

Bioempaque de interés citrícola

Locaso Delia E.

AUTORES: Facultad de Ciencias de la Alimentación, UNER, Concordia (Entre Ríos. Argentina).

CONTACTO: locasod@fcal.uner.edu.ar

Resumen

En la Argentina se enfrentan problemas para ajustar la producción y distribución de frutas y vegetales frescos a los nuevos parámetros de exigencia social (calidad, inocuidad, información, conocimiento). En este contexto globalizado y multidimensional, el sector citrícola debe adecuar su tecnología postcosecha para dar respuesta a esa exigencia y lograr de este modo mayor competitividad. Los productos empleados para la conservación de la fruta incluyen fungicidas sintéticos; su empleo excesivo ha incrementado el nivel de residuos sobre la fruta a la vez que ha favorecido el desarrollo de resistencia de los patógenos. Los resultados obtenidos evidencian que los recubrimientos comestibles controlan eficientemente la podredumbre por *Penicillium digitatum* en postcosecha de naranjas, aumentando de este modo su vida comercial. Estos resultados ameritan profundizar la investigación teniendo en cuenta que la debilidad tecnológica que afecta al sector citrícola de la región es la falta de desarrollo de plaguicidas que cumplan la normativa toxicológica.

Palabras clave: Postcosecha; naranjas; quitosano; antifúngico; recubrimiento.

Bio packaging of interest in Citriculture

Abstract

Problems adjusting production and distribution of fresh fruits and vegetables to the new parameters of social demands (quality, safety, information, knowledge) are faced in Argentina. In this globalized and multidimensional context, the citrus industry must adapt its post-harvest technologies to meet this requirement and thus achieve greater competitiveness. The products used for the preservation of the fruit include synthetic fungicide, which excessive use has increased the level of residue on the fruit while favouring the development of resistance in pathogens. The results of our work show that edible coatings effectively control decay by *Penicillium digitatum* on postharvest oranges, thus increasing its commercial life. These findings warrant further investigation given that the technological weakness affecting the region's citrus industry is the lack of development of pesticides that meet the toxicology regulatory normative.

Keywords: Postharvest, orange, chitosan, antifungal, coating

I. Introducción

La cadena cítrica regional incluye una región agro económica homogénea que abarca una franja de 30 km (oeste – este) de suelos arenosos de la costa occidental del río Uruguay: que se inicia al norte del departamento Colón, Concordia y Federación en la provincia de Entre Ríos, continuando hasta el departamento Monte Caseros en la provincia de Corrientes. En el lado oriental de la República Oriental del Uruguay en los departamentos de Salto y Paysandú también se registra actividad cítrica.

El valor de la producción cítrica en la Provincia de Entre Ríos representa cerca de 150 millones de pesos y se ubica en el quinto lugar como actividad agropecuaria que genera mayor valor en dicha jurisdicción. Cabe mencionar el aspecto socioeconómico que genera la cadena con un empleo de personal superior a las 10.000 personas a nivel provincial. El objetivo principal de la cítricultura de la provincia es la producción de fruta - principalmente de naranjas y mandarinas - para consumo en fresco.

En la Argentina, como en gran parte del mundo, se enfrentan problemas para ajustar la producción y distribución de frutas y vegetales frescos a los nuevos parámetros de exigencia social (calidad, inocuidad, información, conocimiento). En este contexto globalizado y multidimensional, el sector cítrico debe adecuar su tecnología postcosecha para dar respuesta a esa exigencia y lograr de este modo mayor competitividad.

El *Penicillium digitatum* es el principal patógeno responsable de las pérdidas económicas de frutas cítricas en postcosecha [1], [2]. e infecta a la fruta a través de las microheridas generadas en el flavedo durante la recolección y las operaciones de acondicionamiento. Los productos que se utilizan para la conservación de la fruta incluyen recubrimientos realizados con materias primas importadas y fungicidas de origen sintético.

