

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE
VALENCIA**



**APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTOS A BASE DE QUITOSANO Y
ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN EN EL CONTROL DE LA
POSCOSECHA DE LA PODREDUMBRE AZUL DE NARANJAS**

MASTER EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

AXEL BRITO ROCHA

MARÍA TERESA CHÁFER NÁCHER

MARÍA CONSUELO GONZÁLES MARTÍNEZ

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el desarrollo
Departamento de Tecnología de los alimentos. Universidad Politécnica de
Valencia. Camino de Vera s/n. 46022- Valencia, España

APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTOS A BASE DE QUITOSANO Y ACEITE ESENCIAL DE LIMON EN EL CONTROL DE LA POSCOSECHA DE LA PODREDUMBRE AZUL DE NARANJAS

Brito, A.; Sánchez-González, L; González-Martínez, Ch.; Vargas, M.; Cháfer, M.

RESUMEN

Se analizó el posible efecto antimicrobiano de recubrimientos a base de quitosano y aceite esencial de limón como posibles alternativas a los fungicidas sintéticos para el control de la podredumbre azul de naranjas navel. Se evaluaron además los principales aspectos de calidad de las naranjas en diferentes condiciones de almacenamiento (ambiente y frigoconservación). Para analizar la capacidad antifúngica de los recubrimientos, se inocularon las naranjas con *Penicillium italicum* (nivel infección 10^5 esporas·mL⁻¹) y se evaluó la evolución de la infección en las condiciones óptimas para el desarrollo del hongo. En el estudio de calidad, se utilizaron dos condiciones de almacenamiento: ambiente (8 semanas a 23°C y 60% de humedad relativa, HR) y frigoconservación (13 semanas a 5°C y 90% HR más 1 semana ambiente). A diferentes tiempos de almacenamiento, se caracterizaron los principales parámetros de calidad de las naranjas. Los recubrimientos utilizados mejoran la mayoría de los parámetros de calidad evaluados, sobre todo las pérdidas de peso, % de zumo, firmeza, índice de madurez y vitamina C. Estas mejoras se potencian con las bajas temperaturas y son especialmente destacables en las frutas recubiertas con quitosano y aceite esencial de limón donde además se observó una mayor actividad antifúngica..

Palabras clave: Quitosano, *Penicillium italicum*, antimicrobiano

ABSTRACT

We analyzed the possible antimicrobial effect of chitosan-based coatings and lemon essential oil as possible alternatives to synthetic fungicides to control blue mould of navel oranges. It also assessed the main aspects of quality of oranges in different storage conditions (ambient and cold storage). To test the antifungal ability of the coatings, oranges inoculated with *Penicillium italicum* (10^5 espors.mL⁻¹ infection level) and assessed the evolution of infection in the optimal conditions for fungal growth. In the study of quality, using two different storage conditions: ambient (8 weeks at 23 °C and 60% relative humidity, RH) and cold storage (13 weeks at 5 °C and 90% RH plus one week in ambient conditions). At different storage times, we characterized the main parameters of quality of oranges. The coatings used improve the quality parameters evaluated, especially weight loss,% juice, firmness, maturity index and vitamin C. These improvements are enhanced by low temperatures and are especially

noteworthy in fruit coated with chitosan and lemon essential oil which also showed a higher antifungal activity.

RESUM

Es va analitzar el possible efecte antifúngic de recobriments a base de quitosà i oli essencial de llima com a possibles alternatives als fungicides sintètics per al control de la pudrició blava de les taronges navel. Es van avaluar també els principals aspectes de qualitat de les taronges en diferents condicions d'emmagatzematge (ambient i frigoconservació). Per tal d'analitzar la capacitat antifúngica dels recobriments, es van inocular taronges amb *Penicillium italicum* (nivell d'infecció 10^5 espores·mL⁻¹) i es va avaluar l'evolució de la infecció en les condicions òptimes per al desenvolupament del fong. A l'estudi de qualitat, es van utilitzar dues condicions de conservació: ambient (8 setmanes a 23°C i 60% de humitat relativa, HR) i frigoconservació (13 setmanes a 5°C i 90% HR més 1 setmana ambient). A diferents temps d'emmagatzematge, es van caracteritzar els principals paràmetres de qualitat de les taronges. Els recobriments utilitzats milloren la majoria dels paràmetres de qualitat avaluats, fonamentalment les pèrdues de pes, % de suc, firmesa, índex de maduresa i vitamina C. Estes millores es veuen potenciades a baixes temperatures i són especialment remarcables en les fruites recobertes amb quitosà i oli essencial de llima on a més es va observar una major activitat antifúngica.

INTRODUCCIÓN

Los Cítricos son los cultivos de mayor importancia económica en España y uno de los más importantes en el ámbito mundial. En la poscosecha de cítricos las principales enfermedades son causadas por los hongos *Penicillium digitatum* (podredumbre verde) y *Penicillium italicum* (podredumbre azul) (Valencia-Chamorro et al., 2008). Los fungicidas químicos de síntesis han sido ampliamente aplicados para controlar estos microorganismos (Eckert y Eacks, 1989). Sin embargo la tendencia actual de la industria alimentaria va encaminada hacia la obtención de alimentos más sanos y seguros de acuerdo con los principios de sostenibilidad y respeto al medio ambiente. Numerosas investigaciones buscan alternativas al uso de estos químicos de síntesis para el control de la podredumbre cítrica (Plaza et al., 2004; Palou et al., 2008). Una de estas alternativas son los recubrimientos a base de compuestos naturales con propiedades antimicrobianas (Contreras-Oliva et al., 2008). A estos recubrimientos se les pueden incorporar aditivos naturales como los aceites esenciales que mejoren sus propiedades. Los recubrimientos proporcionan una barrera semipermeable al intercambio gaseoso de oxígeno, dióxido de carbono y vapor de agua, lo que puede reducir las pérdidas de peso, ralentizar la actividad respiratoria y retrasar la senescencia de los frutos. Además aportan brillo a las frutas lo que contribuye a mejorar su calidad visual (Tereza y

