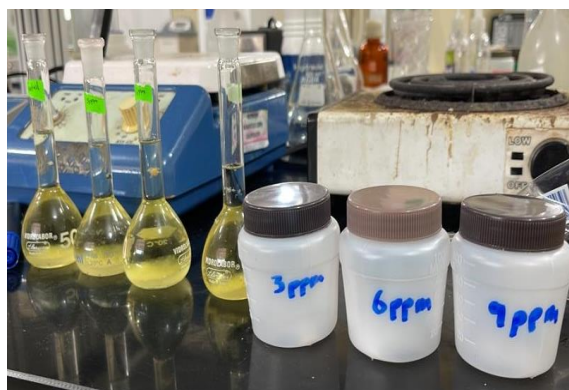
**Figura D1.** Muestra de piña seca triturada



**Figura D2.** Consistencia pastosa de las muestras acidificadas



**Figura D3.** Muestras obtenidas





**Anexo E. Análisis estadísticos**

**Tabla E1.** Crecimiento del micelio *in vitro* en cm

Tiempo (días)	Concentraciones			
	Control	3 ppm	6 ppm	9 ppm
0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
2	4,50 ± 0,5	3,40 ± 0,10	2,97 ± 0,25	2,50 ± 0,2
4	7,10 ± 0,65	5,23 ± 0,25	4,5 ± 0,30	3,33 ± 0,15
6	8,83 ± 0,76	7,20 ± 0,26	5,13 ± 0,32	4,23 ± 0,25
8	10,00 ± 0,65	8,30 ± 0,44	6,07 ± 0,90	4,93 ± 0,31

**Tabla E2.** UFC de *Fusarium sp* en piñas post cosecha día 0

Tiempo de inmersión (min)	Concentración (ppm)		
	3	6	9
3	18 ± 1,414 a	15,5 ± 0,707 a	9,5 ± 0,707 a
6	14 ± 1,414 b	11,0 ± 1,414 b	6,0 ± 1,414 b
9	9,5 ± 0,707 c	6,5 ± 0,707 c	3,5 ± 0,707 b

**Tabla E3.** UFC de *Fusarium sp* en piñas post cosecha día 5

Tiempo de inmersión (min)	Concentración (ppm)		
	3	6	9
3	9,5 ± 0,707 a	7 ± 0,000 a	4,5 ± 0,707 a
6	7,0 ± 0,000 b	4,5 ± 0,707 b	2,5 ± 0,707 b
9	4,5 ± 0,707 c	2,0 ± 0,00 c	0,5 ± 0,707 b

**Tabla E4.** Análisis de varianza ANOVA para 3 ppm día 0

<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón - F</b>	<b>Valor - P</b>
Entre grupos	146,333	2	73,1667	73,17	0,0028
Intra grupos	3,0	3	1,0		
Total (Corr.)	149,333	5			

**Tabla E5.** Análisis de varianza ANOVA para 6 ppm día 0

<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón - F</b>	<b>Valor - P</b>
Entre grupos	65,3333	2	32,6667	16,33	0,0244
Intra grupos	6,0	3	2,0		
Total (Corr.)	71,3333	5			

**Tabla E6.** Análisis de varianza ANOVA para 9 ppm día 0

<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón - F</b>	<b>Valor - P</b>
Entre grupos	36,0	2	18,0	36,00	0,0080
Intra grupos	1,5	3	0,5		
Total (Corr.)	37,5	5			

**Tabla E7.** Análisis de varianza ANOVA para 3 ppm día 5

<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón - F</b>	<b>Valor - P</b>
Entre grupos	25,0	2	12,5	37,50	0,0075
Intra grupos	1,0	3	0,33333		
Total (Corr.)	26,0	5			

**Tabla E8.** Análisis de varianza ANOVA para 3 ppm día 5

<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón - F</b>	<b>Valor - P</b>
Entre grupos	25,0	2	12,5	37,50	0,0075
Intra grupos	1,0	3	0,33333		
Total (Corr.)	26,0	5			

**Tabla E9.** Análisis de varianza ANOVA para 6 ppm día 5

<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón - F</b>	<b>Valor - P</b>
Entre grupos	25,0	2	12,5	75,00	0,0027
Intra grupos	0,5	3	0,16667		
Total (Corr.)	25,5	5			

**Tabla E10.** Análisis de varianza ANOVA para 9 ppm día 5

<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón - F</b>	<b>Valor - P</b>
Entre grupos	16,0	2	8,0	16,00	0,0251
Intra grupos	1,5	3	0,5		
Total (Corr.)	17,5	5			