La problemática de los fungicidas convencionales involucra: contaminación (presencia de residuos en el fruto, liberación de residuos al medio ambiente), proliferación de cepas patógenas resistentes y acceso restringido a determinados mercados. En particular, los residuos de pesticidas en las frutas presentan especial importancia porque éstas son partes de la planta que pueden ser consumidas en fresco, y por lo tanto ingeridas directamente. Cuando los productos químicos son aplicados en postcosecha la preocupación por el nivel de residuos es mayor, debido a la proximidad temporal entre el tratamiento y el consumo. Los residuos en la fruta no pueden exceder el límite máximo de residuos (LMR) establecido por la legislación vigente en cada país, que tiene en cuenta el principio activo. Estos límites suelen ser cada vez más estrictos, sobre todo en los países desarrollados.

En Argentina, como en el resto del mundo, estos cuestionamientos han motivado la búsqueda de alternativas al control de enfermedades en poscosecha y al desarrollo de nuevas estrategias. En respuesta a este desafío, se propone una estrategia de control alternativo –frente a la podredumbre verde- para extender la vida útil de naranjas, mediante la aplicación de un recubrimiento comestible antimicrobiano. La propuesta se formuló a base de fuentes renovables, biodegradables y sin efectos adversos para la salud.

Un polisacárido que presenta propiedades atractivas para su utilización como base para los recubrimientos comestibles, es el quitosano. Este biopolímero presenta actividad antibacteriana y antifúngica, es biocompatible, biodegradable y no tóxico [3].

El quitosano posee actividad biológica como antimicrobiano contra un amplio espectro de hongos filamentosos, levaduras y bacterias [4], [5] [6], [7]. [8], [9]. Diversos estudios han demostrado que el quitosano no solo es efectivo en inhibir el crecimiento del patógeno sino que además induce marcados cambios morfológicos, alteraciones estructurales y desorganización molecular de las células fúngicas [10], [11], [12].

Las cubiertas de quitosano han sido utilizadas como agente alternativo de control contra el *Penicillium italicum* en manzanas y se ha demostrado que induce la resistencia de la fruta además de inhibir el

crecimiento del patógeno [13], [14]. Asimismo se ha comprobado la eficacia de recubrimientos a base de quitosano en el aumento de la vida útil postcosecha de diferentes frutas, como las cerezas [15], uvas, frutillas almacenadas en frío [15], [16], [17] y mandarinas [18] [19] [20] [21] [22].

Las películas y cubiertas comestibles han sido aplicadas en carnes y productos cárnicos [23], en pescado [24], en frutas [25]; [26]; [27], [23]; y en vegetales [28].

Las publicaciones científicas referidas a la actividad antifúngica de recubrimientos comestibles con quitosano *in vivo* y su efecto en el control de podredumbres de naranjas son escasos por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar la bioactividad *in vitro* e *in vivo* frente a *Penicillium digitatum*.

II. Materiales y Métodos

II.1. Preparación de las soluciones formadoras de películas

II.1.1. Soluciones de almidón

Se realizaron suspensiones acuosas de 5% de almidón comercial de maíz, con un contenido de 25% de amilosa, provisto por Molinos Rio de la Plata (Argentina). Las suspensiones se gelatinizaron en caliente en un baño termostático Yamato VM-42 (Japón). El glicerol (2,5%) se agregó como plastificante a las suspensiones gelatinizadas.

II.1.2. Solución de quitosano

Se preparó una solución madre de quitosano (grado de desacetilación de 98,6 %, Sigma, USA) conteniendo 4 mg/mL según García y col., (2004), por solubilización de una solución de ácido acético glacial al 1% (v/v) en una dispersora Ultraturax T25 (Alemania). El pH de la solución se ajustó a 4.5 con una solución 1M de NaOH.

II.1.3. Soluciones mezclas

A partir de las formulaciones anteriores se prepararon soluciones mezclas (Sm) de almidón gelatinizado con agregado de glicerol y quitosano de forma de obtener dos concentraciones: 1,2 mg/mL (Q1) y 2,4 mg/mL (Q2) del principio activo. Se utilizó una dispersora Ultraturax T25 a 12.500 rpm durante 3 minutos.