Krochta 2000). En concreto, la aplicación de recubrimientos comestibles a cítricos supone mejoras en aspectos de calidad como la pérdida de peso y firmeza (Salvador et al., 2003; Chien et al., 2007). Otros estudios han demostrado que la incorporación de aceites esenciales, en concreto el árbol del té, a matrices de polisacáridos mejoran sus propiedades barrera al agua a la vez que consiguen un control efectivo de la podredumbre cítrica (Navarro et al., 2008). El quitosano es un producto natural que posee la propiedad de formar películas para usarlo como recubrimiento (No et al., 2007). Este producto es un polisacárido catiónico con alto peso molecular compuesto por unidades de glucosamina con uniones β (1-4) y se obtiene por desacetilación alcalina de extractos de quitina, el mayor componente del caparazón de crustáceos (No et al., 2007; Coma et al., 2002) El quitosano comercial presenta diferentes grados de desacetilación y de pesos moleculares, lo cual está directamente relacionado con sus diferentes propiedades funcionales y sus efectos antimicrobianos (No et al., 2007). Su actividad antimicrobiana ha sido demostrada en numerosas aplicaciones en algunos cítricos o frutas en general (Li y Yu, 2000; Srinivasa et al., 2002; Bautista-Baños et al., 2006; Vargas et al., 2007). Por otra parte el aceite esencial de limón ha mostrado también efectos antimicrobiano en estudios in vitro y aplicados a diferentes alimentos (Romeo, 2008; Fischer et al., 2008). En concreto Caccioni et al. (1998) comprobaron su efectividad antifúngica contra *Penicillium digitatum* e *italicum* siendo los flavonoides y terpenos los principales agentes antimicrobianos de este aceite esencial (Viuda-Martos et al., 2008).

El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de recubrimientos de quitosano, con y sin aceite esencial de limón, en la calidad poscosecha de naranjas (cv. Navel Powell) almacenadas en diferentes condiciones. Además también se evaluó la posible capacidad antimicrobiana de estos recubrimientos.

MATERIAL VEGETAL

El material vegetal utilizado fueron naranjas cv. Navel Powell procedentes de cultivo ecológico, y sin ningún tratamiento poscosecha. Las naranjas fueron recolectadas y llevadas inmediatamente al laboratorio para su correspondiente manipulación. Las naranjas se lavaron con una disolución de hipoclorito sódico (10 mg/L) enjuagadas y secadas al aire.

PREPARACIÓN Y APLICACIÓN DE LAS FORMULACIONES

La metodología de preparación de las FFR fue estandarizada del siguiente modo. Se dispersó quitosano (1% p/p) en agua destilada, se añadió el ácido acético glacial (0.001 % v/p) y se dejó en agitación durante 12 horas.

A una parte de las formulaciones, una vez disuelto el polisacárido, se le añadió el aceite esencial de limón (3% p/p). Las FFR fueron homogeneizadas

con un homogeneizador rotor-estator (Ultraturrax T25, Janke & Kunkel, Alemania) a 13500 rpm durante 4 minutos y desgasificadas con una bomba de vacío (Diaphragm vacuum puma, Wertheim, Alemania) a temperatura ambiente.

Los ingredientes de las formulaciones formadoras de recubrimientos fueron: agua destilada, quitosano (Chitosan, high molecular weight, aldrich, EEUU) ácido acético glacial (Panreac Química SA, Barcelona España) y el aceite esencial de limón (AE, Herbes del moli, Alicante, España).

A partir de estas formulaciones y tras aplicarlas a los frutos cítricos, se llevaron a cabo dos estudios en paralelo con el objetivo de evaluar:

1. Calidad poscosecha de las naranjas recubiertas (sin inocular) durante su almacenamiento en dos condiciones de almacenamiento diferente (ambiente y frigoconservación).
2. Efectividad antimicrobiana de los recubrimientos aplicados a naranjas a almacenadas en condiciones ambiente. Estas naranjas fueron posteriormente inoculadas con el hongo *Penicillium italicum*.

En ambos estudios se dejaron una serie de frutos sin recubrir como control. Todos los frutos fueron colocados en bandejas perforadas evitando el contacto entre los mismos para someterse a las condiciones de almacenamiento correspondientes.

CALIDAD POSCOSECHA

La figura 1 muestra el procedimiento utilizado para evaluar la calidad poscosecha de los frutos.

