

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Proyecto final de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos para
optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos

**Evaluación del potencial de infiltración de *Escherichia coli* ATCC 25922 durante el
proceso de lavado por inmersión del banano.**

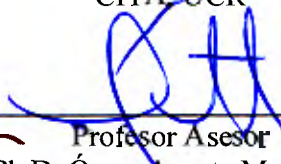
Karina Valverde Jiménez
B47215

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
Mayo, 2020


TRIBUNAL EXAMINADOR



Directora
Ph.D. Jessie Usaga Barrientos
CITA, UCR



Profesor Asesor
Ph.D. Óscar Acosta Montoya
CITA, UCR



Profesora Asesora
M.Sc. Carmela Velázquez Carrillo
CITA, UCR



Presidenta del Tribunal
Ph.D. Natalia Barboza Vargas
Escuela de Tecnología de Alimentos, UCR



Proesora designada
Licda. Gabriela Davidovich Young
Escuela de Tecnología de Alimentos, UCR

DEDICATORIA

A Dios y a mis padres,
porque gracias a ellos
he llegado hasta aquí.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primero a Dios por permitirme llegar hasta aquí, por multiplicar mis fuerzas, por su consuelo y el cuidado tan único, mostrándome su amor en cada detalle.

Papi por tanto apoyo, por darme las mejores palabras de motivación en momentos claves de mi vida. Mami por todo el amor incondicional y a ambos por sus invaluable oraciones. A mis hermanas porque son luz en mi vida, y sin ustedes no sería la misma.

Hen no terminaría de escribir en esta página las razones para agradecer, pero el conoce y ha estado en todas mis alegrías y frustraciones académicas, así que muchas gracias por escucharme, aconsejarme y abrazarme cuando necesitaba recargar energías.

Jessie, la mejor directora, muchas gracias por creer en mi y darme la oportunidad de realizar esta investigación, por guiarme y enseñarme tanto con su ejemplo, al profe Óscar por su paciencia para enseñar, por aclararme tantas dudas. A ambos muchas gracias porque siempre que salía de su oficina me sentía motivada y retada a dar lo mejor. Nunca voy a olvidar el apoyo que recibí de ustedes. A la profesora Carmela por sus correcciones y su valioso aporte para mi formación como profesional.

Tabatha, gracias por estar siempre, Marco por sus oraciones y apoyo. Los amigos que conocí en la UCR como María, muchas gracias por tantas veces aceptarme en su aparta y corazón, a Aliz le agradezco tanta ayuda durante la carrera, TA nos hizo grandes amigas, Monse por las conversaciones en nuestros viajes a la U, Fer mi mejor compañera de proyecto y amiga, Dani tantas estudiadas y risas, Karlis por los momentos lindos que compartimos, Ronald porque no faltaron sus ocurrencias que me hacían reir y todos con los que compartí en alguno o muchos momentos, clases o almuerzos.

Muchas gracias Vanny, Tati, Alonso, Geova, Nela, Luis, Randall y Alexa por su ayuda, a todos los que fueron mis profesores de la Escuela de Tecnología de Alimentos y del CITA.

ÍNDICE GENERAL

TRIBUNAL EXAMINADOR.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	ix
1. JUSTIFICACION.....	1
2. OBJETIVOS.....	6
3. MARCO TEÓRICO	7
3.1. Situación actual de la industria bananera en Costa Rica	7
3.2. Controles básicos para garantizar la inocuidad de productos frescos	7
3.3. Manejo postcosecha del banano	9
3.4. Calidad del agua en fincas bananeras	10
3.5. Generalidades del proceso de infiltración de microorganismos en frutas y vegetales	11
3.6. Factores que afectan la infiltración microbiana.....	13
3.7. Desinfección de frutas y vegetales frescos	16
3.8. Mecanismos de desinfección del hipoclorito de sodio y etanol	18
3.9. Propiedades antimicrobianas en la cáscara de banano	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
4.1. Localización.....	21
4.2. Comparación de la eficacia de tres métodos para eliminar <i>E. coli</i> ATCC 25922 de la cáscara de banano.	21
4.2.1. Preparación del inóculo	21
4.2.2. Inoculación de las muestras	21
4.2.3. Tratamientos para eliminar <i>E. coli</i> de la cáscara del banano.....	22
4.2.4. Recuento de <i>E. coli</i>	23

4.3.	Evaluación del efecto del gradiente de temperatura sobre el potencial de infiltración de <i>E. coli</i> ATCC 25922 en banano durante el proceso de lavado.	24
4.3.1.	Preparación del inóculo	24
4.3.2.	Calentamiento e inoculación de la fruta	24
4.3.3.	Tratamiento de desinfección.....	25
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
5.1.	Eficacia de tres tratamientos para eliminar <i>E. coli</i> ATCC 25922 de la cáscara de banano	27
5.2.	Efecto del gradiente de temperatura sobre el potencial de infiltración de <i>E. coli</i> ATCC 25922 en banano durante la operación de lavado por inmersión.....	32
6.	CONCLUSIONES.....	41
7.	RECOMENDACIONES	42
8.	BIBLIOGRAFÍA	43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro I. Estudios realizados de infiltración de microorganismos en frutas y vegetales..	14
Cuadro II. pH de las soluciones de hipoclorito de sodio empleadas en los tratamientos de desinfección de la superficie del banano.	27
Cuadro III. Poblaciones de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, en el agua a 25°C que se empleó para sumergir los bananos (agua inoculada), en la cáscara de los bananos después de la inoculación (control cáscara), y en la cáscara de la fruta después de la desinfección (desinfección cáscara) para las tres temperaturas de banano estudiadas (25, 30 y 35 °C). Promedios ± desviaciones estándar (n=5).	33
Cuadro IV. Poblaciones de microorganismos en el interior de bananos, correspondientes a los controles negativos de los ensayos de infiltración.	35
Cuadro V. Poblaciones de microorganismos en el interior de bananos para las tres temperaturas estudiadas (25, 30 y 35°C), posterior a la inmersión en agua a 25°C inoculada.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Descripción gráfica de las secciones de bananos partidos en el centro geométrico.	26
Figura 2. Poblaciones de <i>E. coli</i> ATCC 25922 en el agua utilizada para inocular los clusters de banano (agua inoculada), y en las muestras de clusters de banano inoculados sin tratamiento de desinfección (control) y con tratamientos (T1: hipoclorito de sodio 0,9%, T2: etanol 70%, T3: hipoclorito de sodio 0,9% y etanol 70%). LC: límite de cuantificación, LD: límite de detección. Barras corresponden a promedios y barras de error a desviaciones estándar (n=3). Letras diferentes sobre las barras indican que los promedios de las poblaciones son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p < 0,05$).	28

ABREVIATURAS

%:	Porcentaje	CTS:	Caldo Tripticasa Soya
ΔT:	Diferencial de temperatura	FDA:	<i>US Food and Drug Administration</i>
ATCC:	<i>American Type Culture Collection</i>	FSMA:	<i>Food Safety Modernization Act</i>
ATS:	Agar Tripticasa Soya	LD:	Límite de detección
BPA:	Buenas Prácticas Agrícolas	LC:	Límite de cuantificación
CDC:	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>	NMP:	Número más probable
CFR:	Código de Regulaciones Federales (por sus siglas en inglés)	PROCOMER:	Promotora de Comercio Exterior
CITA:	Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos	UFC:	Unidades formadoras de colonias
CORBANA:	Corporación Bananera Nacional		

RESUMEN

Valverde Jiménez, Karina Brigith

Evaluación del potencial de infiltración de *E. coli* ATCC 25922 durante el proceso de lavado por inmersión del banano.

Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. – San José, Costa Rica.

Valverde Jiménez, K., 2020.

60 h.: 2 il. – 65 refs.

El presente estudio tuvo como objetivo principal evaluar el potencial de infiltración de *E. coli* ATCC 25922, dado un gradiente de temperatura y tiempo de exposición, durante el proceso de lavado por inmersión del banano. Fue necesaria la selección previa de un tratamiento de desinfección de la superficie de la fruta, posterior a la inoculación y antes de proceder a realizar algún corte, para reducir las posibilidades de internalización de microorganismos que se encuentran en la superficie.

Se simularon las condiciones de lavado de las fincas bananeras en una escala de laboratorio donde se inocularon bananos por inmersión en agua con *E. coli* ATCC 25922. Estos bananos se sometieron a tres tratamientos de desinfección superficial, hipoclorito de sodio al 0,9%, etanol al 70%, e hipoclorito de sodio al 0,9% seguido por etanol al 70%. Los tratamientos de desinfección evaluados reportaron reducciones mayores a 4,1; 3,0 y 4,2 log CFU/g, respectivamente. La población de *E. coli* reportada en la fruta, después de la desinfección e independientemente del tratamiento aplicado, se encontró por debajo del límite de cuantificación e incluso en algunos casos por debajo del límite de detección de la técnica aplicada. Sin embargo, debido al bajo costo, efectividad y considerando que es uno de los principales desinfectantes empleados en la industria alimentaria, se seleccionó como mejor tratamiento el hipoclorito de sodio al 0,9%.

Se realizó el estudio de infiltración de *E. coli* evaluando tres gradientes de temperatura entre el agua de lavado y la fruta (0, 5 y 10°C). Los bananos se inocularon en una suspensión acuosa de *E. coli* ATCC 25922, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0,9% acidificado con HCl 1 M y se realizó el recuento empleando la técnica de vaciado en placas de Petri con Agar Tripticasa Soya (ATS). Adicionalmente, se realizaron pruebas de confirmación en la parte superior del banano (extremo adherido a la corona donde estudios previos muestran un mayor potencial de infiltración de agua con tinta) mediante la técnica de número más probable (NMP). En términos generales, no se evidenció infiltración del microorganismo bajo las condiciones estudiadas, exepctuando limitados casos donde se sospecha de la presencia de microorganismos en la fruta aún previo de ejecutar el experimento y la inoculación. Estos resultados sugieren que los diferenciales de temperatura entre los bananos y el agua de inmersión evaluados no tienen un efecto en la infiltración de *E. coli* ATCC 25922 en esta fruta, según las condiciones evaluadas, por lo tanto, la operación de lavado por inmersión de los bananos durante 20 minutos corresponde a una operación segura siempre y cuando se garanticen las buenas prácticas agrícolas y una adecuada calidad microbiológica del agua que se utiliza.

BANANO, INFILTRACIÓN, *Escherichia coli* ATCC 25922, LAVADO, INMERSIÓN.

PhD. Jessie Usaga Barrientos

Escuela Tecnología de Alimentos

1. JUSTIFICACION

La industria bananera en Costa Rica ha experimentado un importante crecimiento reflejado en las divisas producidas cada año. Según estadísticas de la institución Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica (PROCOMER, 2018), el banano se mantiene a la cabeza de los principales productos comercializados del sector agrícola costarricense y durante el 2018 representó un 36% de participación en las exportaciones.

Debido a que el banano tiene un posicionamiento privilegiado en el ámbito agrícola nacional y se identifica como un motor de desarrollo económico y social en su área de influencia (CORBANA, 2011), es necesario conocer los desafíos a los cuales se enfrenta este cultivo y resolver posibles problemáticas relacionadas tanto con la calidad como la inocuidad del fruto, con el fin de garantizar la permanencia exitosa de este producto en el mercado mundial.

De manera tradicional, se ha considerado que una serie de pasos acumulativos como el lavado, el cepillado y la desinfección podrían lograr una reducción de los microorganismos, de tal manera que las frutas y vegetales frescos cumplan con el estándar reglamentario que la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) dispuso, la cual recomienda un estándar de reducción de 5 logaritmos del patógeno más resistente de interés para la salud pública. Posterior a esto, la FDA realizó investigaciones e hizo una búsqueda en la literatura publicada más relevante y obtuvo, en ambas indagaciones, que existe la posibilidad de que patógenos existentes en frutas y vegetales frescos, puedan internalizarse y sobrevivir dentro de los mismos (Welti *et al.*, 2002). Las investigaciones realizadas en ese entonces tenían como objetivo identificar los mecanismos por los cuales los microorganismos entran en los frutos, los tipos de organismos que se ha demostrado que pueden ingresar y los productos para los cuales la contaminación microbiana es un problema potencial (FDA, 2017).

El fenómeno de infiltración de bacterias en frutas y vegetales frescos ha sido objeto de estudio durante muchos años y se ha demostrado que puede ocurrir en tomates (Bartz & Showalter, 1981; Bartz, 1982; Ibarra, *et al.*, 2004; Turner, *et al.*, 2016; Xia, *et al.*, 2012), manzanas (Buchanan, *et al.*, 1999), aguacates (Chen, *et al.*, 2016), naranjas (Eblen, *et al.*, 2004), melones (Macarisin, *et al.*, 2017), mangos (Penteado, *et al.*, 2004) y lechugas (Solomon, *et al.*, 2002). Esto se debe a factores como el grado de madurez del fruto, al resultado de la presión hidrostática que se ejerce debido a la profundidad de la inmersión de la fruta (Bartz & Showalter, 1981), al tiempo de inmersión del producto durante el lavado, al diferencial de temperatura entre la fruta y el agua de la suspensión (Bartz, 1982), entre otros.

Existe la preocupación de que los microorganismos internalizados no pueden ser removidos de la fruta, es decir, que estén protegidos contra el estrés ambiental y no pueden ser inactivados fácilmente por desinfectantes de superficie. Dentro del alimento, la mayoría de los microorganismos están ubicados en espacios intercelulares rodeados de una humedad relativa casi saturada que permite el desarrollo de sus actividades metabólicas aeróbicas (Sapers *et al.*, 2005).