II.1.4. Soluciones mezclas con incorporación de una fase lipídica

Las soluciones (Sm) de ambas formulaciones fueron modificadas mediante la adición de 0,6 % (p/v) de aceite de girasol y 0,1% (v/v) de emulsionante Tween 80 (soluciones mezclas Sm₂). La dispersión se realizó a 12.500 rpm mediante Ultraturax T25.

II.2. Ensayos *in vitro*

II.2.1. Preparación de la cepa.

Se utilizó una cepa pura de *Penicillium digitatum* obtenida de naranjas enfermas de la región de Salto Grande e identificadas de acuerdo a las características microscópicas descriptas por Pitt y Hocking [29].

II.2.2. Metodología para determinar el efecto del principio activo

Las soluciones de quitosano fueron adicionadas al medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA Britania, Argentina) previamente esterilizado. Se evaluó el efecto del principio activo sobre el crecimiento de *Penicillium digitatum* colocando discos de 9 mm de diámetro de una cepa pura del patógeno, de 7 días de crecimiento a 25°C, en el centro de una caja de petri de 9 cm conteniendo PDA con cada uno de los productos Q1 y Q2 En forma simultánea se utilizó un testigo (0 mg/mL) y un control negativo con 1 ppm

de imazalil (Magan, Argentina). Se observó el crecimiento a las 24 hs, posteriormente a los 5 y 7 días a fin de medir el diámetro de las colonias. Cada ensayo se realizó por triplicado.

II.3. Evaluación *in vivo*

II.3.1. *Materia Prima*

II.3.1.1. Ensayo 1

Los estudios fueron realizados con naranjas variedad Valencia Late, cosechadas con madurez comercial, a fines del mes de agosto del año 2009, provenientes de un empaque cítrico de la región de Salto Grande (Entre Ríos, Argentina).

II.3.1.2. Ensayo 2

Se emplearon naranjas Valencia Late con madurez comercial - cosecha 2010 - provenientes del empaque cítrico de la región de Salto Grande (Entre Ríos, Argentina).

II.3.2. Acondicionamiento de la fruta

II.3.2.1. Ensayo 1

Se descartó la fruta dañada o con signos de alteración y luego se clasificó por tamaños. El lote constituido por naranjas preseleccionadas, sin tratamiento postcosecha, fue desinfectado por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio (200 ppm durante 2 minutos), luego fue lavado con detergente biodegradable y secado a 45°C en un túnel de aire caliente. Estas operaciones fueron realizadas en el empaque piloto de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) ubicada en el Dpto. Concordia, Entre Ríos, Argentina.

Se conformaron lotes de 150 frutas cada uno. Se pulverizaron 10 lotes con el recubrimiento comestible Q1 mediante las boquillas pulverizadoras sobre cepillos de la línea piloto de empaque del INTA. Otros 10 lotes fueron asperjados manualmente con el recubrimiento comestible Q2 y 15 lotes sin tratamiento fueron almacenados como testigo.

II.3.2.2. Ensayo 2

Se descartó la fruta dañada o con signos de alteración y luego se clasificó por tamaños. El lote constituido por naranjas preseleccionadas sin tratamiento postcosecha fue desinfectado con 200 ppm de hipoclorito de Sodio durante 2 minutos, lavado con detergente biodegradable y secado en el empaque cítrico para someterlo posteriormente a los distintos tratamientos.

Se conformaron lotes de 150 frutas cada uno. Para recubrir la fruta se utilizaron las formulaciones Sm₂. Se pulverizaron 3 lotes con el recubrimiento comestible Q1. Otros 3 lotes fueron recubiertos con Q2 y 5 lotes sin tratamiento se dejaron como testigo. La aplicación de los recubrimientos se realizó mediante las boquillas pulverizadoras sobre cepillos de la línea experimental de empaque del INTA.