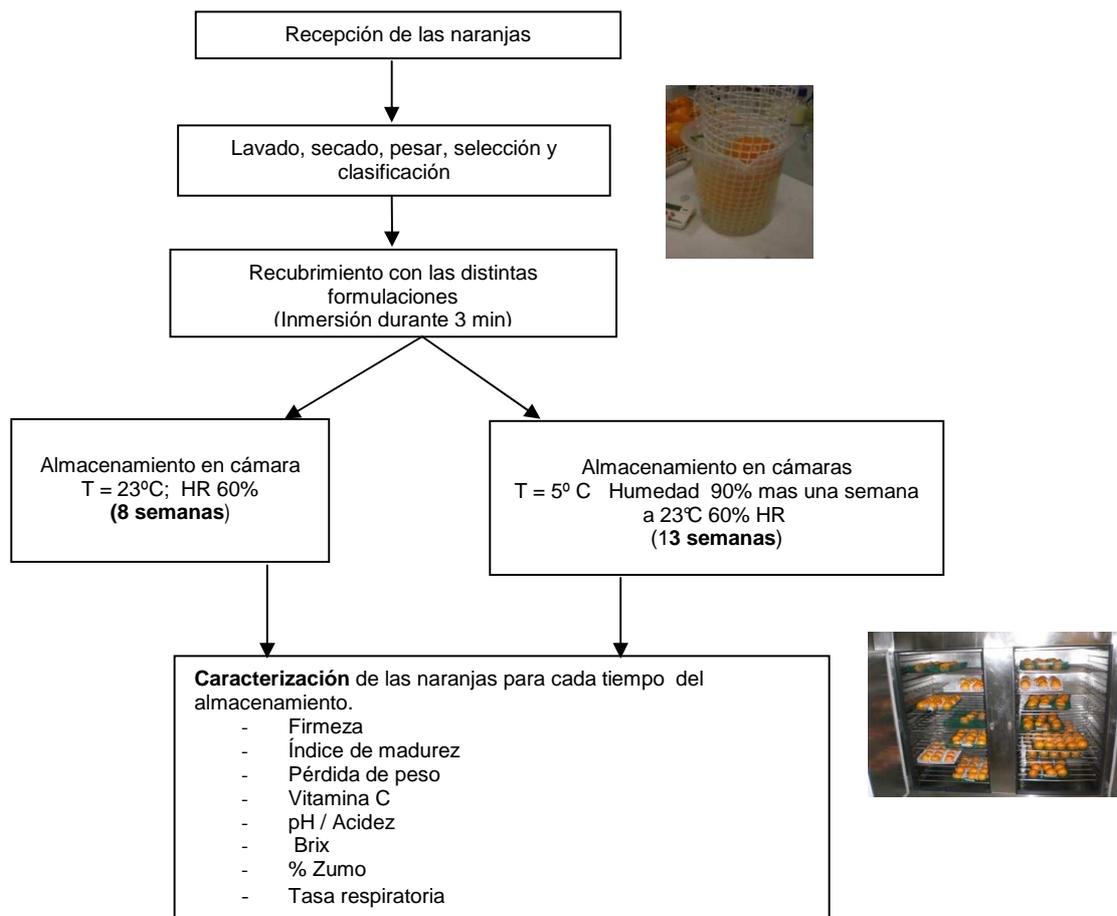


FIGURA 1. Metodología seguida para la caracterización poscosecha de las naranjas

Las naranjas (sin infectar) fueron sumergidas durante 3 minutos en cada formulación y tras el secado de las formulaciones fueron sometidas a dos condiciones de almacenamiento, (23°C 60% HR y 5°C 90% HR) tal y como se indica en la Figura 1. Se utilizaron naranjas sin recubrir como muestras control. Se utilizaron un total de 20 naranjas por tratamiento (con y sin recubrimiento), condición y tiempo de almacenamiento. Antes de almacenar y a diferentes tiempos de almacenamiento (2, 4, 6, 8 y 13 semanas) se llevó a cabo el análisis de diferentes variables fisicoquímicas características de la calidad del fruto (pH, acidez, Brix, firmeza, tasa respiratoria, porcentaje de zumo). La vitamina C se cuantificó únicamente al principio y final del almacenamiento. Los análisis se realizaron en general por triplicado, excepto la firmeza para la que se utilizaron todas las muestras de cada tiempo de análisis.

EFFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS RECUBRIMIENTOS

Para analizar el efecto antimicrobiano de los recubrimientos aplicados se llevó a cabo la infección de las naranjas con *Penicillium italicum*, teniendo como control naranjas sin infectar. El protocolo de cómo se hizo esta experiencia se

puede observar en la figura 2. Se utilizaron un total de 20 naranjas por tratamiento (con y sin recubrimiento).

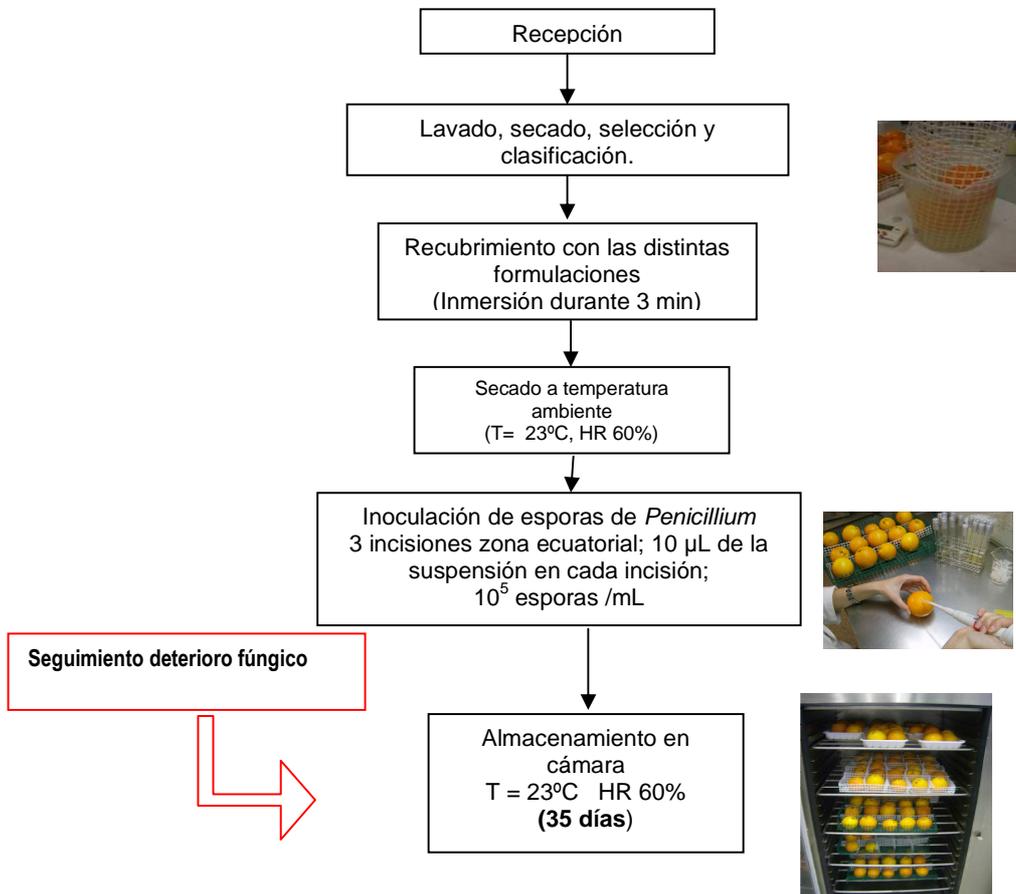


FIGURA 2. Metodología para el análisis microbiológico de las naranjas.