En la actualidad, se ha demostrado que los microorganismos pueden ingresar a los vegetales frescos a través de daños en la estructura natural como heridas, cortes y fracturas de los tejidos. Estas lesiones pueden ocurrir durante la maduración, recolección y el procesamiento. Por su parte, Bartz y Showalter (1981), demostraron que los tomates con cicatrices frescas del tallo son más vulnerables a la infiltración que los tomates con cicatrices viejas y también demostraron que los tomates verdes y rosados son más susceptibles a la infiltración con agua que los frutos rojos tratados de manera similar. Por su parte, la captación excesiva de agua puede producir grietas en los frutos que ocasionan el ingreso de bacterias patógenas. La porosidad de las heridas en los tejidos vegetales, a menudo cambia con el tiempo debido a procesos de curación que implican la lignificación de capas celulares; estos cambios restauran la herida, proporcionan características similares a las de la capa intacta de la superficie del fruto y brindan impermeabilidad contra la pérdida de agua y la penetración de materiales particulados (Sapers *et al.*, 2005).

Buchanan y colaboradores (1999) estudiaron la susceptibilidad de las manzanas a la contaminación microbiana transmitida por el agua, descubriendo que cuando las frutas calientes (22°C) se sumergían en agua más fría (2°C) contaminada con *E. coli* O157:H7, condición que podría ocurrir en las operaciones normales de procesamiento donde el agua en los tanques de inmersión no se mantiene higiénica, se podría generar una infiltración del patógeno.

El fenómeno de infiltración de microorganismos también fue estudiado por Zhuang y colaboradores (1995), ellos obtuvieron que los tomates absorbieron un mayor número de células de *Salmonella* spp. de un ambiente acuoso cuando los frutos se colocaron en agua con una temperatura 15°C más fría que los frutos. Complementando esta teoría, Bartz y Showalter (1981) encontraron que al sumergir los frutos en agua más fría, se crea un diferencial de temperatura negativo, los tomates absorbían del 1 al 4% del peso de la fruta en agua del ambiente y la mayor parte de la captación de agua parecía estar en el área vascular debajo de la cicatriz del tallo. Además del diferencial de temperatura, Bartz (1982) demostró que, la cantidad de agua que absorbe el fruto del ambiente de lavado depende de la profundidad de la inmersión de la fruta. El autor encontró que la infiltración estaba influenciada tanto por el fenómeno del diferencial de temperatura como por la presión hidrostática. En su estudio, se observó una correlación positiva entre la captación de agua y la profundidad de la fruta durante la inmersión.

Debido a las observaciones antes presentadas, en el presente estudio se planteó el interés de investigar si algunas de estas variables también podrían potenciar la infiltración de microorganismos durante la operación de lavado por inmersión de banano. Estudios preliminares no publicados, mediante el empleo de un modelo de agua con tinta, estimaron la posibilidad de un alto potencial de infiltración de agua en bananos, y es por este motivo que se requiere conocer con mayor certeza si los microorganismos también podrían ingresar a la fruta, simulando las condiciones que se emplean en la actualidad en la industria bananera costarricense.

Cabe señalar que para realizar un estudio de infiltración en frutas y vegetales frescos, es de suma importancia garantizar la desinfección de la superficie de la fruta antes de proceder a realizar algún corte, lo anterior permite reducir las posibilidades de contaminación cruzada de microorganismos que se encuentran en la superficie y que podrían internalizarse. Existen estudios donde se emplean distintos métodos de desinfección de fruta bajo contextos similares (Bartz & Showalter, 1981; Bartz, 1982; Ibarra, *et al.*, 2004; Chen, *et al.*, 2016; Eblen, *et al.*, 2004; Macarisin, *et al.*, 2017; Penteado, *et al.*, 2004; Solomon, *et al.*, 2002; Turner, *et al.*, 2016; Xia, *et al.*, 2012). De ahí que en el presente estudio se trabajó para identificar un método efectivo para desinfectar la cáscara del banano posterior a su inmersión en un ambiente acuoso inoculado. Asimismo, en la industria bananera de Costa Rica, el banano ingresa al proceso de lavado (con el objetivo de eliminar el latex de la fruta) en la planta de producción a temperatura ambiente. Según datos reportados en los últimos 5 años en 14 estaciones bananeras colaboradoras de CORBANA, esta temperatura es significativamente mayor que la del agua de los tanques de lavado. Diversos estudios demuestran que un mayor diferencial de temperatura entre el agua de lavado y la fruta representa un potencial incrementado de infiltración de microorganismos (Buchanan *et al.*, 1999; Zhuang *et al.*, 1995; Bartz & Showalter, 1981). Debido a esta realidad, se evaluó además el efecto que posee el gradiente de temperatura sobre el potencial de infiltración de *E. coli* en banano durante el proceso de lavado de la fruta por inmersión.

Como se detalló antes, la literatura demuestra que existe un alto potencial de infiltración de patógenos en distintas frutas y vegetales frescos durante la operación de lavado, sin embargo, a la fecha existe únicamente un estudio publicado que señala el potencial de infiltración de microorganismos en banano (Girón *et al.*, 2019). No obstante, en el estudio mencionado no se consideró la evaluación del tipo de desinfectante empleado en la superficie de la fruta ni el efecto del gradiente de temperatura sobre el potencial de infiltración. Dada la importancia que representa el banano para Costa Rica en materia económica y con el fin de evitar un evento desafortunado que comprometa la inocuidad y calidad de este fruto durante las prácticas postcosecha como el lavado, se realizó la presente investigación.

Con el principal motivo de que Costa Rica continúe manteniéndose en la cúpula de los países exportadores de banano a nivel mundial, resulta necesario que la industria bananera nacional, tenga las herramientas y el conocimiento que demuestre, con alta rigurosidad científica, si este fruto podría verse afectado por la infiltración de microorganismos durante la exposición de la fruta a un ambiente acuoso. Es importante destacar que el presente estudio formó parte de un proyecto de investigación titulado “Potencial de infiltración de microorganismos patógenos durante el proceso de lavado de banano por inmersión y cinéticas de sobrevivencia de *Salmonella entérica*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7 durante la maduración del fruto”, inscrito ante la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica; el cual pretende conocer si microorganismos patógenos podrían infiltrarse en banano. Por tanto, los resultados obtenidos en este trabajo son de extrema relevancia como base previa a la ejecución de los experimentos con bacterias patógenas planteados en el marco de esa investigación.

2. OBJETIVOS

2.1. General

- Evaluar el potencial de infiltración de *E. coli* ATCC 25922, dado un gradiente de temperatura y tiempo de exposición, durante el proceso de lavado por inmersión del banano.

2.2. Específicos

- Comparar la eficacia de tres tratamientos para eliminar *E. coli* ATCC 25922 de la cáscara de banano para un estudio de evaluación del potencial de infiltración del microorganismo en la fruta durante su lavado.
- Evaluar el efecto del gradiente de temperatura sobre el potencial de infiltración de *E. coli* ATCC 25922 en banano durante 20 minutos de lavado por inmersión.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Situación actual de la industria bananera en Costa Rica

El sector bananero costarricense tiene gran prestigio a nivel nacional e internacional. Este cultivo recibió la primera Indicación Geográfica del país y de Latinoamérica, lo que representa un sello distintivo que identifica la calidad de la fruta (CORBANA, 2019). En cuanto a exportaciones, Costa Rica exportó cerca de 125 millones de cajas de banano en el año 2018, cada una con un peso aproximado de 18,14 kg equivalentes a 2 267 500 toneladas métricas. Para el año 2019 se registró un decrecimiento del 3,8% en los volúmenes de exportación si se compara con el 2018, debido a factores ambientales y climáticos (La República, 2020). Los principales destinos de exportación corresponden a Estados Unidos y la Unión Europea. Del total de la producción de banano de exportación, la Unión Europea adquirió un 43,3% de la fruta mientras que Estados Unidos un 38% (PROCOMER, 2020). Otros países como Iraq, Rusia, Noruega, Turquía, Ucrania y Montenegro recibieron en total un 20% del banano costarricense. De acuerdo con estadísticas reportadas por la Corporación Bananera Nacional (CORBANA), el área de producción bananera en Costa Rica se incrementó un 0,45% entre el año 2017 y 2018; lo cual equivale a 43 050 hectáreas. El país tiene uno de los niveles de productividad bananera más altos en el mundo, alcanzando 2 894 cajas por hectárea en el 2018. En cuanto a los beneficios del sector bananero, en el año 2019 el ingreso por las exportaciones de este producto alcanzó los \$980 millones. La industria bananera representa una importante fuente de empleo con uno de los índices de ocupación laboral más altos de toda la industria agrícola ya que genera aproximadamente 40 000 empleos directos y cerca de 100 000 plazas indirectas en actividades ligadas, lo cual permite al obrero bananero permanecer empleado durante todo el año (CORBANA, 2019).

3.2. Controles básicos para garantizar la inocuidad de productos frescos

Debido al consumo de alimentos contaminados, en Estados Unidos se estiman 48 millones de casos de enfermedades por año, 128 000 hospitalizaciones y 3 000 muertes. Dentro de las bacterias reportadas como causantes se encuentra *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*. y *E. coli* O157:H7 (CDC, 2020; Scallan *et al.*, 2011). Dada esta problemática, la Administración

de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) promulgó la Ley de Modernización de la Inocuidad de los Alimentos (FSMA por sus siglas en inglés) la cual establece estándares para el cultivo, cosecha, empaque y almacenamiento de frutas y vegetales (21 CFR 112) necesarios para asegurar la producción de alimentos inocuos mediante la implementación de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) y de manufactura en la industria (BPM) (FDA, 2019).

Las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) agrupan principios, normas y recomendaciones técnicas aplicables a la producción, procesamiento y transporte de alimentos; su importancia radica en la reducción de los peligros de contaminación en los productos con el fin de proteger la salud pública, medio ambiente y mantener la competitividad. Mediante una agricultura y desarrollo rural sostenible, las BPA se orientan hacia la mejora continua y de su aplicación depende el ingreso de los productos a mercados tanto locales como internacionales con alta exigencia (Izquierdo & Rodríguez, 2006).

Los riesgos de infiltración de microorganismos en frutas y vegetales pueden minimizarse mediante un análisis de riesgos y puntos críticos de control y su implementación en los sistemas de producción. Los objetivos finales de dicho programa consisten en evitar la penetración de agua en los tejidos de las plantas, el contacto de los cultivos con microorganismos peligrosos, las heridas en las superficies de las plantas y las situaciones que pueden causar la penetración de líquidos en las aberturas de la superficie de las plantas (FAO, 2002). Particularmente los cultivos destinados al consumo crudo nunca deben tratarse, regarse, lavarse o enfriarse con agua de baja calidad. Los campos deben estar cercados para mantener alejados a los animales domésticos o salvajes (Bartz & Brecht, 2003). Los trabajadores de campo deben evitar cosechar un cultivo si están enfermos. Trabajar con plantas congestionadas de agua crea un peligro especial y debe evitarse. Los cultivos producidos deben resistir el desarrollo de grietas de crecimiento u otras características que permitan la penetración de microorganismos (Sapers *et al.*, 2005).

3.3. Manejo postcosecha del banano

El proceso de postcosecha de banano generalmente se lleva a cabo en las plantas empacadoras y abarca las etapas de recepción y evaluación del racimo, desmane, lavado, desleche, selección y clasificación, desinfección y protección de las coronas, pesaje y empaque (Jaramillo, 2018).

En la planta empacadora se inicia el proceso con una inspección detallada de la fruta, la cual consiste de un muestreo para obtener registros de edad, peso, calibración, longitud del dedo y defectos de la fruta. Posterior a esto se procede a desmanar y dividir en *cluster* con 4 a 8 dedos, de acuerdo a las especificaciones del mercado, y se colocan en tanques de lavado o descarga donde se da, de manera simultánea, el proceso de lavado y desleche (o remoción del látex) de la corona provocada por los cortes realizados durante el desmane. El proceso de lavado consiste en sumergir los *clusters* o manos de banano con la corona hacia abajo en tanques con agua limpia y una cantidad mínima de hipoclorito de sodio y alumbre de potasio con el fin de reducir el exceso de latex y eliminar posibles residuos de suciedad y agroquímicos. Los *clusters* son transportados por un flujo de agua continuo desde un extremo del tanque hasta el otro donde se selecciona y clasifica la fruta, este recorrido dura entre 10 y 15 minutos (Jaramillo, 2018).

La Ley FSMA en los Estados Unidos (importante destino de exportación de banano costarricense) exige por ejemplo una inspección frecuente de los tanques de lavado o descarga los cuales deben contar con un diseño higiénico que permita la limpieza y desinfección adecuada y minimizar la acumulación de suciedad o partículas orgánicas que potencien el desarrollo de microorganismos. Es importante que las plantas empacadoras de banano cuenten con programas de control de plagas con su respectivo monitoreo con el fin de evitar que animales o plagas ingresen a la planta. La FDA además, impide la cosecha de productos que se encuentren contaminados de manera visible como por ejemplo con excrementos de animales; para ello es necesario una evaluación visual de la fruta. En cuanto al material de empaque empleado para el transporte de la fruta, se establece que debe ser de

un solo uso o lavables con el fin de impedir el crecimiento o transferencia de microorganismos al producto (21 CFR 112) (FDA, 2019).

3.4. Calidad del agua en fincas bananeras

El agua es un recurso básico en la industria bananera y su presencia es indispensable en toda la producción desde el riego de la plantación, el lavado de la fruta y utensilios, hasta el aseo de los colaboradores y de las instalaciones. Su potabilidad en las distintas operaciones de cosecha y postcosecha es indispensable para evitar la contaminación del banano con microorganismos patógenos, principalmente de origen fecal o con sustancias químicas no deseadas como jabones, detergentes, metales pesados o residuos de agroquímicos. Debido a esto, es indispensable realizar análisis microbiológicos y fisicoquímicos periódicamente. Además, dentro de los controles del agua utilizada, es necesaria la cloración con el fin de asegurar la calidad microbiológica, monitoreando los niveles de cloro residual en distintos puntos del proceso (Moreno *et al.*, 2009).