Como fruta control se utilizaron 3 lotes de naranjas con acondicionamiento convencional (fungicidas químicos de síntesis y cera comercial de exportación con 18% de sólidos).

II.3.3. Inoculación artificial de la fruta

II.3.3.1. Preparación del inóculo.

Se obtuvo a partir de cultivos de 7 días en PDA. Se preparó una suspensión de conidios en Tween 80 (0,05%p/v) la cual fue ajustada a 10⁶ esporas por mL. Esta concentración se determinó por su densidad óptica a 425 nm con un espectrofotómetro Shimadzu UV-1630 según la técnica de Eckert y Brown [30].

II.3.3.2. Metodología de Inoculación.

Los frutos recubiertos fueron heridos e inoculados mediante una incisión en la zona ecuatorial del fruto, con un punzón de 1 mm de ancho y 2 mm de longitud, sumergido en una suspensión de 10^6 esporas por mL de *Penicillium digitatum*.

II.3.4. Almacenamiento de la fruta

Las naranjas inoculadas fueron colocadas en cámara húmeda. Los lotes fueron conservados a 25 ± 3 °C durante 15 días efectuándose el primer control a las 24 hs. y luego cada 7 días.

II.3.5. Evaluación de podredumbres

Se realizó la observación macroscópica de la fruta y se contabilizó como positiva la podredumbre desde el primer punto de infección visible. Al finalizar el almacenamiento, se contabilizó el porcentaje de fruta con podredumbres. La eficacia del control de la enfermedad se expresó como porcentaje de reducción respecto al control, al final del almacenamiento.

II.3.6. Tratamiento Estadístico de los Datos

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente, mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Se aplicó la prueba de Tukey para determinar diferencias significativas entre las medias de los tratamientos con un nivel de probabilidad del 5%. El paquete estadístico utilizado fue Statgraphic Plus, versión 5.1.

III. Resultados y Discusión

III.1. Ensayos *in vitro*

En la observación realizada a las 24 hs de incubación se encontró que no hubo crecimiento del patógeno en los ensayos con Q1 y con Q2 en tanto que en el testigo hubo un leve crecimiento micelial de aspecto algodonoso y color blanco, de 0,5 mm de diámetro. El control positivo (0 mg/mL) mostró esporulación desde el tercer día. A los 5 días de incubación no hubo crecimiento del moho en los ensayos con Q1 y Q2, sin embargo se observó que en el testigo hubo desarrollo de *Penicillium digitatum* el cual cubría el 70% de la caja de petri. El patógeno fue completamente inhibido a los 7 días de incubación en ambas formulaciones de quitosano ensayadas. El testigo mostró crecimiento en toda la superficie de la placa.

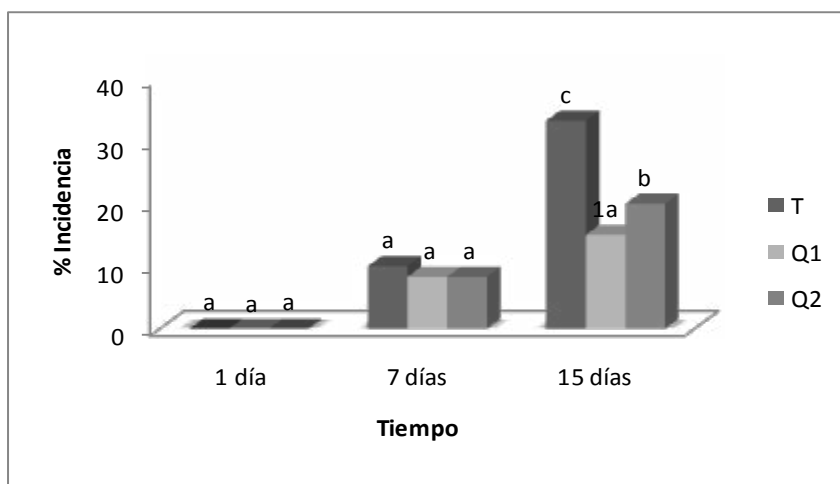
Los resultados de las evaluaciones *in vitro*, efectuadas macro y microscópicamente, evidenciaron inhibición del crecimiento micelar de la colonia de *Penicillium digitatum* del mismo modo que el control con Imazalil. [31] [32] reportan resultados similares de inhibición completa de los hongos *Fusarium oxysporum*; *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium digitatum* y *Colletotrichum gloeosporioides* cuando utilizaron concentraciones al 3% de quitosano. Otros estudios *in vitro* realizados frente a *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer* observaron que el mayor efecto fungicida se obtuvo a mayores concentraciones de quitosano [33].