Determinaciones analíticas

Pérdida de peso: Todas las naranjas fueron pesadas antes y para cada tiempo del almacenamiento con una balanza analítica (± 0.001 gramos), para calcular las pérdidas de peso durante el periodo de almacenamiento.

Firmeza: Las medidas de deformación se realizaron mediante un analizador de textura Texture Analyser TA-XT-plus (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido), con una célula de carga de 50 N y sensor P/75. Se utilizó un ensayo de deformación hasta llegar al 5% de deformación del fruto, una velocidad del émbolo de 1 mm/seg. y una fuerza de la célula de carga de 10 g.

Tasa respiratoria: se determinó utilizando un sistema estático. Los frutos se introdujeron en frascos herméticos de vidrio de 2 L, con un septum en la tapa para efectuar la medida de concentración de gases en el espacio de cabeza a los diferentes tiempos. Los frascos se almacenaron en las dos condiciones de

almacenamiento indicadas en el apartado anterior de calidad poscosecha (ambiente y frigoconservación). La medida de la concentración de gases se efectuó por medio de una aguja conectada a un analizador de gases (CheckMate 9900 PBI Dansensor, Ringsted, Dinamarca). Se consideraron los puntos experimentales en el intervalo de tiempo donde se observó una relación lineal entre la concentración de gases y el tiempo. La tasa respiratoria TR_i ($\text{mL}\cdot\text{Kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) de las muestras en términos de generación de CO_2 (ec. 1) y consumo de O_2 (ec.2) se determinó a partir de la pendiente de la ecuación lineal del ajuste: concentración de gases frente al tiempo.

$$TR_{\text{O}_2} = \frac{y_{t_0}^{\text{O}_2} - y_{t_1}^{\text{O}_2} \times V}{100 \times M \times t} \quad (\text{Ec. 1})$$

$$TR_{\text{CO}_2} = \frac{y_{t_0}^{\text{CO}_2} - y_{t_1}^{\text{CO}_2} \times V}{100 \times M \times t} \quad (\text{Ec. 2})$$

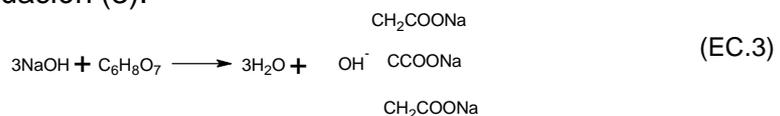
Donde y_t^i es la concentración de gases ($\% \text{O}_2$, $\% \text{CO}_2$) a tiempo t , i siendo O_2 (Ec. 1) o CO_2 (Ec. 2), M es la masa de la muestra (Kg) y V el volumen del espacio de cabeza (mL)

Porcentaje en zumo: El porcentaje en zumo se determinó a partir del peso de zumo extraído de los frutos correspondientes a cada tiempo respecto al % en zumo inicial de los frutos.

pH: La medida del pH se realizó con un pH-metro Modelo GLP 21+ (Crison, Barcelona). Se utilizó 10 gr de zumo y se homogeneizó con 20 ml de agua destilada. Las medidas se realizaron a una temperatura de 20°C .

Sólidos solubles totales, se determinaron mediante un refractómetro Modelo 3T ABBE (ATAGO Co Ltd, Japón) termostatado a 20°C .

Acidez: Se determinó según el método oficial 942.15 (AOAC, 1995). Para ello, se valoró el zumo con una solución de NaOH 0.1N, controlándose el punto final con la ayuda de un pH-metro hasta alcanzar un pH de 8,1. El pH-metro utilizado fue el Modelo GLP 21+ (Crison, Barcelona). Los resultados fueron expresados en g de ácido cítrico por 100 g de zumo, calculándose mediante la estequiometría de la ecuación (3):



Donde: el número de moles de NaOH es igual a 1/3 de moles de ácido cítrico y con el peso molecular del ácido cítrico (192.07g/mol) obtenemos la acidez

Índice de madurez (IM): se calculó como el cociente entre sólidos solubles y acidez.

Ácido ascórbico: Se determinó mediante el método 967.21 AOAC (AOAC, 2000), método de titulación mediante el 2,6 dicloroindofenol usando como solución extractora ácido metafosfórico. El indicador se estandarizó con una

disolución patrón de ácido ascórbico. Se valoraron 10 mL de esta dilución patrón con el indicador 2,6 dicloroindofenol. Para la valoración de la muestra se diluyeron 5 mL de zumo en 5 mL de ácido metafosfórico (25%) y se enrasó hasta 25 mL con agua destilada y se valoraron 10 mL de esta dilución con el indicador 2,6 dicloroindofenol. Se calculó el contenido de ácido ascórbico de la muestra (Vitamina C), expresado en mg de ácido ascórbico por 100 mL de muestra, utilizando la ecuación 4:

$$\text{VitC} = \frac{f \times V \times 10}{v} \times 100 \quad \text{Ec.(4)}$$

Donde: f, mg de ácido ascórbico equivalentes a 1 mL de indicador; V, volumen de indicador gastado (mL); v, volumen de muestra (mL)