La ley FSMA de los Estados Unidos por ejemplo establece que todo el agua agrícola debe asegurar la calidad sanitaria adecuada para su uso previsto, se debe evitar que el sistema de distribución de agua sea una fuente de contaminación para los productos y realizar inspecciones para identificar cualquier condición que sea probable que introduzca peligros previsibles en las frutas. Para ello, la administración de agua debe aplicar procedimientos de cambio de agua para el agua recirculada, un control visual de la acumulación de material orgánico como tierra y desechos de las frutas y un control de la temperatura del agua con el fin de minimizar la posibilidad de infiltración de microorganismos de importancia para la salud pública (21 CFR 112) (FDA, 2019).

Un método común de enfriamiento de frutas y vegetales, después de su cosecha, es el hidrogenfriamiento, el cual consiste de un proceso de inmersión del vegetal en agua fría con el objetivo de eliminar el calor del campo (Inestroza *et al.*, 2016). Al emplear este método es importante considerar que la potabilidad del agua es necesaria para el aseguramiento de la

calidad e inocuidad de la fruta después del proceso de inmersión, la FDA (2019) establece como requisito la ausencia de *E. coli* detectable en 100 mL de agua. El agua utilizada para manipular o lavar frutas debe ser continuamente desinfectada durante la jornada de trabajo, especialmente si el agua se recircula, además el desinfectante debe estar presente desde el momento en que la fruta entra en contacto con el sistema de agua para minimizar las posibilidades de infiltración de microorganismos peligrosos (Sapers *et al.*, 2005).

A pesar de las exigencias existentes acerca de la potabilidad del agua, los patógenos presentes en las frutas frescas recién cosechadas se podrían acumular en los sistemas de manipulación del agua tales como los tanques de lavado y especialmente si hay recirculación del agua. Muchos de los problemas de contaminación posteriores a la cosecha se deben al uso incorrecto de medidas de sanitización. El agua de mala calidad puede ser una fuente directa de contaminación y un importante vehículo de diseminación de microorganismos y, cada vez que entra en contacto con la fruta, existe la posibilidad de contaminación por infiltración, esto incluye el agua utilizada para la producción y el lavado del producto fresco y la utilizada en las empacadoras incluso durante el transporte. La gravedad del riesgo resultante de una mala calidad de agua depende del tipo y número de microorganismos presentes y su capacidad para sobrevivir en el producto (Rushing *et al.*, 2012).

3.5. Generalidades del proceso de infiltración de microorganismos en frutas y vegetales

La superficie de las frutas y vegetales que crecen en el campo proveen un hábitat para una variedad de microorganismos incluyendo bacterias, mohos y levaduras. Los patógenos entéricos humanos pueden estar presentes en la superficie de los alimentos frescos y existe un mecanismo mediante el cual pueden internalizarse en los productos, denominado infiltración bacteriana. La misma ocurre cuando existe un medio acuoso en contacto con la superficie de las frutas o vegetales como el rocío, el agua de lluvia, el agua de riego o de lavado de los productos, por lo tanto, la prevención de la contaminación del agua es crucial para el control de la internalización de las bacterias en los productos, a los cuales de manera

eventual les puede ingresar agua por factores como diferenciales de temperatura o corrientes de agua, y de esa manera se mejore su vida útil (Lamikanra *et al.*, 2005).

De acuerdo con Sapers y colaboradores (2005), las plantas están cubiertas por una capa protectora de polímeros incrustados en ceras que es relativamente impermeable a la penetración o pérdida del agua, intercambio de gases y penetración de partículas. En la superficie de la planta, hay estructuras que permiten el intercambio de gases requerido para el metabolismo vital. Por lo tanto, para que ocurra una infiltración, los microorganismos deben penetrar directamente la capa superficial o entrar a través de una herida del fruto. Lamikanra y colaboradores (2005) señalan que la hidrofobicidad de las células bacterianas mejoran la adhesión a las superficies cerosas de las plantas.

Las aberturas superficiales naturales como los estomas y lenticelas son claves para la internalización de microorganismos. Los estomas se producen en la epidermis de todas las partes aéreas de las plantas y las lenticelas son porciones especializadas del peridermo; estas estructuras funcionan en el intercambio gaseoso (Sapers *et al.*, 2005). Zhuang y colaboradores han demostrado que las bacterias ingresan a las hojas de las plantas a través de los estomas y a ciertas frutas a través del cáliz o la cicatriz del tallo. Ersoy y colaboradores (2008) indican que las lenticelas proporcionan una conexión entre el ambiente interno y externo de las frutas, ellos estimaron que en bananos hay aproximadamente 480 lenticelas/cm² y en cítricos alrededor de 1 400 lenticelas/cm². La cantidad de lenticelas en la superficie de la fruta es vital para mantener la calidad de la fruta ya que los tejidos con alto número de lenticelas generalmente pierden agua y se deterioran con rapidez. Algunas investigaciones han encontrado bacterias presentes de manera esporádica en lenticelas de frutas maduras intactas como manzanas (Burnett *et al.*, 2000).

Las heridas en las frutas también pueden comunicar los espacios internos de aire con el ambiente externo. Dichas heridas pueden surgir por factores como acción de insectos, tormentas, equipos de cosecha y otros. Tanto el crecimiento normal de la fruta como la excesiva absorción de agua pueden producir grietas en la superficie de las frutas. La

porosidad de las heridas frente al intercambio gaseoso y humedad cambia con el tiempo debido a procesos de cicatrización de los tejidos. Estos cambios usualmente restauran rápidamente las heridas, formando una impermeabilidad a la pérdida de agua o penetración de partículas; similar a un tejido sano (Kolattykudy, 1984).

La infiltración puede ser de tipo activa o pasiva, la infiltración pasiva implica que los microorganismos son transportados al apoplasto debido al contacto con algún objeto que causa lesión o por penetración de aberturas por agua, aerosoles o partículas que contienen los microorganismos. En la infiltración activa, los patógenos penetran directamente a través de la cutícula o indirectamente a través de estomas, lenticelas, hidátodos o heridas. Las suspensiones acuosas de microorganismos pueden infiltrarse en las aberturas de la superficie o heridas de las frutas de forma espontánea (Schonherr & Bukovac, 1972) o por diferenciales de presión a través de los estomas que comunican el apoplasto y el entorno externo (Bartz & Showalter, 1981).

Una combinación de ceras y pelos epidérmicos ayudan a evitar que los estomas se obstruyan con agua como resultado de las lluvias o rocío. A pesar de que las ceras repelen el agua y disminuyen el riesgo de infiltración, algunas bacterias patógenas y virus podrían dispersarse como aerosoles impulsados por el viento e internalizarse a través de estructuras como las lenticelas o los estomas abiertos (Sapers *et al.*, 2005).

3.6. Factores que afectan la infiltración microbiana

Diversos estudios mostrados en el Cuadro I demuestran los factores que influyen en la infiltración de microorganismos en una variedad de frutas y vegetales, entre ellos se encuentra principalmente el diferencial de temperatura entre el agua de inmersión y la fruta, el tiempo de exposición al agua contaminada, aberturas en la superficie de las frutas, porosidad de la superficie de la fruta y la presión hidrostática ejercida por la profundidad de la inmersión.

Cuadro I. Estudios realizados de infiltración de microorganismos en frutas y vegetales.

Producto	Inóculo	Desinfección de superficie	Principal resultado	Referencia
Aguacate	<i>Listeria monocytogenes</i>	Inmersión en 1,5 litros de hipoclorito de sodio al 0,525%, durante 5 minutos, seguido de dos lavados posteriores con agua desionizada estéril y secado.	Se demostró la infiltración de <i>L. monocytogenes</i> después de 15 días de almacenamiento a 4°C mediante dos métodos distintos de inoculación (puntual e hidrofriamiento)	(Chen, et al., 2016)
Lechuga	<i>Escherichia coli</i> O157:H7.	Inmersión en etanol al 80% por 5 segundos, seguido de inmersión en HgCl ₂ al 0,1% por 5 o 10 minutos. Seguido de lavado por duplicado con agua estéril	Se demostró la infiltración de <i>Escherichia coli</i> O157:H7, la cual migra al tejido vegetal a través del sistema de raíces y parte de la porción comestible de la lechuga protegiéndose de la acción de los agentes desinfectantes.	(Solomon, et al., 2002)
Mangos	<i>Salmonella</i> sp.	Inmersión en 1 litro con hipoclorito de sodio (2g/L) a 22°C, por 1 minuto, seguido de un secado con aire en una capilla. Posterior desinfección con etanol al 70% con secado con aire seco.	Se evaluó la infiltración del microorganismo en mangos verdes y maduros almacenados a tres temperaturas (10, 20, 30°C) durante una semana, después de una inmersión en agua a 47°C y una segunda inmersión en agua a 21°C. Se demostró la infiltración, la cual ocurrió principalmente en la región cercana al tallo. Se observó que el grado de madurez, la temperatura y tiempo de almacenamiento no tienen un efecto significativo en la frecuencia de infiltración o sobrevivencia interna de <i>Salmonella</i> sp. en mangos.	(Penteado, et al., 2004)
Mangos	<i>Salmonella</i> sp.	Inmersión 1 Litro de hipoclorito de sodio al 2% a 21°C por 10 minutos. Seguido de lavado con agua destilada estéril a 22°C. Secado al aire en una capilla.	Se evaluó la infiltración del microorganismo durante el proceso de tratamiento hidrotérmico en tres secciones distintas del mango después del almacenamiento a dos temperaturas (8 y 22°C) y dos tiempos (24 y 144 h). La infiltración ocurrió principalmente en la región cercana al tallo por lo que se demuestra que la ruta de entrada es en dicha región. El crecimiento de la bacteria y sobrevivencia es menor a menores temperaturas.	(Branquinho, et al., 2006)
Manzanas	<i>Escherichia coli</i> O157:H7.	Inmersión en 2000 mg/L de hipoclorito de sodio durante 1 minuto	Fruta caliente (22°C) sumergida en agua fría (2°C) ocasionalmente internalizó el patógeno. Colorante no se infiltra si la fruta se encuentra a menor temperatura que el agua.	(Buchanan et al., 1999).
Melones	<i>Listeria monocytogenes</i>	Inmersión en bolsas Ziploc con 2 litros de hipoclorito de sodio al 1% durante 15 minutos con un masaje periódico. Seguido de un lavado por triplicado con agua desionizada estéril.	Se evaluaron factores como la presencia o ausencia de tallo en los melones, la variedad del cultivo, y un diferencial de temperatura de 36°C (fruta a 42°C, agua a 6°C) y ΔT=0 (fruta a 18°C, agua a 18°C). Se obtuvo que la incidencia del microorganismo infiltrado es afectada por la presencia o ausencia de tallo en el melon pero no por la variedad. Se demostró infiltración tanto en ausencia como en presencia de un ΔT.	(Macarasin, et al., 2017)
Naranjas	<i>Escherichia coli</i> O157:H7. <i>Salmonella</i> sp.	Inmersión en agua a 80°C durante 1 minuto.	Se demostró la infiltración de bacterias patógenas a través de agujeros en la superficie de las naranjas y se obtuvo que la supervivencia y el crecimiento de los patógenos puede ocurrir dentro de las naranjas.	(Eblen, et al., 2004)
Tomates	<i>Serratia marcescens</i> <i>Erwinia carotovora</i> <i>Pseudomonas marginalis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Inmersión en hipoclorito de sodio 0,5%, 30 segundos, seguido de secado utilizando toalla húmeda con etanol al 95%	Los microorganismos se infiltran en tomates que son sumergidos en suspensiones bacterianas con un diferencial negativo de temperatura de -14°C (agua a 22°C, fruta a 36°C). El incremento de peso se relacionó con la infiltración bacteriana. Las frutas con cicatrices de tallo frescas son más vulnerables a la infiltración que las que presentan cicatrices viejas. La presión hidrostática, debida a la profundidad de la inmersión, se relacionó con una mayor infiltración.	(Bartz & Showalter, 1981)
Tomates	<i>Salmonella Typhimurium</i> <i>Escherichia coli</i> O157:H7.	Inmersión en etanol al 95%, seguido de flameado tres veces.	Se evaluó la sobrevivencia y pocas células de las bacterias analizadas sobrevivieron en el centro del tomate a temperatura ambiente durante 72 horas de almacenamiento..	(Ibarra, et al., 2004)
Tomates	<i>Salmonella</i> sp.	Aspersión con etanol al 70% seguido de un secado con toalla de papel saturada con etanol al 70%.	El estudio demostró que el diferencial de temperatura (-5,6, +5,6 y 0°C) y la variedad del tomate afectaron la infiltración bacteriana. Entre mayor es el tiempo que pasa después de retirar el tallo menor es la cantidad de microorganismos infiltrados.	(Xia, et al., 2012)
Tomates	<i>Salmonella</i> sp.	Aspersión con etanol al 95% y secado con toalla saturada con etanol al 95%. Secado al aire durante 10 minutos.	Las poblaciones de microorganismos infiltrados no fueron significativamente diferentes en los diferenciales de temperatura evaluados (-5, +5 y 0°C). Las poblaciones de microorganismos infiltrados fueron muy bajas. El tiempo de inmersión fue más importante en la infiltración de la bacteria que el diferencial de temperatura.	(Turner, et al., 2016)

De manera general, se ha demostrado que al aumentar la profundidad de la fruta durante la inmersión y el diferencial de temperatura entre las frutas y agua de lavado, se incrementa el riesgo de infiltración de agua y microorganismos, dado que durante el enfriamiento de frutas se condensa el vapor caliente, el cual crea un vacío que atrae el agua hacia el producto a través de las aberturas (Bartz y Showalter, 1981).

Además del diferencial de temperatura entre el agua y la fruta, la permeabilidad y el contenido de humedad de la fruta también afectan la velocidad del flujo de agua que es impulsado por la presión. Una cicatriz del tallo seca con menor porosidad puede propiciar la absorción de agua a través de la acción capilar. Esta observación deja de lado el carácter hidrofóbico de una cicatriz de tallo seco que repele el agua, y supone que está lo suficientemente congestionada con agua como para absorberla a través de fuerzas capilares (Smith *et al.*, 2006).