III.2. Evaluaciones *in vivo*

III.2.1. Ensayo 1

En la **Figura 2** se presentan los resultados de la Incidencia de *Penicillium digitatum* en naranjas Valencia Late recubiertas con quitosano con las siguientes concentraciones 0 mg/mL (testigo), 1,2 mg/mL (Q1) y 2,4 mg/mL (Q2).

Se observa que los recubrimientos antimicrobianos ensayados redujeron significativamente las podredumbres de las naranjas con respecto a la fruta testigo (T). Los resultados muestran que a los 7 días las naranjas con los recubrimientos Q1 y Q2 se comportaron de forma similar. En tanto que a los 15 días Q1 redujo significativamente el porcentaje de incidencia de podridos con respecto a Q2.



En cada periodo de almacenamiento, columnas con la misma letra no difieren significativamente ($p < 0,05$, Test Tukey).

Figura 2. Incidencia de *Penicillium digitatum* en naranjas Valencia Late inoculadas artificialmente y almacenadas a 25°C durante 15 días.

La eficacia en el control de la podredumbre verde obtenida con el tratamiento Q2 fue de 40%, en tanto que con el tratamiento Q1 fue de 55% (**Tabla 1**).

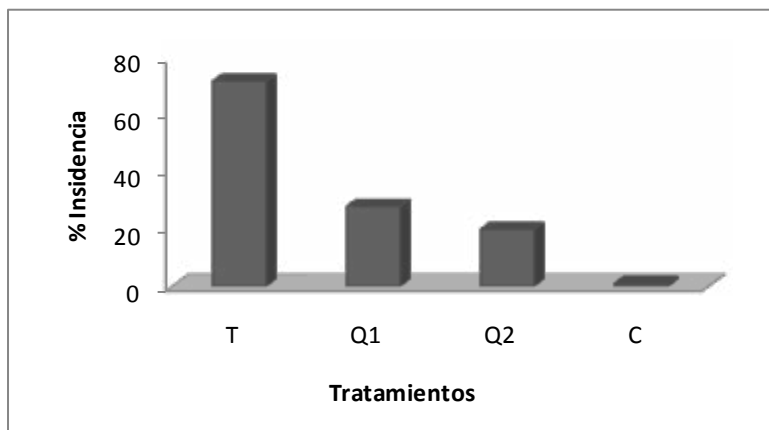
TABLA 1. Eficacia de los tratamientos antifúngicos

Tratamiento	EFICACIA frente a <i>Penicillium digitatum</i>
Q1	55%
Q2	40%

La literatura reporta que la efectividad fungicida del quitosano está directamente relacionada con la concentración utilizada [34]. Los resultados obtenidos en este trabajo difieren de lo señalado por dichos autores; lo que puede atribuirse a las diferentes metodologías empleadas de aplicación de los recubrimientos (línea convencional de encerado con boquillas pulverizadoras versus pulverizador manual). Las aplicaciones estuvieron condicionadas por el comportamiento reológico diferente presentado por las soluciones filmogénicas ensayadas. Esto motivó a realizar modificaciones en la solución mezcla de la formulación del recubrimiento Q2 para efectuar una nueva evaluación sobre naranjas; asimismo se reformuló Q1 con el objetivo de obtener datos comparativos (Ensayo 2).