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante un análisis de la varianza (ANOVA) mediante el software Statgraphics plus® versión 5.1, utilizando un nivel de significación del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

CALIDAD POSCOSECHA DE LAS NARANJAS EN CONDICIONES AMBIENTALES

Los valores obtenidos para la caracterización de los frutos en general (tabla de la 1 a la 6) son del orden de los consultados para naranjas (www.infoagro.com). Además en naranjas de maduración tardía, la Norma de Calidad para Cítricos (DOCV de 26 de noviembre de 2008) indica los siguientes valores mínimos para su comercialización: índices de madurez de 6.5 y porcentaje en zumo (30%). En este estudio las naranjas superan ampliamente los valores de esta variables (índice de madurez 12.2 y 55% de zumo) lo que demuestra una estado de maduración muy avanzado de la fruta.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos para las diferentes variables fisicoquímicas muestra una influencia significativa del tiempo de almacenamiento en la mayoría de las variables analizadas, como cabe esperar por tratarse de un almacenamiento no refrigerado y en un período de tiempo largo (8 semanas) como se puede observar en las distintas tablas de la 1 a la 6. Así también se puede ver, tanto en los frutos no recubiertos como en los recubiertos, aumentos significativos de brix tabla 1, del pH tabla 2 (acompañados por los correspondientes descensos de la acidez), e índice de madurez tabla 3 y tabla 4 respectivamente a lo largo del almacenamiento en condiciones ambiente. En general, las disminuciones de acidez y aumentos de los grados brix suponen aumentos notables del índice de madurez (respecto al índice de madurez inicial) de las muestras que oscila en torno al 60% en los frutos sin recubrir y es un poco más bajo en los recubiertos, en torno al 52%. En algunas de estas variables se observaron diferencias significativas entre los

diferentes tipos de recubrimiento destacando: pH menor, acidez mayor e índice de madurez menor en los frutos recubiertos con quitosano-limón, excepto en la semana 4 de almacenamiento donde las diferencias no llegaron a ser significativas.

TABLA 1. Grados Brix de las muestras en condiciones ambiente. Medias y desviación estándar en paréntesis.

°Brix	Control		Quitosano		Quitosano-Limón	
semana 0	11.18	(0.97) ^A	11.18	(0.97) ^A	11.18	(0.97) ^A
semana 2	12.02	(0.17) ^{xB}	11.61	(0.32) ^{yA}	11.53	(0.15) ^{yAB}
semana 4	11.92	(0.12) ^{xB}	11.5	(0.13) ^{xA}	11.86	(0.69) ^{xBBC}
semana 6	12.3	(0.41) ^{xBBC}	12.2	(0.28) ^{xB}	12.26	(0.37) ^{xCD}
semana 8	12.67	(0.31) ^{xC}	12.19	(0.32) ^{yB}	12.42	(0.04) ^{yD}

^{x,y,z} Superíndices diferentes en la misma fila indican diferencias significativas por efecto del recubrimiento ($p < 0,05$)

^{A,B,C} Superíndices diferentes en misma la misma columna indican diferencias significativas por efecto del tiempo ($p < 0,05$)

TABLA 2. pH de las muestras en condiciones ambiente. Medias y desviación estándar en paréntesis.

pH	Control		Quitosano		Quitosano-limón	
Semanas	pH		pH		pH	
0	3.40	(0.06) ^A	3.40	(0.06) ^A	3.40	(0.06) ^A
2	3.52	(0.01) ^{xB}	3.51	(0.01) ^{xyB}	3.50	(0.02) ^{yB}
4	3.59	(0.11) ^{xC}	3.54	(0.06) ^{xB}	3.56	(0.01) ^{xC}
6	3.60	(0.05) ^{xC}	3.60	(0.01) ^{xC}	3.57	(0.01) ^{yC}
8	3.67	(0.05) ^{xD}	3.58	(0.00) ^{yC}	3.57	(0.06) ^{yC}

^{x,y,z} Superíndices diferentes en la misma fila indican diferencias significativas por efecto del recubrimiento ($p < 0,05$)

^{A,B,C} Superíndices diferentes en misma la misma columna indican diferencias significativas por efecto del tiempo ($p < 0,05$)

TABLA 3. Acidez de las muestras en condiciones ambiente. Medias y desviación estándar en paréntesis.

Acidez ¹	Control		Quitosano		Quitosano-Limón	
semana 0	0.91	(0.06) ^A	0.91	(0.06) ^A	0.91	(0.06) ^A
semana 2	0.892	(0.003) ^{xA}	0.891	(0.003) ^{xA}	0.912	(0.012) ^{yB}
semana 4	0.66	(0.09) ^{xB}	0.722	(0.112) ^{xB}	0.713	(0.007) ^{xC}
semana 6	0.67	(0.07) ^{xB}	0.65	(0.02) ^{xC}	0.77	(0.02) ^{yD}
semana 8	0.651	(0.018) ^{xB}	0.65 ^C	(0.02) ^{xC}	0.67	(0.03) ^{xD}

^{x,y,z} Superíndices diferentes en la misma fila indican diferencias significativas por efecto del recubrimiento ($p < 0,05$)

^{A,B,C} Superíndices diferentes en misma la misma columna indican diferencias significativas por efecto del tiempo ($p < 0,05$)

¹g ácido cítrico/100g

TABLA 4. Índice de madurez de las muestras en condiciones ambiente. Medias y desviación estándar en paréntesis.