Según lo estudiado por Warning y colaboradores (2016), una cicatriz del tallo reciente promueve la absorción de agua cuando hay un diferencial de temperatura. Cuando no hay un diferencial de temperatura positivo o negativo, hay poca ganancia de humedad, ya que el transporte es dominado por la difusión. Sin embargo, si la fruta posee un contenido bajo de humedad, se infiltrará una cantidad significativa de agua ya que se tendrá un alto gradiente de humedad que promueve la difusión y el flujo de agua impulsado por la presión. El enfriamiento lento, como sería el caso de un coeficiente de transferencia de calor más bajo, reduce la infiltración de agua, ya que los gradientes de presión desarrollados también son más bajos.

Las frutas o vegetales sumergidos en agua están expuestos a una presión hidrostática en la superficie del producto igual a la profundidad total de la inmersión. Las presiones hidrostáticas serían aditivas a los diferenciales de presión asociados con el enfriamiento, pero contrarrestarían aquellos asociados con el calentamiento. Las presiones hidrostáticas se ejercen de manera más rápida que las asociadas con los cambios de temperatura (Sapers *et al.*, 2005). Cabe destacar que el enfriamiento de frutas y verduras conduce a una reducción

de las presiones de gas internas, particularmente si las aberturas de la superficie están obstruidas con líquido. Este diferencial de presión persistiría hasta que las temperaturas internas y las presiones de gas se equilibren con el entorno externo (Corey & Tan, 1990).

La presión hidrostática no solo fuerza directamente el agua hacia las aberturas de la superficie, sino que también tienden a oprimir las frutas ocasionando que salga aire de las aberturas. Cuando se elimina la presión hidrostática, es probable que el producto se expanda a su volumen original, lo que lleva a un diferencial de presión interno que podría extraer agua en el vegetal (Sapers *et al.*, 2005).

La literatura reporta que las grietas en la superficie de las frutas y vegetales producidas durante la maduración podrían proporcionar sitios de infiltración de microorganismos, los cuales requieren un medio acuoso para ingresar. Los cambios de temperatura, la lluvia, el cultivo de frutas susceptibles a agrietamiento y programas de fertilización ricos en nitrógeno y deficientes en potasio se relacionan con grietas de crecimiento en frutas. Los microorganismos pueden infiltrarse en tejidos de frutas que poseen grietas de manera natural como en el caso de los melones (Macarisin *et al.*, 2017).

3.7. Desinfección de frutas y vegetales frescos

Según la FDA (2019), la desinfección en frutas y vegetales frescos, por definición, debe consistir en un proceso capaz de destruir las células vegetativas de microorganismos que son peligrosos para la salud pública y efectiva en reducir sustancialmente el número de otros posibles microorganismos indeseables. Además, se tiene como requisito que el tratamiento no afecte de manera adversa el alimento y no arriesgue la salud del consumidor (21 CFR 110.3).

El hipoclorito de sodio se ha usado para la desinfección en el procesamiento de alimentos desde hace muchas décadas, es el desinfectante más utilizado en la industria alimentaria y sigue siendo uno de los desinfectantes más convenientes debido a su bajo costo y su eficiencia

contra muchos patógenos transmitidos por alimentos, velocidad de acción y estabilidad para minimizar los peligros de infiltración en plantas empacadoras. Adicionalmente, los residuos del agua clorada se disipan rápidamente de las frutas y vegetales o resultan ser sales inofensivas (Parish *et al.*, 2006). De acuerdo con Beuchat (1998), la concentración máxima autorizada de hipoclorito de sodio en el lavado de frutas y hortalizas en el comercio es de 2 000 mg/L.

Algunos investigadores han demostrado que el cloro podría reaccionar con materia orgánica en agua y formar compuestos carcinogénicos (Parish *et al.*, 2006), por lo que otros investigadores han propuesto alternativas de procesos de desinfección en frutas y vegetales como el uso de hipoclorito de sodio acidificado, el peróxido de hidrógeno, ácido peracético, nisina, ozono, ácido láctico, ácido acético, alcohol etílico y otros. Los estudios previos sobre este tema reportan diversos resultados ya que la acción bactericida asociada con un tratamiento de desinfección depende del tipo de fruta, tipo de microorganismo en cada fruta o vegetal desinfectado, concentración de desinfectante empleado, tiempo de exposición, carga inicial microbiana y otros factores adicionales (Mani *et al.*, 2016).

Ciertas investigaciones demuestran que la cloración del agua aumenta la porosidad de las cicatrices del tallo en algunas frutas (Bartz, 1988) y otras investigaciones han demostrado la ineficacia del cloro a 100 ppm o más para eliminar *Salmonella* Montevideo en heridas o cicatrices del tallo de tomates contaminados (Zhuang *et al.*, 1995)

Desafortunadamente, las aguas cloradas no son eficaces contra ciertos parásitos y no permiten erradicar completamente los microorganismos infiltrados en frutas o vegetales (Sapers *et al.*, 2005). El cloro activo en solución reacciona con los tejidos dañados en frutas y vegetales provocando que los patógenos no sean expuestos a una dosis crítica del desinfectante (Ukuky & Fett, 2004).

3.8. Mecanismos de desinfección del hipoclorito de sodio y etanol

El hipoclorito de sodio actúa sobre los microorganismos inhibiendo las reacciones enzimáticas y provocando la desnaturalización de las proteínas. Se ha demostrado que el ácido hipocloroso (HClO) es el responsable de la destrucción de los microorganismos ya que es la forma con mayor potencial de oxido-reducción (Diomedi *et al.*, 2017). En soluciones acuosas, el ácido hipocloroso (HOCl) está en equilibrio con su forma disociada, el ión hipoclorito (ClO⁻). El equilibrio químico y por lo tanto el tiempo de acción antimicrobiano depende de la concentración y el pH de la solución. El motivo por el cual aumenta la efectividad cuando el pH es inferior al neutro (7,0) es debido a que el cloro existe exclusivamente como ácido hipocloroso (HOCl), la forma germicida del cloro (Black & Barach, 2018). De manera típica, valores de pH entre 6,0 y 7,5 son los necesarios para minimizar la corrosión de los equipos con una eficacia de desinfección adecuada (Parish *et al.*, 2006).

De acuerdo con Parish y colaboradores (2006), la concentración de ácido hipocloroso es significativamente afectada por la temperatura, presencia de materia orgánica, luz, aire y metales. Uno de los mayores desafíos con el uso de cloro como desinfectante es que disminuye rápidamente su efectividad al entrar en contacto con la materia orgánica. La cantidad de cloro total que se añade al agua se conoce como dosificación de cloro. Sin embargo, generalmente el agua posee impurezas inorgánicas y orgánicas y se requiere una demanda de cloro inicial que reaccione con dichas sustancias; el cloro también se combina con sustancias nitrogenadas y forma cloraminas con propiedades microbicidas más débiles. El cloro residual libre resulta de la cantidad de cloro agregado después de que la demanda de cloro ha sido satisfecha (Garmendia & Vero, 2006).

La acción antimicrobiana ocurre cuando el ácido hipocloroso entra en contacto con las proteínas tisulares de los microorganismos, produciendo hidrógeno, formaldehído y acetaldehído. Las cadenas peptídicas se rompen para disolver las proteínas de los microorganismos. En este proceso, el hidrógeno es sustituido por el cloro con formación de

cloramina, que interviene directamente como antimicrobiano, ya que interfiere en la acción oxidativa celular con inactivación enzimática irreversible en la degradación de lípidos y ácidos grasos de los microorganismos (Sanchez *et al.*, 2009).

Los alcoholes por su parte, actúan destruyendo la membrana celular de los microorganismos, por reducción de su tensión superficial y desnaturalización de las proteínas. Su eficacia está basada en la presencia de agua, ya que así penetra mejor en las células y bacterias permitiendo el daño a la membrana y rápida desnaturalización de las proteínas, con la consiguiente interferencia con el metabolismo y lisis celular. Su acción es rápida, incluso desde los 15 segundos de exposición, principalmente en concentraciones de 70% lo que permite su mejor penetración en el protoplasma bacteriano. Los alcoholes poseen un alto espectro de rápida acción contra bacterias Gram negativas y Gram positivas. Sin embargo, no destruyen esporas por lo que no se recomiendan para esterilización, pero sí son habitualmente usados para desinfección de superficies (Diomedi *et al.*, 2017).

3.9. Propiedades antimicrobianas en la cáscara de banano

La cáscara de banano ha sido estudiada en los últimos años debido a su capacidad antimicrobiana. Según su composición proximal, contiene distintos grupos fitoquímicos como flavonoides, taninos, aceites y grasas, los cuales poseen importantes aplicaciones como antioxidantes, bactericidas, nutricionales y funcionales. Se han identificado fracciones y grupos fitoquímicos responsables de la actividad antimicrobiana que generan un efecto inhibitorio en el halo de crecimiento de bacterias tales como *Staphylococcus aureus* y *E. coli*. Las familias de compuestos fitoquímicos responsables de la actividad antimicrobiana de las cáscaras de banano corresponden a esteroides, triterpenos, flavonoides, taninos no hidrolizables y condensados, saponinas y compuestos fenólicos principalmente (Pilco *et al.*, 2018).

Adicionalmente, la cáscara de banano contiene compuestos como vitamina A, vitamina C, galocatequina, dopamina, vitamina E, vitamina B6, ácido málico, ácido succínico, ácido

palmítico, magnesio, fósforo, potasio, hierro y fibra. Los ácidos grasos presentes en la cáscara de banano también son considerados responsables de su actividad antimicrobiana. Además, se ha evidenciado que la extracción acuosa de la cáscara de banano muestra actividad antibacteriana contra diferentes bacterias Gram positivas y Gram negativas (Ghani *et al.*, 2013).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Localización

Los experimentos se realizaron en los laboratorios de química y microbiología del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) y los análisis de número más probable (NMP) de *E. coli* se ejecutaron en el Laboratorio de Alimentos de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica. Los tres laboratorios se ubican en la Ciudad Universitaria Rodrigo Facio de la Universidad de Costa Rica, San Pedro, Montes de Oca.

4.2. Comparación de la eficacia de tres métodos para eliminar *E. coli* ATCC 25922 de la cáscara de banano.

4.2.1. Preparación del inóculo

Se tomó una colonia aislada de *E. coli* ATCC 25922, se colocó en 9 mL de caldo Trypticase Soya (CTS), se incubó por 5 ± 1 h a 35 ± 2 °C y luego se transfirió a un Erlenmeyer provisto con un volumen superior de caldo Trypticase Soya (CTS) de 400 mL, y se incubó a 35 ± 2 °C por 18 ± 2 h en una incubadora con agitación a 200 rpm para obtener un inóculo en fase estacionaria (Usaga, *et al.*, 2014).

4.2.2. Inoculación de las muestras

Se inoculó agua desionizada, tal como lo indica el estudio de Macarisin *et al.* (2017), con un cultivo de *E. coli* ATCC 25922, en fase estacionaria, para alcanzar una población aproximada de 7 logaritmos del microorganismo en el agua que se utilizó para simular el lavado del banano. Se realizó el estudio por triplicado (tres repeticiones independientes) para cada uno de los tratamientos (desinfectante o combinación de los mismos a utilizar, según se indica en la sección 4.2.3), de manera que en el agua previamente inoculada, se sometieron al proceso de inmersión simulando un lavado, cuatro *clusters* (agrupaciones de 4 bananos) de bananos variedad Cavendish, con grado cero de madurez y 12 semanas de cosecha, durante 20 minutos (tiempo mínimo establecido por la industria bananera nacional, según CORBANA,

para la eliminación de látex de la fruta). Uno de los *clusters* se empleó como control inicial, el cual no se sometió a ningún tratamiento de desinfección posterior a la inoculación. Los recuentos obtenidos a partir de este *cluster* se utilizaron posteriormente para calcular las reducciones logarítmicas resultantes de los tratamientos de desinfección. Los tres *clusters* restantes se emplearon en cada uno de los tres tratamientos. En los siguientes apartados se detalla el procedimiento de recuento.

4.2.3. Tratamientos para eliminar *E. coli* de la cáscara del banano

Considerando que se han realizado estudios previos acerca de métodos para desinfectar la superficie de otras frutas previo a la ejecución de un ensayo de infiltración, para el presente estudio con bananos, se evaluaron tres tratamientos: hipoclorito de sodio alrededor del 1% (0,9% concentración real aplicada) (Macarisin, *et al.*, 2017); etanol al 70% (Xia, *et al.*, 2012); e hipoclorito de sodio a alrededor del 1% (0,9% concentración real aplicada) (Macarisin, *et al.*, 2017) seguido por etanol al 70% (Xia, *et al.*, 2012). Con el fin de lograr la mayor efectividad de la desinfección del hipoclorito de sodio, se procedió a acidificar la solución con HCl 1 M hasta lograr un pH aproximado de 7,0. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente (alrededor de 25 °C, temperatura regular del laboratorio de Microbiología).

Se tomó cada *cluster* de banano previamente inoculado (procedimiento detallado en sección 4.2.2) y se colocó en un baño de inmersión con cada tratamiento (desinfectante) durante 5 minutos; tiempo reportado como efectivo para la eliminación de 5 logaritmos de algunos patógenos en superficies de frutas en ensayos similares de infiltración (Chen, *et al.*, 2016; Solomon, *et al.*, 2002). Para el caso del tratamiento que combina dos desinfectantes, se procedió a sumergir 5 minutos en hipoclorito de sodio al 0,9% seguido inmediatamente de 5 minutos adicionales en etanol al 70%, para un total de 10 minutos de desinfección.