III.2.2. Ensayo 2

En la **Figura 3** pueden observarse los resultados en porcentaje de la fruta con podredumbre verde para cada tratamiento ensayado T, Q1, Q2 y C.



En cada columna con la misma letra significa que no difieren significativamente ($p < 0,05$, Test Tukey).

Figura 3. Incidencia de *Penicillium digitatum* en naranjas Valencia Late inoculadas artificialmente y almacenadas a 25°C durante 15 días.

Se obtuvo una diferencia altamente significativa entre la fruta testigo - que mostró 72% de fruta deteriorada- y la fruta recubierta. Las naranjas con tratamiento convencional resultaron significativamente mejores que las recubiertas con Q1 y Q2.

La reducción de la incidencia de la podredumbre verde fue significativamente mayor con el tratamiento Q2 con respecto a Q1. En tanto que, la mayor eficacia de los tratamientos antifúngicos ensayados se presentó en la fruta con el tratamiento convencional (98 %), seguido por Q2 con un 72 %. Estos resultados comparativos se presentan en la **Tabla 2**.

TABLA 2. Eficacia de los tratamientos antifúngicos

Tratamiento	EFICACIA frente a <i>Penicillium digitatum</i>
Q1	61 %
Q 2	72 %
C	98 %

Resultados similares a los obtenidos en la presente investigación fueron señalados por Vargas y col. [23] quienes determinaron que los recubrimientos con quitosano mostraron ser eficaces en el control postcosecha de *Penicillium italicum* en naranjas variedad Lane Late. Chien y col. [20]; demostraron que los recubrimientos con quitosano exhibieron mayor resistencia antifúngica que el Tiabendazol (TBZ) cuando fueron aplicados a mandarinas Murcott en el control del crecimiento fúngico causado por *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*. En contraste, estudios realizados por Valencia-Chamorro y col. [35] determinaron que los recubrimientos con quitosano no controlaron significativamente la incidencia de *Penicillium digitatum* en naranjas Valencia Late.

Los resultados obtenidos en este ensayo evidenciaron que el recubrimiento formulado con la mayor concentración de quitosano fue más eficaz en el control de la incidencia de la podredumbre verde. Zhang y Quantick [18] sostienen que mayores concentraciones de quitosano no incrementan significativamente los efectos beneficiosos del quitosano en el control de microorganismos.

De acuerdo a Wilson y col, [36], el quitosano permite prolongar la vida media de frutas y vegetales al formar una capa semipermeable que protege la superficie de los frutos induciendo resistencia en los tejidos vegetales. Podemos añadir - de acuerdo a los resultados de esta investigación- que las formulaciones del ensayo 2 permiten una mejor distribución en la superficie de los cítricos y, consecuentemente se reducen las pérdidas por una aplicación deficiente.

IV. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el marco del proyecto muestran que los recubrimientos formulados con quitosano tienen un excelente potencial para controlar la podredumbre verde de las naranjas en la postcosecha. El empleo de este compuesto natural promete ser una alternativa ambientalmente sostenible de control de *Penicillium digitatum* durante el manejo postcosecha.

Los resultados generados en el marco de este proyecto ameritan profundizar la investigación en esta línea, teniendo en cuenta que la debilidad tecnológica que afecta al sector cítrico de la región es la falta de desarrollo de plaguicidas que cumplan las normativas toxicológicas LMR (Límite Máximo de Residuos) [37].

V. Agradecimientos

Se agradece a la empresa cítrica AYUI S.A. y a la Estación Experimental INTA Concordia donde se llevaron a cabo los ensayos experimentales "in vivo". Asimismo, se agradece al Dr. Roberto Varela por su colaboración con materias primas y equipamiento.