IM	Control		Quitosano		Quitosano limón	
Semanas	IM		IM		IM	
0	12.24	(0.20) ^a	12.24	(0.20) ^a	12.24	(0.20) ^a
2	13.44	(0.20) ^{xb}	13.01	(0.37) ^{ya}	12.67	(0.20) ^{za}
4	16.83	(0.70) ^{xc}	16.36	(0.45) ^{xb}	16.41	(0.64) ^{xb}
6	18.61	(1.77) ^{xd}	18.72	(0.85) ^{xc}	15.99	(0.47) ^{yc}
8	19.64	(1.01) ^{xd}	18.64	(0.84) ^{xy^c}	18.57	(0.27) ^{yc}

^{x,y,z} Superíndices diferentes misma fila indican diferencias significativas por efecto del recubrimiento ($p < 0,05$)

^{A,B,C} Superíndices diferentes en misma la misma columna indican diferencias significativas por efecto del tiempo ($p < 0,05$)

TABLA 5. Porcentaje en zumo de las muestras en condiciones ambiente. Medias y desviación estándar en paréntesis.

% zumo	Control		Quitosano		Quitosano-Limón	
semana 0	55.112	(0.006) ^A	55.112	(0.006) ^A	55.112	(0.006) ^A
semana 2	50.99	(1.09) ^{xb}	50.84	(0.73) ^{xb}	50.75	(0.85) ^{xb}
semana 4	46.06	(0.97) ^{xc}	47.02	(0.06) ^{xc}	46.88	(0.57) ^{xc}
semana 6	44.84	(0.17) ^{xcd}	45.93	(1.22) ^{xcd}	46.53	(1.04) ^{xc}
semana 8	43.78	(0.59) ^{xd}	44.75	(0.80) ^{xy^d}	45.00	(0.09) ^{yd}

^{x,y,z} Superíndices diferentes en la misma fila indican diferencias significativas por efecto del recubrimiento ($p < 0,05$)

^{A,B,C} Superíndices diferentes en misma la misma columna indican diferencias significativas por efecto del tiempo ($p < 0,05$)

TABLA 6. Vitamina C de las muestras en condiciones ambiente.. Medias y desviación estándar en paréntesis.

Vit. C ²	Control		Quitosano		Quitosano limón	
Semanas	Vit C		Vit C		Vit C	
0	47.41	(0.93) ^a	47.41	(0.93) ^a	47.41	(0.93) ^a
8	27.29	(0.30) ^{xb}	27.40	(1.83) ^{xb}	28.36	(0.63) ^{xb}

^{x,y,z} Superíndices diferentes misma fila indican diferencias significativas por efecto del recubrimiento ($p < 0,05$)

^{A,B,C} Superíndices diferentes en misma la misma columna indican diferencias significativas por efecto del tiempo ($p < 0,05$)

² mg ácido ascórbico /100 mL

El efecto del recubrimiento mostró una tendencia notable en las variables % en zumo tablas 5, firmeza figura 3 (a) y pérdida de peso (b). La tendencia observada es: mayor pérdida de peso, menor firmeza y menor % de zumo en el sentido control > quitosano > quitosano-limón. Así los frutos recubiertos tienden a perder menos peso, siendo significativo en los frutos recubiertos con la formulación quitosano-limón donde se observan diferencias significativas en

todos los tiempos de almacenamiento, excepto en la última semana. En estos frutos se detectaron además los niveles más altos de porcentaje en zumo (45%) y vitamina C al final del almacenamiento tabla 6 (28.36 mg. de ácido ascórbico/100 mL zumo). Las pérdidas de vitamina C están en general alrededor del 42%, tanto en los frutos recubiertos como no recubiertos. Estudios previos (Navarro, 2008) de aplicación de recubrimientos con aceites esenciales (árbol del té) a naranjas almacenadas en condiciones similares mostraron resultados parecidos en cuanto a la evolución de algunas de estas variables (brix, pH, acidez, índice de madurez). Por otra parte Salvador et al. (2003) en estudios de aplicación de recubrimientos de quitosano a mandarinas, almacenadas a 20°C, encontró resultados similares en cuanto a la evolución de la firmeza y pérdida de peso.

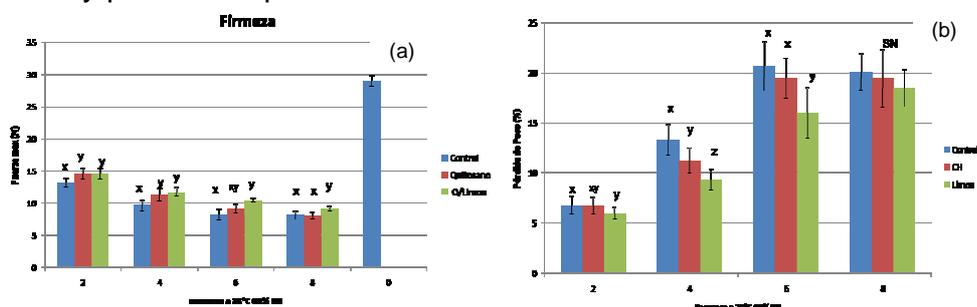


FIGURA 3. Fuerzas máximas para las naranjas en condiciones ambiente. (a) y Porcentaje de pérdida de peso para las naranjas en condiciones ambiente. (b). ^{x,y,z} Superíndices diferentes misma fila indican diferencias significativas por efecto del recubrimiento ($p < 0,05$)