Finalizado el tiempo de inmersión, se colocaron los bananos dentro de una bolsa de *Stomacher* con agua peptonada estéril al 0,1% para lograr una proporción 1:10 y se masajé la superficie de la fruta por al menos 1 minuto (Eblen, *et al.*, 2004; Ibarra, *et al.*, 2004).

4.2.4. Recuento de *E. coli*

Partiendo de la dilución antes preparada (1:10), se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada estéril al 0,1%. Se determinó el recuento de *E. coli*, empleando la técnica de vaciado en placas de Petri con Agar Trypticase Soya (ATS), por duplicado. Seguidamente, se incubaron las placas solidificadas a 35 ± 2 °C por 24 ± 2 h (Buchanan *et al.*, 1999). Al finalizar el periodo de incubación, se realizó un conteo visual de las placas con recuentos entre 25 y 250 colonias.

4.2.5 Análisis estadístico

Se empleó un diseño experimental de tipo irrestricto aleatorio, unifactorial, donde la variable independiente corresponde al tipo de desinfectante, realizando tres repeticiones del experimento. Se realizó inicialmente un análisis de varianza (ANDEVA), con el fin de determinar si hay diferencias entre los promedios de los recuentos de *E. coli* en los bananos inoculados y en los bananos luego de los tratamientos de desinfección. Posteriormente, se realizó un ANDEVA con el fin de determinar si hay diferencias entre los promedios de las reducciones logarítmicas obtenidas tras la aplicación de los tratamientos de desinfección. El análisis estadístico se realizó con el programa JMP® 9, estableciendo un nivel de confianza del 95%, con valores de P menores a 0,05 ($P < 0,05$). Al detectarse diferencias significativas entre los promedios de los recuentos de *E. coli*, se aplicó una prueba de comparación de medias (Tukey).

4.3. Evaluación del efecto del gradiente de temperatura sobre el potencial de infiltración de *E. coli* ATCC 25922 en banano durante el proceso de lavado.

4.3.1. Preparación del inóculo

Se preparó un inóculo de *E. coli* ATCC 25922, siguiendo la metodología descrita en la sección 4.2.1.

4.3.2. Calentamiento e inoculación de la fruta

Con el fin de simular las condiciones de temperatura en la fruta presentes en la industria bananera en Costa Rica, se evaluaron tres gradientes de temperatura entre la fruta y el agua de inmersión. De tal manera que se tenía un grupo de *clusters* previamente calentados en una incubadora a una temperatura interna de 25°C, otro a 30°C y otro grupo a 35°C. Se temperó agua a 25°C para simular las condiciones del agua de los tanques de lavado de las fincas bananeras. La temperatura interna de los bananos y la del agua de inmersión fue medida empleando un termómetro de espiga digital desinfectado. La medición de la temperatura de los bananos se realizó en el centro geométrico de uno de los 4 bananos del *cluster* inoculado, al ser una medición destructiva, el banano utilizado para esta determinación no fue empleado en el experimento. Estos gradientes de temperatura fueron seleccionados considerando las temperaturas máximas y mínimas del ambiente reportadas en los últimos 5 años en 14 estaciones bananeras colaboradoras de CORBANA.

En agua previamente inoculada, como se describe en la sección 4.2.2, se inocularon los *clusters* previamente calentados, manteniéndose en inmersión durante 20 minutos. Para cada diferencial de temperatura se seleccionaron dos bananos de un *cluster* que se emplearon como control para estimar el recuento inicial de *E. coli* en la cáscara, los cuales se sacaron del baño de inmersión y se colocaron en bolsas de *Stomacher* con agua peptonada estéril al 0,1%, siguiendo el procedimiento detallado en la sección 3.2.3. Se realizaron diluciones seriadas para estimar el recuento inicial como se describe en la sección 3.2.4.

4.3.3. Tratamiento de desinfección

Se sometieron tres *clusters* de bananos a un tratamiento de desinfección en hipoclorito de sodio al 0,9%, acidificado hasta un pH de $7,4 \pm 0,5$ que permitió garantizar la ausencia del microorganismo inoculado en la superficie de la fruta (condición definida luego de ejecutar y analizar los resultados del objetivo 1). Posterior a la inoculación y desinfección, uno de los *clusters* se masajeó en una bolsa de *Stomacher* con agua peptonada estéril (dilución 1:10) de la cual se montó el recuento detallado en la sección 4.2.4, para confirmar la ausencia del microorganismo en la cáscara posterior a la desinfección aplicada. Adicionalmente, se desinfectó otro *cluster* del mismo racimo de banano utilizado como control negativo. Los controles negativos corresponden a dos bananos en *cluster* que no se inocularon con *E. coli* ATCC 25922 pero sí se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0,9% acidificado a un pH de $7,4 \pm 0,5$. Los controles negativos se realizaron con el fin de determinar si los bananos, sin ser sometidos a una inoculación previa, poseían algún recuento de *E. coli* dentro de su pulpa. Tanto la cáscara de los controles negativos como de los *clusters* desinfectados fueron analizados mediante la técnica de NMP para *E. coli* en agua clorada; para este análisis se tomó una muestra de 100 mL del agua peptonada de la dilución 1:10 donde se encontraban los bananos y se aplicó la técnica descrita por Salfinger & Tortorello (2015).

Para evaluar la infiltración, se desinfectó otro *cluster* y se tomaron dos bananos para analizar. Todos los bananos del *cluster* de control negativo y del *cluster* para evaluar la infiltración se dividieron en dos partes (superior e inferior), como se muestra en la Figura 1, la sección superior corresponde a la mitad del banano que incluye el extremo unido a la corona, la sección inferior corresponde a la mitad del banano que incluye el extremo de la flor. El propósito de dividir en dos secciones cada uno de los bananos consistió en corroborar si, en caso de detectar infiltración en la parte interna del banano, esta ocurría por la parte superior, como lo demuestran las investigaciones que se han realizado en paralelo a este estudio con modelos de tinta, donde se observa que la misma se infiltra a través de la corona y por el sistema vascular del banano.

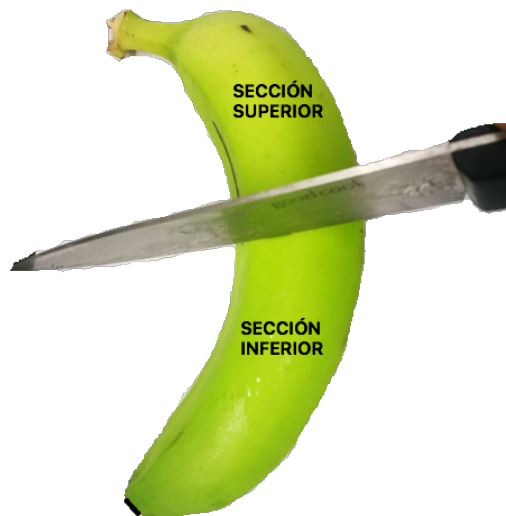


Figura 1. Descripción gráfica de las secciones de bananos partidos en el centro geométrico.

Las fracciones de los bananos se pelaron con cuchillos estériles y se colocaron en una bolsa de *Stomacher* con agua peptonada estéril al 0,1% en una relación de 1:10 para realizar las diluciones seriadas correspondientes que permitieran determinar el recuento final de *E. coli* en la pulpa del fruto. Este recuento se ejecutó tal como lo describe la sección 4.2.4 de este documento. Ambas secciones de la fruta fueron analizadas, de forma independiente, mediante recuento en placa con ATS, y adicionalmente se analizaron 100 mL del agua peptonada que originalmente contenía la sección superior del banano mediante la técnica de NMP para *E. coli* en agua clorada (Salfinger & Tortorello, 2015) para aumentar la confianza de los resultados de infiltración del patógeno. Los análisis de NMP fueron realizados por el Laboratorio de Alimentos de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

Se realizaron 5 repeticiones para cada uno de los 3 diferenciales de temperatura evaluados.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Eficacia de tres tratamientos para eliminar *E. coli* ATCC 25922 de la cáscara de banano

Para evaluar la eficacia del hipoclorito de sodio, fue necesaria su acidificación con el objetivo de lograr la mayor efectividad del desinfectante (Black & Barach, 2018). Se determinó el pH inicial de las disoluciones y ese valor se ajustó empleando ácido clorhídrico 1.0 M para la solución desinfectante aplicada en los tratamientos T1 (hipoclorito de sodio 0,9%) y T3 (hipoclorito de sodio 0,9% y etanol 70%). Los valores promedios de pH se destacan en el Cuadro II.

Cuadro II. pH de las soluciones de hipoclorito de sodio empleadas en los tratamientos de desinfección de la superficie del banano.

Tratamiento	pH*
Hipoclorito de sodio 0,9%, T1	6,7±0,6
Hipoclorito de sodio 0,9%, T3	6,5±0,8

* Promedios ± desviación estándar, n=3

Se recomienda un rango de pH para soluciones de cloro de 6,0 a 7,5 (Parish *et al.*, 2006) ya que se desea que el cloro se encuentre presente como ácido hipocloroso (HOCl) la forma germicida del cloro que provee una mayor efectividad (Black & Barach, 2018). Como es posible observar en el Cuadro II la acidificación se logró con los valores de pH recomendados.

La Figura 2 resume los resultados obtenidos de las poblaciones de *E. coli* en la superficie de las cáscaras de los bananos después de ser sometidos a los tratamientos de desinfección evaluados, comparados con la población inicial en el control y en el inóculo.

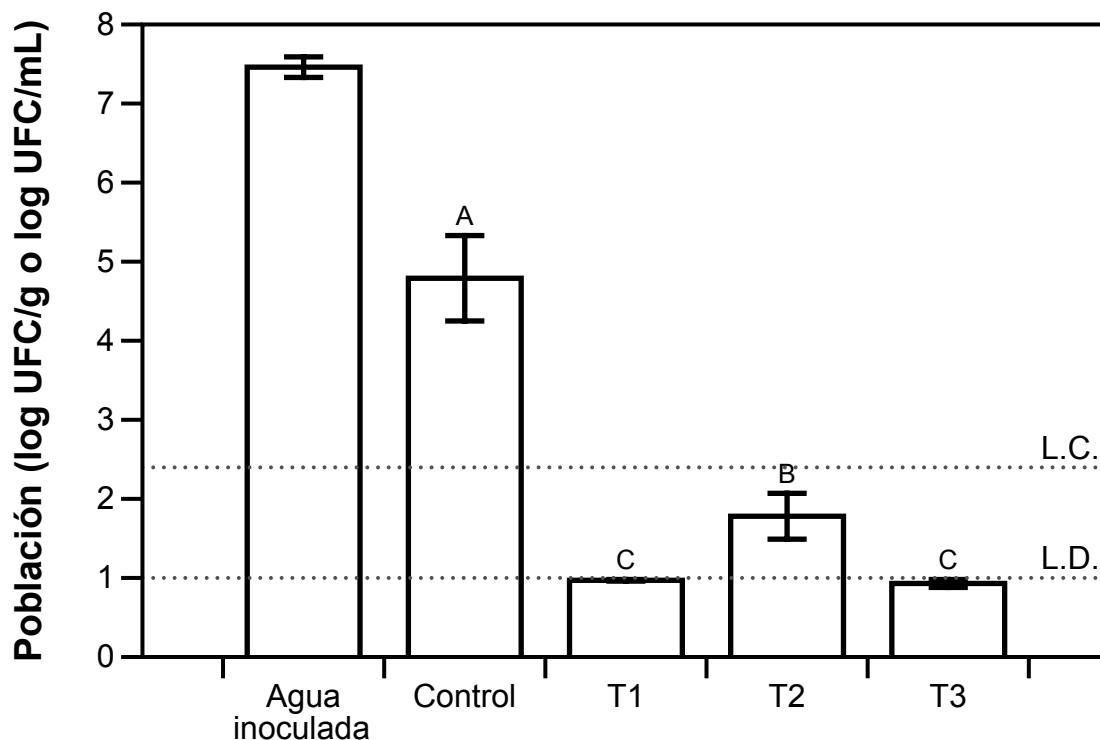


Figura 2. Poblaciones de *E. coli* ATCC 25922 en el agua utilizada para inocular los *clusters* de banano (agua inoculada), y en las muestras de *clusters* de banano inoculados sin tratamiento de desinfección (control) y con tratamientos (T1: hipoclorito de sodio 0,9%, T2: etanol 70%, T3: hipoclorito de sodio 0,9% y etanol 70%). LC: límite de cuantificación, LD: límite de detección. Barras corresponden a promedios y barras de error a desviaciones estándar ($n=3$). Letras diferentes sobre las barras indican que los promedios de las poblaciones son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $p<0,05$).

Tras la obtención de los resultados, se observó que en todos los casos los recuentos obtenidos de las poblaciones de *E. coli* ATCC 25922 en la cáscara de banano para cada uno de los tratamientos de desinfección, se encontraban por debajo del límite de cuantificación (LC) del método de recuento aplicado y en tres de los nueve experimentos realizados, los recuentos resultaron incluso por debajo del límite de detección (LD). Cabe destacar que se definió el LC inferior como la cantidad mínima confiable de colonias que se pueden determinar en una placa, que según los datos reportados por la FDA (2017), este límite corresponde a 25 UFC/mL en la menor dilución, lo cual equivale a 2,4 log UFC/mL. El LD por su parte, corresponde a 1 log UFC/mL (10 UFC/mL), basado en el crecimiento de una colonia en la placa correspondiente a la menor dilución (Sutton, 2011). Para el análisis de los datos, se

emplearon los recuentos obtenidos aunque estuviesen por debajo del LC (menos de 25 colonias en la menor dilución) y en el caso de que estuviesen por debajo del LD (ausencia de colonias en la menor dilución), se asignó un valor de 9 UFC/mL (que corresponde al valor máximo inferior a 10 UFC/mL, para obtener resultados conservadores). El ANDEVA mostró que hay diferencias significativas ($P < 0.0001$) entre los promedios de los recuentos de *E. coli* en los bananos inoculados (Control) y en los bananos luego de los tratamientos de desinfección (T1, T2 y T3). Los resultados de la prueba de Tukey se muestran en la Figura 2, donde se aprecia claramente que la población control es significativamente mayor que las resultantes luego de aplicar los tratamientos de desinfección. Además, se aprecia que no hay diferencia significativa entre los recuentos luego de aplicar T1 y T3, pero ambos son significativamente menores a los recuentos obtenidos luego de aplicar T2.