Referencias bibliográficas

1. TUSSET, J. Podredumbre de los frutos cítricos. Instituto Valenciano de investigaciones agrarias Conselleria d'Agricultura i Pesca. Ed. Generalitat Valenciana. Valencia. 1987. pp 206.
2. PORAT, R., DAUS, A., WEISS, B., COHEN, L., FALLIK, E. AND S. DROBY. Reduction of postharvest decay in organics citrus fruit by a short hot water brushing treatment. *Postharvest Biology and Tecnology*, 2000. Vol.18: 1175-1181.
3. SHAHIDI, J.K.M. ARACHCHI AND Y. JEON. Food applications of chitin and chitosans. *Trends Food Sci. Technol.* 1999. Vol. 10:37-51.
4. SAGOO, S., BOARD, R. AND S. ROLLER. Chitosan inhibits growth of spoilage micro-organisms in chilled pork products. *Food Microbiology* 2002. Vol. 19, 175-82.
5. JUNG, B. AND C. KIM. Preparation of amphiphilic chitosan and their antimicrobial activities. *J. Appl. Polym. Sci.* 1999. Vol. 72, 1713-1719
6. CUERO, R.G. Antimicrobial action of exogenous chitosan. En: Jollés P.; Muzzarelli, R.A.A. (Eds). Chitin and Chitinases. Birkhäuser Verlag. 1999. pp. 315-333.
7. NO, H.K., PARK, N.Y., LEE, S.H. AND S.P. MEYERS. 2001. Antibacterial effect of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int. J. Food Microbiol.* 74: 65-72.
8. THARANATHAN, R. AND F. KITTUR. Chitin-The undisputed biomolecule of great potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2003. Vol. 43 (1). 61-87.
9. ZHENG, L.Y. AND J.F. ZHU. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydr. Polym.* 2003. Vol. 54, 527-530.
10. BENHAMOU, N., Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* 1996. Vol.1: 233-240.
11. EL GHAOUTH, A., SMILANICK, J.L., BROWN, G.E., WISNIEWSKI, M. AND C.L. WILSON. Application of *Candida saitoana* and glycolchitosan for the control of postharvest diseases of apple and citrus fruit under semi-commercial conditions. *Plant Dis.* 1999. Vol. 84: 243-248.