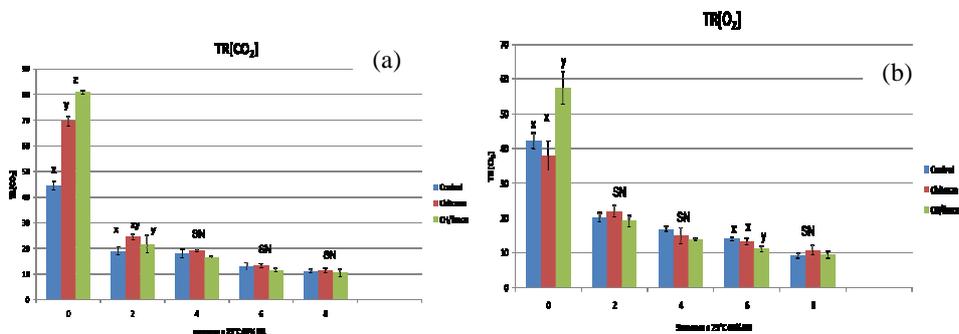
Tasa respiratoria

En cuanto a la determinación de la tasa respiratoria, evaluada a través del consumo de oxígeno o generación de CO₂, es uno de los parámetros más importantes a evaluar en la calidad de los frutos, ya que caracteriza su actividad metabólica. Los recubrimientos son barreras a los gases y la mayor o menor disponibilidad de oxígeno influye en numerosas reacciones que conducen al fruto a un deterioro más o menos rápido. Por otra parte, limitar en exceso la disponibilidad de oxígeno o una acumulación excesiva de CO₂ puede resultar muy perjudicial para el fruto. Este, como cualquier tejido vivo, necesita continuar de forma controlada con su actividad metabólica, evitando así el inicio de otras rutas anaeróbicas que podrían causar putrefacciones e incluso riesgos para la salud.

En la figura 4 se observa el consumo de oxígeno y generación de CO₂ de los frutos, recubiertos y no recubiertos, para los diferentes tiempos de almacenamiento. Los resultados del tratamiento estadístico mostraron que en general no hay diferencias significativas en la tasa respiratoria entre los frutos recubiertos y no recubiertos, excepto al inicio, inmediatamente después de la aplicación de las formulaciones y antes de comenzar el almacenamiento

(tiempo 0 de almacenamiento en la figura). En este momento, los frutos recubiertos muestran una tasa respiratoria significativamente mayor (mayor consumo de O_2 y generación de CO_2) que los no recubiertos, como cabe esperar en una situación de stress del fruto como es la aplicación del recubrimiento y tal como han descrito otros autores (Amarante y Banks, 2001; Hagenmaier y Baker, 1994). Esta situación desaparece durante el almacenamiento posterior, donde se observa una disminución generalizada de la tasa respiratoria de todos los frutos con una ligera tendencia a menores tasas de respiración en los frutos recubiertos, especialmente con quitosano-limón. Este descenso de la tasa de respiración es drástico al primer tiempo de análisis (a las 2 semanas) con una disminución de la tasa mayor del 50% respecto a los frutos control (sin recubrir y a tiempo 0). Entre las 2 y 8 semanas de almacenamiento el descenso es mucho más lento y progresivo hasta llegar a niveles entorno a 10 mL/kg h, tanto en consumo de oxígeno como generación de CO_2 . Los valores de la tasa respiratoria de la materia prima, evaluados a través de la generación de CO_2 , son superiores a los consultados en bibliografía para naranjas (www.ucdavis.edu/index.html) debido al elevado grado de madurez de las naranjas utilizadas en este estudio.

En la figura 5 se observa la evolución del cociente respiratorio. Valores altos de este cociente y de la tasa respiratoria indicarían una disponibilidad limitada de oxígeno por el fruto. Durante el almacenamiento el cociente respiratorio se mantiene en torno a 1 lo que pone de manifiesto que no existe riesgo de rutas anaeróbicas y por tanto de reacciones fermentativas en el período analizado.



FIGUAR 4. Tasa respiratoria de O_2 (a) y tasa respiratoria de CO_2 (b) para las naranjas en condiciones ambiente.). ^{x,y,z} Superíndices diferentes misma fila indican diferencias significativas por efecto del recubrimiento ($p < 0,05$)

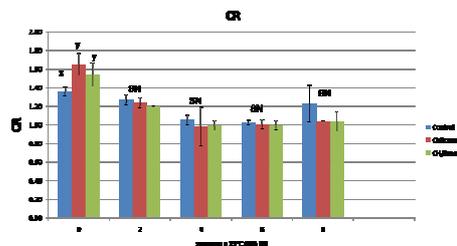


FIGURA 5. Cociente respiratorio de las naranjas en condiciones ambiente. ^{x,y,z} Superíndices diferentes misma fila indican diferencias significativas por efecto del recubrimiento ($p < 0,05$)

CALIDAD POSCOSECHA DE LAS NARANJAS FRIGOCONSERVADAS

En los frutos sometidos al almacenamiento refrigerado (13 semanas), el análisis estadístico de los resultados para las diferentes variables fisicoquímicas muestra en general una influencia significativa del tiempo de almacenamiento como se puede observar en las tablas de la 7 a la 12. Por otra parte se observan, tanto en los frutos no recubiertos como en los recubiertos: aumentos significativos de los grados brix (tablas 7), pH tabla 8 (acompañados por los correspondientes descensos de la acidez), e índice de madurez (tabla 9 y 10 respectivamente) a lo largo del almacenamiento. En general, las disminuciones de acidez y aumentos de °brix llevaron consigo aumentos del índice de madurez entorno al 65% en los frutos sin recubrir y entre el 30-40% para los frutos recubiertos (menor índice de madurez en los frutos recubiertos con quitosano-limón). En algunas de estas variables se observaron además diferencias significativas por efecto del recubrimiento: pH menor, acidez mayor e índice de madurez menor en los frutos recubiertos con respecto al control, siendo estas diferencias ligeramente mayores en los recubrimientos con quitosano-limón.

Si se comparan estos datos con los frutos almacenados en condiciones ambiente se observa que en general la conservación refrigerada junto con el efecto del recubrimiento mejora algunos aspectos de calidad, como cabría esperar. Se mantiene mejor el índice de madurez de los frutos (los descensos de acidez y aumentos de °brix son menores).