En promedio, las reducciones logarítmicas logradas al aplicar los tratamientos de desinfección corresponden a $3,8 \pm 0,5$; $3,0 \pm 0,8$ y $3,9 \pm 0,6$, para hipoclorito de sodio, etanol, y hipoclorito de sodio más etanol, respectivamente (promedio \pm desviación estándar, $n = 3$). El ANDEVA mostró que no hay diferencias significativas ($P = 0.2640$) entre los promedios de las reducciones logarítmicas obtenidas tras la aplicación de los tratamientos de desinfección.

A pesar de que la máxima solubilidad del hipoclorito de sodio se logra a una temperatura de 4°C (Parish *et al.*, 2006), en este estudio la temperatura del agua de inmersión correspondía a 25°C ya que se pretendía simular la temperatura del agua de lavado que se encuentra en los tanques de inmersión en las plantas de banano en Costa Rica, valor que según datos recolectados por CORBANA corresponde a aproximadamente 25°C.

De acuerdo con los resultados obtenidos (Figura 2, Cuadro I), es posible observar que tal y como indican los autores Black & Barach (2018), la acidificación del hipoclorito de sodio a un pH inferior al neutro (7,0), logra una efectividad óptima en la desinfección de frutas y vegetales. En este caso, se observa que en la superficie de cáscaras de banano, las reducciones logradas son incluso mayores que las reportadas en otros estudios de desinfección de frutas

y vegetales ya publicados. Por ejemplo, Park & Beuchatt (1999) obtuvieron que las poblaciones de *Salmonella* sp. y *E. coli* O157:H7 inoculadas en melones se redujeron en un rango de 2,6 y 3,8 log UFC/g cuando fueron expuestas a un tratamiento de 3 minutos con 2 000 ppm de hipoclorito de sodio. La mayor reducción asociada al experimento ejecutado se podría explicar por diferencias en las cáscaras de las frutas pues un melón muestra rugosidades que podrían servir como reservorios microbianos, característica que no se observa en la cáscara de banano.

En principio, se tenía la hipótesis de que la combinación de desinfectar primero la superficie de los bananos con hipoclorito de sodio y después con etanol y duplicar el tiempo de desinfección de 5 a 10 minutos generaría una reducción significativamente mayor que al emplear solo uno de los métodos de desinfección. Sin embargo, experimentalmente no se observó una diferencia significativa en la reducción logarítmica de *E. coli* lograda con la combinación de los tratamientos, al compararse con T1. Esto podría explicarse ya que el efecto que tiene la segunda desinfección con etanol no puede ser observado debido a que el hipoclorito de sodio redujo, tal como lo evidencian los resultados, la mayor población de microorganismos inoculados inicialmente en la cáscara. Estos resultados concuerdan con la investigación de Mani y colaboradores (2016), ellos observaron que al incrementar el tiempo de desinfección de la superficie de chiles de 5 a 120 minutos y la concentración de hipoclorito de sodio de 100 a 10 000 ppm, no se generan mayores reducciones en la población total de bacterias aerobias mesófilas, y explican que se debe probablemente a la débil interacción entre la solución de hipoclorito y la superficie cerosa de la fruta. En el caso del etanol al 70%, la reducción promedio obtenida en este estudio corresponde a $3,0 \pm 0,8$ log UFC/g. Este resultado es muy similar al obtenido en un estudio de desinfección de chiles donde se aplicó etanol al 70% durante 30 minutos de exposición y se logró una reducción de microorganismos mesófilos aerobios de 2,38 log UFC/g. En este estudio en particular, las reducciones con etanol resultaron mayores que con hipoclorito de sodio al 1% y se explica que podría deberse a la alta interacción que crea el etanol con la superficie cerosa de la fruta debido a su naturaleza anfífila (Mani *et al.*, 2016). Resultados similares reportados por Piernas & Guiraud (1997), indican que el proceso de desinfección de semillas de arroz con

10 000 ppm de hipoclorito de sodio da como resultado reducciones de 2,6 log UFC/g después de una inmersión durante 1 hora y al emplear etanol al 70% se obtuvo una reducción de 3,0 lo que contrasta con los resultados observados en bananos. Se han reportado también reducciones logarítmicas de *E. coli* y *S. enterica* en chiles (1,7 log UFC/g) menores a las observadas en la Figura 2 por parte del etanol al 70% como desinfectante (Perez *et al.*, 2012). Sin embargo, se debe tomar en cuenta que las diferencias obtenidas entre las reducciones demostradas en otros estudios y el presente, pueden deberse a las condiciones específicas de cada experimento como lo es el tiempo de exposición, el tipo de fruta desinfectada, la concentración de desinfectante y el tipo de microorganismo inoculado (Parish *et al.*, 2006).

En la Figura 2 es posible observar que las poblaciones finales de *E. coli* ATCC 25922 en la superficie de los bananos son similares para los tres tratamientos y debe considerarse que los valores son estimaciones, ya que los recuentos se encuentran por debajo del LC (incluso algunos por debajo del LD). Sin embargo, se eligió el hipoclorito de sodio 0,9% como desinfectante a aplicar en las superficies del banano para continuar con el estudio de infiltración debido a su efectividad, reducido costo y por ser uno de los desinfectantes más usados en la industria alimentaria (Parish *et al.*, 2006).

Cabe destacar que al emplear durante 5 minutos una concentración de 0,9% de hipoclorito de sodio acidificado y 70% de etanol, se logró observar un deterioro en la integridad de la cáscara de los bananos, es decir se percibían cambios en la coloración en la cáscara, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Mani y colaboradores (2016) donde al emplear las mismas concentraciones de hipoclorito de sodio y etanol se obtuvieron pérdidas en el color verde de los chiles evaluados. Es importante señalar que el objetivo de este estudio no estaba direccionado a emplear tales condiciones como tratamiento de desinfección de banano a nivel industrial, ya que como lo indica la FDA (2019), un tratamiento de desinfección debe garantizar una reducción del número de microorganismos patógenos sin comprometer la calidad del producto o la salud del consumidor. Otro factor que impide recomendar este tratamiento para la desinfección de rutina en la industria bananera es la concentración seleccionada de hipoclorito de sodio acidificado (0,9%), ya que según Beuchat (1998), la

concentración máxima autorizada de hipoclorito de sodio en el lavado de frutas y hortalizas en el comercio es de 2 000 mg/L, valor equivalente a 0,2%. Estudios realizados por Mani y colaboradores (2016), demuestran que el efecto de un tratamiento de desinfección en la calidad de una fruta depende del tipo de fruta, el tiempo de exposición y la concentración del desinfectante.

5.2. Efecto del gradiente de temperatura sobre el potencial de infiltración de *E. coli* ATCC 25922 en banano durante la operación de lavado por inmersión.

Se comprobó la efectividad de la desinfección de la superficie de la fruta posterior a la inoculación. Los resultados que lo respaldan se muestran en el Cuadro III. Todos los resultados obtenidos al analizar las muestras después de la desinfección corresponden a estimaciones, ya que los resultados en su totalidad (n=15) se encuentran por debajo del LC y la mayoría de ellos (n=8) se encuentran por debajo del LD. Esos recuentos, obtenidos mediante la técnica de vaciado en placa en ATS, corresponden a microorganismos que no se eliminaron de la cáscara durante la desinfección, los cuales podrían corresponder al microorganismo inoculado durante el experimento o a otros microorganismos presentes en la cáscara, previo a la inoculación. Cabe destacar que para aumentar la sensibilidad de la evaluación, tal como se detalló en la metodología, se realizó un análisis de número más probable (NMP) de *E. coli* en las muestras inoculadas y posteriormente desinfectadas, pero no se obtuvo ningún resultado positivo en la cáscara de ninguno de los bananos inoculados y posteriormente desinfectados. Estos resultados garantizan que la desinfección fue eficaz para la eliminación de *E. coli* e indican que los microorganismos detectados no corresponden a este microorganismo y que por ende, podrían ser otros microorganismos que se encontraban presentes en la fruta, crecen en ATS y además son resistentes al tratamiento de desinfección aplicado. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el objetivo 1 (Figura 1).

Cuadro III. Poblaciones de *Escherichia coli* ATCC 25922, en el agua a 25°C que se empleó para sumergir los bananos (agua inoculada), en la cáscara de los bananos después de la inoculación (control cáscara), y en la cáscara de la fruta después de la desinfección (desinfección cáscara) para las tres temperaturas de banano estudiadas (25, 30 y 35 °C). Promedios \pm desviaciones estándar ($n=5$).

Tratamiento	Temperatura (agua o banano)	Población (log UFC/g o log UFC/mL)
Agua inoculada	25°C	7,6 \pm 0,1
Control cáscara	35°C	4,9 \pm 0,9
Desinfección cáscara	35°C	0,9 \pm 0,2
Control cáscara	30°C	5,1 \pm 0,3
Desinfección cáscara	30°C	0,9 \pm 0,2
Control cáscara	25°C	4,5 \pm 0,7
Desinfección cáscara	25°C	1,1 \pm 0,5

Para el análisis de los datos, se emplearon los recuentos obtenidos aunque estuviesen por debajo del LC (menos de 25 colonias en la menor dilución) y en el caso de que estuviesen por debajo del LD (ausencia de colonias en la menor dilución), se asignó un valor de 9 UFC/mL (que corresponde al valor máximo inferior a 10 UFC/mL, para obtener resultados conservadores). Como se ha mencionado, ninguna de las cinco réplicas realizadas, de las tres temperaturas de banano estudiadas, sobrepasa el LC en el recuento obtenido posterior a la desinfección de la cáscara.

A partir de los resultados mostrados en el Cuadro III se puede inferir que las reducciones logarítmicas de la población de *E. coli* de la cáscara de los bananos inoculados corresponde a valores mayores a 4,0; 4,2 y 3,4 cuando los bananos se encontraban a una temperatura de 35, 30 y 25°C, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los reportados en el primer objetivo, en el cual el hipoclorito de sodio presentó una reducción de al menos 3,8 logaritmos del microorganismo inoculado. Cabe señalar que para el estudio de infiltración, se logró la

desinfección efectiva de la cáscara de los bananos la cual buscaba evitar la internalización de microorganismos presentes en la cáscara al interior de la pulpa durante el corte y pelado. Tal como se mencionó previamente, métodos similares de desinfección de frutas, para posteriores estudios de infiltración, han sido aplicados por diversos autores (Branquinho *et al.*, 2006; Macarisin *et al.*, 2017; Chen, *et al.*, 2016; Buchanan *et al.*, 1999) obteniendo resultados concordantes con lo observado en el presente estudio en melones, manzanas, mangos y aguacates desinfectados con hipoclorito de sodio. Cabe resaltar que aunque los resultados muestran que los recuentos en la superficie del banano son bajos, se empleó una práctica de corte y pelado que impidiese inocular el interior del banano, en caso que hubiese *E. coli* (u otros microorganismos) en la superficie de la fruta.

Los recuentos de microorganismos encontrados en el interior de las muestras de bananos no inoculados pero desinfectados en la superficie correspondientes a los controles negativos se evidencian en el Cuadro IV. Cabe destacar que en el caso de los análisis de *E. coli* por la técnica NMP (aplicado a las secciones superiores de las muestras de banano), no se reportó ningún resultado positivo. Por consiguiente, podría considerarse que cualquier microorganismo presente en el interior de las muestras, según los resultados mostrados en el Cuadro IV, no corresponde a *E. coli*.

Cuadro IV. Poblaciones de microorganismos en el interior de bananos, correspondientes a los controles negativos de los ensayos de infiltración.

Sección	Banano	*Población (log UFC/g)				
		R1	R2	R3	R4	R5
*Superior	1	0,9 ^a	0,9	1,5 ^b	0,9	0,9
*Superior	2	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
Inferior	1	0,9	0,9	2,9	0,9	0,9
Inferior	2	0,9	0,9	0,9	0,9	0,7 ^b

R: Repetición

a: Los valores 0,9 corresponden a ausencia de colonias en las placas de la menor dilución (10⁻¹).

b: El valor se encuentra por debajo del LC y por tanto corresponde a una estimación.

* La totalidad de las secciones superiores fueron analizadas para *E. coli* mediante NMP y no se reportaron resultados positivos en ninguna de ellas.

De las 5 repeticiones (realizadas por duplicado) de controles negativos, solamente uno de los bananos (R3) presentó resultados positivos tanto en la sección superior como en la inferior (Cuadro IV). En la sección superior de la fruta se obtuvo un recuento de 1,5 log UFC/g, el cual se encuentra por debajo del LC, y por lo tanto es una estimación (FDA, 2017). Es importante resaltar que esta misma sección se analizó mediante la técnica de NMP de *E. coli* y no se detectó la presencia de dicha bacteria por lo que el resultado obtenido en ATS podría indicar la presencia de un microorganismo diferente al inoculado. En el caso de la sección inferior del mismo banano que dio positivo en la sección superior, se obtuvo un recuento en placa de 2,9 log UFC/g, el cual se encuentra dentro del rango contable y es el único valor no estimado de los controles negativos realizados. Sin embargo, al ser un control negativo, no se puede señalar con seguridad el tipo de microorganismo encontrado ya que dichos microorganismos no fueron inoculados con *E. coli*, el microorganismo en estudio. Sumado a esto, el agar utilizado corresponde a un medio nutritivo y contiene dos peptonas que aportan nitrógeno orgánico, aminoácidos y péptidos donde se da el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos aerobios y no permite, exclusivamente, el crecimiento del

microorganismo de interés estudiado. En otro de los bananos (R5) se obtuvo un recuento positivo sin embargo el mismo es menor al LC y al encontrarse en la sección inferior no hay certeza del tipo de microorganismo presente. Sumado a esto, no se puede indicar que fue producto de una infiltración ya que no sigue la ruta de infiltración observada en los estudios con tinta realizados en paralelo.