12. AIT BARKA, E., EULLAFFROY, P., CLEMENT, C. AND G. VERNET. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Rep.* 2004. Vol. 22: 608–614.
13. DE CAPDEVILLE, G., WILSON, C.L., BEER, S.V. AND J.R. AIST. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested 'Red Delicious' apple fruit. *Phytopathology.* 2002. Vol. 92:900-908.
14. DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, A. AND J. DEBEVERE. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology.* 2004. Vol. 21: 703–714.
15. ROMANAZZI, G., NIGRO, F., IPPOLITO, A.; VENERE, D.D. AND M. SALERNO.. Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *Journal of Food Science.* 2002 Vol. 67: 1862-1867.
16. ROMANAZZI, G., NIGRO, F. AND A. IPPOLITO. 2003. Short hypobaric treatments potentiate the effect of chitosan in reducing storage decay of sweet cherries. *Postharvest Biology and Technology.* 2003. Vol. 29: 73-80.
17. EL GAOUTH, A.; ARUL, J.; PONNAMPALAM, R. AND M. BOULET. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. *Journal of Food Science,* 1991. Vol.12(6): 1618-1632.
18. ZHANG, D. AND P.C. QUANTICK.. Antifungal effect of chitosan coating on fresh strawberries and raspberries during storage. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 1998. Vol.73: 763–767.
19. HAN, C., ZHAO, Y., LEONARD, S.W. AND M.G. TRABER.. Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria ananassa*) and raspberries (*Rubus idaeus*). *Postharvest Biol. Technol.* 2004. Vol. 33: 67–78.
20. CHIEN, P.-J., SHEU, F., LIN, H.-R. Coating citrus (Murcott tangor) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life. *Food Chem.* 2007. Vol.100: 1160-1164.
21. FORNES, F., ALMELA, V; ABAD, M; AGUSTÍ, M. Low concentrations of chitosan coating reduce water spot incidence and delay peel pigmentation of Clementine mandarin fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2005. Vol. 85(7): 1105-1112.
22. HAN, C., ZHAO, Y., LEONARD, S. W. AND M.G. Traber.. Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria ananassa*) and raspberries (*Rubus idaeus*). *Postharvest Biology and Technology.* 2004. Vol. 33: 67.
23. VARGAS A. ALBORS, CHIRALT A. AND C. GONZÁLEZ-MARTÍNE. Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan-oleic acid edible coatings. *Postharvest Biology and Technology,* 2006. Vol. 41: 164–171.
24. GARCÍA, M.A.; DÍAZ, R.; PUERTA, F.; BELDARRAÍN, T.; CASTILLO A.; GONZÁLEZ, J. Y C. DUARTE. 2008. Envasado activo de embutidos. *Revista Ciencia y Tecnología de Alimentos,* Vol.18.No.2.
25. González, Y. 2005. Conservación de jurel mediante la aplicación de coberturas de quitosana. Tesis de Diploma en opción al título de Licenciado en Ciencias Alimentarias. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana.
26. CAMILI, E. C.; BENATO, E. A.; PASCHOLATI, S. F. AND P. CIA. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra *Botrytis cinerea*. *Summa Phytopathologica,* 2007. V.33 : 215-221.
27. HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; ALMENAR, E; DEL- VALLE, V.; VÉLEZ, D. AND R. GAVARA. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chemistry.* Vol. 110: 428–435.
28. RODRÍGUEZ, J. L. Aplicación de una cobertura biodegradable de quitosana en la conservación de tomates. Tesis de Diploma en opción al título de Licenciado en Ciencias Alimentarias. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. 2004.
29. PITT, J.I AND HOCKING, A. Fungi and food spoilage. Blackie Academic. London. 1997.
30. ECKERT, J.W. AND G.E. BROWN.. Postharvest citrus diseases and their control. In: *Fresh Citrus Fruit.* Van Nostrand Reinhold Company Inc. Wardowski, W.F., Nagy, S., Grierson, W. (Eds.), NY, EE.UU. 1986. pp. 315–360.
31. BAUTISTA-BAÑOS, S., HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M., BOSQUEZ-MOLINA, E. AND C.L. WILSON. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. 2003. *Crop Prot.* V. 22 : 1087–1092.

32. BAUTISTA-BAÑOS, S., DE LUCCA, A.J AND C.L. WILSON. Evaluation of the antifungal activity of natural compounds to reduce postharvest blue mould of apples during storage. *Mexican J. Phytopathol.* 2004. Vol. 22: 362–369.
33. EL GHAOUTH, E.A., ARUL, J., GRENIER, J. AND A. ASSELIN, A.,. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology* .1992, Vol. 82: 398–402.
34. BAUTISTA-BAÑOS S, HERNÁNDEZ-LAUZARDO A.N, VELÁZQUEZ DEL VALLE M.G, BOSQUEZ-MOLINA E., SÁNCHEZ-DOMÍNGUEZ D. Quitosano: Una alternativa natural para reducir microorganismos postcosecha y mantener la vida de anaquel de productos hortofrutícolas. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*. 2005. 7: 1-6.
35. VALENCIA-CHAMORRO, ROJAS ARGUDO C.; PÉREZ GAGO M.B.; PALOU, L. Efecto del recubrimiento con quitosano en el control de las podredumbres verdes y azul de los cítricos. (pp. 488 – 495). En: ORIA R. VAL J.; FERRER, A. (Eds.) En: *Avances en maduración y postrecolección de frutas y hortalizas*. Editorial Acribia, Zaragoza. 2008.
36. WILSON, C. L.; EL GHAOUTH, E.A.; CHALUTS, E.; DROBY, S.; STEVENS, C.; LU, J. L.; KHAN, V.; .ARUL, J. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruit and vegetables. *Plant dis.*, 1994. Vol. 78:837 – 844.
37. MINCYT, COFECYT, UIA. Estudio sobre Demandas de Innovación entre Sectores Productivos Vinculados. 2010. Disponible on line:
http://www.cofecyt.mincyt.gov.ar/estudios_demanda.htm.