Las 5 repeticiones de controles negativos realizadas corresponden a un total de 10 bananos y formaron parte del estudio propuesto en el que se evaluaron 5 repeticiones de control cáscara, desinfección cáscara e infiltraciones. Se obtuvieron datos de 12 controles negativos adicionales, en los cuales solamente uno de ellos presentó un recuento estimado ($>3,4 \log$ UFC/g), el cual excede el LC. Sin embargo, dicho recuento se obtuvo en la sección inferior del banano, lo que indica que puede deberse tal y como lo indican Sapers y colaboradores (2005), a una internalización microbiana debido a heridas en la cáscara porosas que permiten el ingreso de microorganismos en alguna etapa durante la cosecha o post cosecha. Los resultados obtenidos para los controles negativos sugieren que existe la posibilidad de que algunos microorganismos logren ingresar al interior del banano durante las prácticas normales de cultivo, cosecha y manejo en finca y no necesariamente por infiltración al ser sumergidos en medios acuosos; de ahí la importancia de proteger la fruta y mantener un control estricto de las BPA.

En el cuadro V se pueden observar los resultados obtenidos de los recuentos realizados en ATS para los tres diferenciales de temperatura entre la fruta y el agua evaluados.

Cuadro V. Poblaciones de microorganismos en el interior de bananos para las tres temperaturas estudiadas (25, 30 y 35°C), posterior a la inmersión en agua a 25°C inoculada.

Diferencial de Temperatura (°C)	Sección	Banano	*Población (log UFC/g)				
			R1	R2	R3	R4	R5
10	**Superior	1	0,9 ^a	0,9	0,9	0,9	0,9
	**Superior	2	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
	Inferior	1	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
	Inferior	2	0,9	2,2 ^b	0,9	0,9	>3,4 ^c
5	**Superior	1	0,9	0,9	1,8 ^b	0,9	0,9
	**Superior	2	0,9	0,9	0,7 ^b	0,9	0,9
	Inferior	1	0,9	0,9	0,9	>3,4 ^c	0,9
	Inferior	2	0,9	0,9	>3,4 ^c	0,9	0,9
0	**Superior	1	0,9	0,9	0,9	0,9	1,2 ^b
	**Superior	2	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
	Inferior	1	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
	Inferior	2	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9

R: Repetición

a: Los valores 0,9 corresponden a ausencia de colonias en la placa de la menor dilución (10^{-1}).

b: El valor se encuentra por debajo del LC y por tanto corresponde a una estimación.

c: El recuento en la dilución 10^{-1} se encuentra por encima del LC, pero no es contable y no se cuenta con resultados para la dilución 10^{-2}

* La totalidad de los valores obtenidos son estimados, ya que se encuentran por fuera del LC.

** La totalidad de las secciones superiores fueron analizadas para *E. coli* mediante NMP y no se reportaron resultados positivos en ninguna de ellas.

Como se observa en el cuadro V, en 3 (de un total de 30) ocasiones se detectaron recuentos positivos en la sección superior de algunos bananos; por lo que se sospechaba que la infiltración de *E. coli* sí hubiera ocurrido a través de la corona. Sin embargo, mediante la técnica de NMP, aplicada a las mismas muestras, se descartó que la infiltración ocurriera

durante la simulación del proceso de lavado dado que todos los resultados fueron negativos; indicando esto que los microorganismos detectados no corresponden a *E. coli* y que por ende, podrían haber ingresado a la fruta previo a la ejecución del experimento.

Los autores Turner y otros (2016) indican que la infiltración de suspensiones acuosas bacterianas a través del sistema vascular de una fruta se puede explicar por la ley general de los gases, la cual establece que cualquier cambio en la presión de un gas ideal atrapado en un contenedor con volumen constante es directamente proporcional al cambio de temperatura del gas. Bartz y Showalter (1981) también concuerdan con lo dicho ya que ellos señalan que a pesar de que las frutas no son contenedores completamente cerrados, si son enfriados, la disminución en la presión interna de gas permitiría una combinación de espacios vacíos en el interior de la fruta y un intercambio de fluidos desde el ambiente externo.

En el presente estudio y bajo las condiciones experimentales aplicadas, se logró determinar que un diferencial de temperatura de incluso 10°C entre el agua de lavado y la fruta no permite evidenciar la infiltración de *E. coli* ATCC 25922 en banano durante la operación de lavado por inmersión, lo que concuerda con lo establecido en estudios que indican que la mínima infiltración de microorganismos, debido a un diferencial de temperatura, ocurre cuando la temperatura del agua de inmersión es como máximo 10°C mayor que la temperatura de la fruta (Parish *et al.*, 2006).

Un estudio realizado en paralelo al presente, demuestra que aún cuando la temperatura del agua y los bananos es la misma (diferencial de temperatura igual a cero), ocurre infiltración de tinta a través del sistema vascular del banano. Este resultado concuerda con un estudio previo realizado por la FDA (2017) en naranjas que demuestra que existe la posibilidad de infiltración de tinta, cuando la temperatura entre el agua de inmersión y la fruta es la misma. Sin embargo, los datos mostrados en el Cuadro V demuestran que este fenómeno no ocurrió para el caso de infiltración de *E. coli*. De forma similar, Eblen y colaboradores (2004), al realizar el estudio de infiltración con *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* sp., observaron que no ocurrió infiltración de ambos microorganismos cuando las naranjas fueron sumergidas en

agua a la misma temperatura de la fruta. Los autores indican que las bajas frecuencias y niveles de internalización demostrados podrían estar influenciados por la capa cerosa que cubre las cáscaras de la fruta, además la severidad de la desinfección ya que emplearon una inmersión en agua a una temperatura de 80°C para desinfectar la superficie de las naranjas que pudo afectar también a los microorganismos infiltrados. En el caso de los bananos, además de la superficie cerosa de la cáscara, diversos estudios han demostrado que en la misma existen compuestos con propiedades antimicrobianas, los cuales también pudieron influir en el impedimento de la infiltración de *E. coli* ATCC 25922 (Ghani *et al.*, 2013; Pilco *et al.*, 2018). Otro de los factores que pueden explicar los resultados obtenidos es que antes de realizar la inoculación de los bananos, los *clusters* se desprendieron del ráquiz. Sin embargo, el tiempo tardado desde el desprendimiento de la fruta hasta la inoculación no fue evaluado como una variable en este estudio, y cabe la posibilidad de que ocurra el proceso de cicatrización de la corona, el cual podría impedir la infiltración de microorganismos. Varios investigadores señalan que entre mayor es el tiempo que pasa después de retirar el tallo, hay una reducción en la cantidad de microorganismos infiltrados debido a la porosidad de la cicatriz del tallo (Eblen, *et al.*, 2004; Xia, *et al.*, 2012).

Tal y como lo sugieren los resultados que se muestran en los Cuadros IV y V, existe la hipótesis de que algunos bananos desde la finca ya se encontraran infiltrados con algún otro tipo de microorganismo diferente de *E. coli*. Almed y colaboradores (1973) encontraron previamente que las frutas podrían ser deterioradas de diversas maneras durante la cosecha y ese daño provee oportunidades de internalización de microorganismos. Los daños como heridas, cortes o laceraciones pueden ser ocasionados por las herramientas durante la cosecha, también pueden ocurrir heridas producidas por las uñas del personal o la misma flor de los bananos podría lesionar otros (FAO, 2003). Buchanan y colaboradores (1999) han señalado que las frutas con cortes, o daños en la cáscara son más susceptibles a la infiltración bacteriana. Durante la cosecha de los bananos en el campo se lleva a cabo la desfloración y la eliminación temprana y manual de las estructuras florales y dedos para aumentar el desarrollo de la fruta. Estas etapas demandan en su totalidad de mano de obra y por ende, las condiciones higiénicas de las manos de los colaboradores constituyen otra posible fuente de

contaminación. Es por esto que resulta fundamental extremar las medidas de cuidado de la fruta en el campo y protegerla de golpes, evitar la presencia de animales como insectos y aves, la adecuada higiene del personal y el monitoreo de la calidad del agua en las distintas etapas para prevenir el riesgo de contaminación y la eventual internalización de microorganismos en las etapas postcosecha, ya que si los patógenos son internalizados en la pulpa del banano, los tratamientos de desinfección convencionales de frutas y vegetales no eliminarían el riesgo potencial de ocasionar una enfermedad en el consumidor (Penteado, *et al.*, 2004) o deterioro de la fruta.

Con base en los datos obtenidos en el presente estudio, para la industria bananera es de suma importancia conocer que los resultados sugieren que la operación de lavado/desleche, bajo las condiciones del estudio, no representa un potencial de infiltración de *E. coli*. A pesar de esto, otros estudios demuestran el riesgo de infiltración de microorganismos cuando existen diferenciales de temperatura o tiempos de inmersión mayores (Buchanan *et al.*, 1999; Bartz & Showalter, 1981) y los resultados obtenidos sugieren que la fruta podría estar contaminada con microorganismos incluso antes de someterla a un ambiente acuoso. Por lo tanto, es de suma importancia que en la industria se refuercen y aseguren las BPA, prestar especial atención al tratamiento para la potabilidad del agua y maximizar los controles adecuados para garantizar que el agua empleada para procesos de enfriamiento de la fruta, transporte o lavado/desleche sea de calidad sanitaria, libre de patógenos humanos tal y como lo establece la FDA en la subparte E del Código de Regulaciones Federales (21 CFR, 112).

6. CONCLUSIONES

- Aplicar hipoclorito de sodio al 0,9% acidificado durante 5 minutos, reduce la población de *E. coli* ATCC 25922 en la cáscara del banano de manera eficaz a un nivel por debajo del límite de cuantificación del método aplicado.
- Gradientes de temperatura negativos (fruta más caliente que agua) de 0, 5 y 10°C entre los bananos y el agua de inmersión no influyen en la infiltración de *E. coli* ATCC 25922 en banano durante una inmersión por 20 minutos.
- Bajo las condiciones del presente estudio, se concluyó que no hay evidencia de infiltración de *E. coli* ATCC 25922 a través del sistema vascular del banano, por lo tanto, la operación de lavado por inmersión de la fruta durante 20 minutos corresponde a una operación segura siempre y cuando se garanticen las Buenas Prácticas Agrícolas, integridad de la fruta y calidad química y microbiológica del agua de lavado.
- Bananos no inoculados podrían contener microorganismos en su interior aún previo a ser expuestos a un ambiente acuoso contaminado. Por tanto, proteger la integridad de la fruta y garantizar una aplicación estricta de las Buenas Prácticas Agrícolas son medidas indispensables para proteger la calidad e inocuidad del fruto.

7. RECOMENDACIONES

- Evaluar si, para un estudio de infiltración de microorganismos, tiempos de desinfección menores de 5 minutos empleando hipoclorito de sodio acidificado, son suficientes para eliminar microorganismos patógenos de la cáscara del banano durante el proceso de inmersión en agua.
- Determinar si una concentración menor de hipoclorito de sodio acidificado u otros desinfectantes permitirían la desinfección de la cáscara de banano para un estudio de infiltración de microorganismos y evaluar si dicha concentración podría ser empleada en la industria para la desinfección de la fruta manteniendo las calidad sensorial de los bananos frescos sin dañar su cáscara.
- Analizar si un menor tiempo, desde que se realiza el corte de la corona hasta que se sumergen los bananos en el agua de lavado, podría aumentar el potencial de infiltración de agua y microorganismos con respecto a un tiempo mayor.
- Evaluar el potencial de infiltración de agroquímicos o desinfectantes añadidos al agua de lavado en bananos durante su exposición a ambientes acuosos.
- Estudiar si mayores tiempos de lavado del banano, daños en la cáscara, profundidad de la inmersión durante el lavado o mayores diferenciales de temperatura entre el agua de lavado y la fruta, representan un mayor potencial de infiltración de microorganismos.
- Determinar la sobrevivencia de microorganismos patógenos y de deterioro en cáscara durante la maduración del banano.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ARJONA, H. 1996. Toma, transporte y metabolismo del agua y nutrientes en la planta. *Agronomía Colombiana*. 13(2): 138-141.
- BARTZ, J. 2005. Internalization and infiltration. *Plant Disease*. 66: 302-306.
- BARTZ, J. 1982. Infiltration of tomatoes immersed at different temperatures to different depths in suspensions of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Plant Disease*. 66: 302-306.
- BARTZ, J. 1988. Potential for postharvest disease in tomato fruit infiltrated with chlorinated water. *Plant Disease*. 72: 9-13.
- BARTZ, J. & BRECHT, J. 2003. *Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables*. Marcel Deller, INC, New York.
- BARTZ, J. & SHOWALTER, R. 1981. Infiltration of tomatoes by aqueous bacterial suspensions. *Phytopathology*. 71: 515-518.
- BEUCHAT, L.; NAIL, B.; ADLER, B. & CLAVERO, R. 1998. Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes and lettuce. *Journal of Food Protection*. 61(10): 1305-1311.
- BLACK, D. & BARACH, J. 2018. *Alimentos enlatados: Principios de control del proceso térmico, acidificación y evaluación del cierre de los envases*. Fundación de Ciencia y Educación de la GMA, Virginia.
- BRANQUINHO, M.; ASTURIANO, C.; JAKABI, M. & SCALA, D. 2006. Incidence, internalization and behavior of *Salmonella* in mangoes, var. Tommy Atkins. *Food Control* 18(8): 1002-1007.
- BUCHANAN, R.; EDELSON, S.; MILLER, R. & SAPERS, M. 1999. Contamination of intact apples after immersion in an aqueous environment containing *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*. 62(5): 444-450.
- BURNETT, S.; CHEN, J. & BEUCHAT, L. 2000. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to the surface and internal structures of apples as demonstrated by confocal scanning laser microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(11): 4679-4687.

- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2020. Estimates of foodborne illness in the United States. INTERNET. Recuperado el 5 de marzo de 2020 de: <https://www.cdc.gov/foodborneburden/estimates-overview.html>
- CHEN, Y.; EVANS, P.; HAMMACK, T.; BROWN, E. & MACARISIN, D. 2016. Internalization of *Listeria monocytogenes* in whole avocado. Journal of Food Protection. 79(8): 1440-1445.
- COREY, K. & TAN, Z. 1990. Induction of changes in internal gas pressure of bulky plant organs by temperature gradients. Horticultural Science. 115(2): 308-312.
- CORPORACIÓN BANANERA NACIONAL (CORBANA). 2011. Implementación de Buenas Prácticas Agrícolas para reducir el escurrimiento de plaguicidas en el cultivo del banano de la región caribe costarricense. Recuperado el 29 de marzo de 2020 de: <http://www.bananotecnia.com/articulos/implementacion-de-buenas-practicas-agricolas-para-reducir-el-escurrimiento-de-plaguicidas-en-el-cultivo-del-banano-de-la-region-caribe-costarricense/>
- CORPORACIÓN BANANERA NACIONAL (CORBANA). 2019. Estadísticas: Destino de las exportaciones. INTERNET. Recuperado el 12 de diciembre de 2019 de: <https://www.corbana.co.cr/banano-de-costa-rica/#estadistica>
- DIOMEDI, A.; CHACÓN, E.; DELPIANO, L.; HERVÉ, B.; JEMENAO, I.; MEDEL, M.; QUINTANILLA, M.; RIEDEL, G.; TINOCO, J. & CIFUENTES, M. 2017. Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología. Revista Chilena Infectol. 34(2): 156-174.
- EBLEN, B.; WALDERHAUG, M.; EDELSON, S.; CHIREL, S.; DE JESUS, A.; MERKER, R.; BUCHANAN, R. & MILLER, A. 2004. Potential for internalization, growth, and survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in oranges. Journal of Food Protection. 67(8): 1578-1584.
- ERSOY, N.; CETIN, H.; KANKAYA, A. & KARAKUS, A. 2008. Determination of the active lenticel numbers in some types and varieties fruit. Asian Journal of Chemistry. 20(5): 3811-3816.

- FAO. 2002. Mejorando la seguridad y la calidad de frutas y hortalizas frescas: manual de formación para instructores. INTERNET. Recuperado el 5 de marzo de 2020 de: http://www.fao.org/ag/agn/cdfruits_es/others/docs/maryland_manual.pdf
- FAO. 2003. Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas. INTERNET. Recuperado el 1 de abril de 2020 de: <http://www.fao.org/3/Y4893S/y4893s00.htm#Contents>
- FDA. 2011. Standards for the growing, harvesting, packing and holding of produce for human consumption. Final regulatory impact analysis final regulatory flexibility analysis unfunded mandates reform act analysis. INTERNET. Recuperado el 6 de marzo de 2020 de: <https://www.fda.gov/media/94153/download>
- FDA. 2017. Bacteriological analytical manual: Aerobic plate count. INTERNET. Recuperado el 1 de abril de 2020 de: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-aerobic-plate-count#r6-International>
- FDA. 2017. Preliminary experiments on the effect of temperature differences on dye uptake by oranges and grapefruit. INTERNET. Recuperado el 1 de abril de 2020 de: <https://www.fda.gov/food/hazard-analysis-critical-control-point-haccp/preliminary-experiments-effect-temperature-differences-dye-uptake-oranges-and-grapefruit>
- FDA. 2019. 21 CFR 110.3. Current good manufacturing practice in manufacturing, packing, or holding human food. USA.
- FDA. 2019. 21 CFR 112.41. Standards for the growing, harvesting, packing and holding of produce for human consumption. USA.
- GARMENDIA, G. & VERO, S. 2006. Métodos para la desinfección de frutas y hortalizas. Horticultura 1132(197): 18-27.
- GHANI, Z.; AL-CHARRAKH, A.; KADHIM, N.; & KADHIM, S. 2013. Antimicrobial effect of aqueous banana peel extract, Iraq. Research Gate: Pharmaceutical Sciences. 1(2013): 73-75.
- GIRÓN, B.; CANO, F.; CASTILLO, L.; MÉNDEZ, Á. & ESPINOZA, H. 2019. Determinación de la presencia de *Escherichia coli* en la cáscara y parte comestible del banano y evaluación de su crecimiento durante el proceso de postcosecha y almacenamiento a temperatura controlada. Revista Científica. 2(28): 26-36.

- IBARRA, L.; ALVARADO, S.; RODRÍGUEZ, M.; MARTÍNEZ, N.; & CASTILLO, A. 2004. Internalization of bacterial pathogens in tomatoes and their control by selected chemicals. *Journal of Food Protection*. 67(7): 1353-1358.
- INESTROZA, C.; VOIGT, V.; MUNUZ, A. & GOMEZ, H. 2016. Métodos de enfriamiento aplicables a frutas y hortalizas enteras minimamente procesadas. *Revista iberoamericana de Tecnología Postcosecha*. 17(2): 149-161.
- INSTITUCIÓN PROMOTORA DEL COMERCIO EXTERIOR DE COSTA RICA (PROCOMER). 2018. Anuario estadístico. INTERNET. Recuperado el 4 de marzo de 2020 de: <https://procomer.com/downloads/estudios/ResumenAnuario2018.pdf>
- INSTITUCIÓN PROMOTORA DEL COMERCIO EXTERIOR DE COSTA RICA (PROCOMER). 2017. Estadísticas de comercio exterior. INTERNET. Recuperado el 21 de enero de 2019 de: https://procomer.com/downloads/estudios/estudio_estadistico_2017/Estadisticas2017.pdf
- INSTITUCIÓN PROMOTORA DEL COMERCIO EXTERIOR DE COSTA RICA (PROCOMER). 2019. Desafíos del sector bananero en Ecuador para 2019. INTERNET. Recuperado el 29 de enero de 2019 de: <https://procomer.com/es/alertas-comerciales/desafios-del-sector-bananero-en-ecuador-para-2019>
- IZQUIERDO, J. & RODRÍGUEZ, M. 2006. Buenas prácticas agrícolas (BPA). En busca de sostenibilidad, competitividad y seguridad alimentaria. INTERNET. Recuperado el 19 de diciembre de 2019 de: <http://www.fao.org/3/A0718s/A0718s00.pdf>
- JARAMILLO, S. 2018. Manual de aplicabilidad de buenas prácticas agrícolas de banano. INTERNET. Recuperado el 12 de diciembre de 2019 de: <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/pdf/inocuidad/manuales-aplicabilidad/manual-banano.pdf>
- KENNEY, S.; BURNETT, S. & BEUCHAT, L. 2001. Location of *Escherichia coli* O157:H7 on and in apples as affected by bruising, washing, and rubbing. *Journal of Food Protection*. 64(9): 1328.
- KOLATTUKUDY, P. 1984. Biochemistry and function of cutin and suberin. *Canadian Journal of Botany*. 62(12): 2918-2933.

- LA REPUBLICA. 2020. Exportaciones de banana alcanzaron 120 millones de cajas en 2019. INTERNET. Recuperado el 5 de marzo de 2020 de: <https://www.larepublica.net/noticia/exportaciones-de-banano-alcanzaron-120-millones-de-cajas-en-2019>
- LAMIKANRA, O.; IMAM, S. & UKUKU, D. 2005. Produce degradation: Pathways and prevention. CRC Taylor and Francis Group, Florida.
- MACARISIN, D.; WOOTEN, A.; DE JESUS, A.; HUR, M.; BAE, S.; PATEL, J.; EVANS, P.; BROWN, E.; HAMMACK, T. & CHEN, T. 2017. Internalization of *Listeria monocytogenes* in cantaloupes during dump tank washing and hydrocooling. *Journal of Food Microbiology*. 257(2017): 165-175.
- MANI, E.; PALOU, E.; & LÓPEZ, A. 2016. Effect of different sanitizers on the microbial load and selected quality parameters of “chile de árbol” pepper (*Capsicum frutescens* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology* 119: 94-100.
- MORENO, J. BLANCO, M. & MENDOZA, R. 2009. Buenas prácticas agrícolas en el cultivo del banano en la región del magdalena. INTERNET. Recuperado el 19 de diciembre de 2019 de: <http://cep.unep.org/repcar/proyectos-demostrativos/colombia-1/publicaciones-colombia/cartilla-banano-definitiva.pdf>
- PARISH, M.; BEUCHAT, L.; SUSLOW, T.; HARRIS, L.; GARRETT, E.; FARBER, J. & BUSTA, F. 2006. Methods to Reduce/Eliminate Pathogens from Fresh and Fresh-Cut Produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2(1): 161-173.
- PARK, C. & BEUCHAT, L. 1999. Evaluation of sanitizers for killing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and naturally occurring microorganisms on cantaloupes, honeydew melons, and asparagus. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*. 19(12): 842-847.
- PEREZ, K.; LUCIA, L.; CISNEROS, L.; CASTILLO, A. & TAYLOR, T. 2012. Efficacy of antimicrobials for the disinfection of pathogen contaminated green bell pepper and of consumer cleaning methods for the decontamination of knives. *Journal of Food Microbiology*. 156(1): 76-82.

- PENTEADO, A.; EBLEN, B. & MILLER, A. 2004. Evidence of *Salmonella* internalization into fresh mangos during simulated postharvest insect disinfestation procedures. *Journal of Food Protection*. 67(1): 181-184.
- PIERNAS, V. & GUIRAUD, J. 1997. Disinfection of rice seeds prior to sprouting. *Journal of Food Science*. 62(3): 611-615.
- PILCO, G.; BORJA, D.; GOETSCHER, L.; ANDRADE, P.; IRAZABAL, J.; VARGAS, P.; GUIL, J.; RUEDA, V. & RAMOS, L. 2018. Caracterización bromatológica y evaluación de la actividad antimicrobiana en cáscara de banano Ecuatoriano (*Musa paradisiaca*). *Enfoque UTE*. 9(2): 48-58.
- RAMÍREZ, M.; SÁENZ, M.; & VARGAS, A. 2011. Efecto de la inmersión en agua caliente sobre la secreción de látex por la corona de gajos recién conformados de frutos de banano. *Agronomía Costarricense*. 35(1): 1-14.
- RUSHING, J.; BIHN, E.; BROWN, A.; HILL, T.; JONES, J.; MARTIN, Y.; MCGARRY, S.; SALTSMAN, J.; SMITH, M.; SUSLOW, T.; & WALSH, C. 2012. Mejorando la calidad y seguridad de frutas y hortalizas frescas: un manual de capacitación para capacitadores. Recuperado el 26 de diciembre de 2019 de: http://www.fao.org/ag/agn/CDfruits_es/others/docs/maryland_manual.pdf
- SALFINGER, Y. & TORTORELLO, M. 2015. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. APHL, Washington, D.C.
- SÁNCHEZ, F.; FURUYA, A.; ARRONIZ, S.; GÓMEZ, A. & GÓMEZ, L. 2009. Comparación de la acción bactericida de hipoclorito desodio y Microcyn 60. *Revista Odontológica Mexicana*. 13(1): 9-16.
- SAPERS, G.; GORNY, J. & YOUSEF, A. Eds. 2005. *Microbiology of Fruits and Vegetables*. CRC Taylor and Francis Group, Florida.
- SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R.; ANGULO, F.; TAUXE, R.; WIDDOWSON, M.; ROY, S.; JONES, J. & GRIFFIN, P. 2011. Foodborne Illness Acquired in the United States Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases*. 17(1): 7-15.
- SCHONHERR, J. & BUKOVAC, M. 1972. Penetration of stomata by liquids, *Plant Physiology*. 49(5): 813.

- SMITH, S.; SCOTT, J. & BARTZ, J. 2006. The effect of time after harvest on stem scar water infiltration in tomato. *Horticultural Science*. 42(5): 1227-1230.
- SOLOMON, E.; YARON, S. & MATTHEWS, K. 2002. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(1): 397-400.
- TURNER, A.; FRIEDRICH, L. & DANYLUK, M. 2016. Influence of temperature differential between tomatoes and postharvest water on *Salmonella* internalization. *Journal of Food Protection*. 79(6): 922-928.
- UKUKU, D.; & FETT, W. 2004. Method of applying sanitizers and sample preparation affects recovery of native microflora and *Salmonella* on whole cantaloupe surfaces. *Journal of Food Protection*. 67(5): 999-1004.
- US FOOD AND DRUG ADMINISTRACIÓN (FDA). 2017. Potential for infiltration, survival, and growth of human pathogens within fruits and vegetables. INTERNET. Recuperado el 4 de febrero de 2019 de: <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/HACCP/ucm082063.htm>
- USAGA, J.; CHUREY, J.; PADILLA, O. & WOROBO, R. 2014. Determination of the validation frequency for commercial UV juice processing units. *Journal of Food Protection*. 77(12): 2076-2080.
- WELTI, J.; BARBOSA, G. & AGUILERA, J. 2002. Engineering and food for the 21st century. CRC press, Florida.
- XIA, X.; LUO, Y.; YANG, Y.; VUNYARD, B.; SCHNEIDER, K. & MENG, J. 2012. Effects of tomato variety, temperature differential, and post-stem removal time on internalization of *Salmonella enterica* Serovar Thompson in tomatoes. *Journal of Food Protection*. 75(2): 297-303.
- ZHUANG, R.; BEUCHAT, L. & ANGULO, F. 1995. Fate of *Salmonella Montevideo* on and in raw tomatoes as affected by temperature and treatment with chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(6): 2127-2131.