TABLA 7. Grados Brix de las naranjas en condiciones de frigoconservación. Medias y desviación estándar

°Brix	Control		Quitosano		Quitosano-Limón	
semana 0	11.18	(0.97) ^A	11.18	(0.97) ^A	11.18	(0.97) ^A
semana 4	11.823	(0.112) ^{xB}	11.78	(0.07) ^{xB}	11.49	(0.13) ^{YA}
semana 6	11.74	(0.09) ^{xB}	11.312	(0.203) ^{yAB}	11.39	(0.12) ^{YA}
semana 8	12.51	(0.19) ^{xC}	12.22	(0.53) ^{xCB}	12.22	(0.53) ^{xB}
semana 13	11.87	(0.14) ^{xB}	11.63	(0.10) ^{yAB}	11.46	(0.09) ^{ZA}

^{x,y,z} Superíndices diferentes en la misma fila indican diferencias significativas por efecto del recubrimiento ($p < 0,05$)

^{A,B,C} Superíndices diferentes en misma la misma columna indican diferencias significativas por efecto del tiempo ($p < 0,05$)

TABLA 8. pH de las naranjas en condiciones de frigoconservación. Medias y desviación estándar

pH	Control		Quitosano		Quitosano limón	
Semanas	pH		pH		pH	
0	3.40	(0.06) ^a	3.40	(0.06) ^a	3.40	(0.06) ^a
4	3.55	(0.02) ^{xb}	3.51	(0.01) ^{yb}	3.51	(0.01) ^{yb}
6	3.62	(0.01) ^{xc}	3.60	(0.01) ^{yc}	3.54	(0.01) ^{zc}
8	3.62	(0.02) ^{xc}	3.47	(0.02) ^{yd}	3.54	(0.01) ^{yc}
13	3.77	(0.52) ^{xd}	3.68	(0.68) ^{ye}	3.62	(0.72) ^{zd}

X,Y,Z Superíndices diferentes en la misma fila indican diferencias significativas por efecto del recubrimiento ($p < 0,05$)

A,B,C Superíndices diferentes en la misma la misma columna indican diferencias significativas por efecto del tiempo ($p < 0,05$)

TABLA 9. Acidez de las naranjas en condiciones de frigoconservación. Medias y desviación estándar

Acidez ¹	Control		Quitosano		Quitosano-Limón	
semana 0	0.91	(0.06) ^A	0.91	(0.06) ^A	0.91	(0.06) ^A
semana 4	0.65	(0.07) ^{xB}	0.69	(0.03) ^{yB}	0.71	(0.07) ^{yB}
semana 6	0.66	(0.06) ^{xB}	0.68	(0.04) ^{xB}	0.7	(0.09) ^{xB}
semana 8	0.66	(0.04) ^{xB}	0.72	(0.06) ^{yB}	0.72	(0.06) ^{yB}
semana 13	0.59	(0.02) ^{xC}	0.68	(0.04) ^{yB}	0.72	(0.04) ^{yB}

X,Y,Z Superíndices diferentes en la misma fila indican diferencias significativas por efecto del recubrimiento ($p < 0,05$)

A,B,C Superíndices diferentes en la misma la misma columna indican diferencias significativas por efecto del tiempo ($p < 0,05$)

¹ mg ácido ascórbico/100 mL

TABLA 10. Índice de madurez de las muestras en condiciones de frigoconservación. Medias y desviación estándar

IM	Control		Quitosano		Quitosano limón	
Semanas	IM		IM		IM	
0	12.22	(0.20) ^a	12.22	(0.20) ^a	12.22	(0.20) ^a
4	16.66	(1.43) ^{xb}	16.41	(0.09) ^{xb}	15.12	(1.74) ^{yb}
6	17.95	(1.59) ^{xb}	16.59	(0.90) ^{yb}	15.03	(0.16) ^{zbc}
8	17.72	(1.27) ^{xb}	16.67	(1.16) ^{yb}	15.62	(0.13) ^{yc}
13	20.13	(1.56) ^{xc}	17.20	(1.13) ^{yb}	15.94	(0.92) ^{zc}

X,Y,Z Superíndices diferentes en la misma fila indican diferencias significativas por efecto del recubrimiento ($p < 0,05$)

A,B,C Superíndices diferentes en la misma la misma columna indican diferencias significativas por efecto del tiempo ($p < 0,05$)

TABLA 11. Porcentaje en zumo de las naranjas en condiciones de frigoconservación. Medias y desviación estándar

% zumo	Control		Quitosano		Quitosano-Limón	
semana 0	55.112	(0.006) ^A	55.112	(0.006) ^A	55.112	(0.006) ^A
semana 4	45.71	(0.25) ^{xB}	46.41	(0.54) ^{xB}	47.50	(0.43) ^{yB}

semana 6	44.62	(0.31) ^{xBC}	46.40	(1.31) ^{xyB}	47.25	(0.46) ^{yB}
semana 8	43.67	(1.02) ^{xC}	45.46	(0.63) ^{xB}	45.46	(0.63) ^{xC}
semana 13	36.32	(0.91) ^{xD}	42.09	(0.27) ^{yC}	43.77	(0.32) ^{yC}

^{x,y,z} Superíndices diferentes en la misma fila indican diferencias significativas por efecto del recubrimiento ($p < 0,05$)

^{A,B,C} Superíndices diferentes en misma la misma columna indican diferencias significativas por efecto del tiempo ($p < 0,05$)

TABLA 12. Vitamina C para las naranjas en condiciones de frigoconservación. Medias y desviación estándar

Vit. C¹	Control	Quitosano	Quitosano limón
Semanas	Vit C	Vit C	Vit C
0	47.41	(0.93) ^a	47.41 (0.93) ^a
8	42.23	(0.95) ^{xb}	42.86 (0.95) ^{xyb}
13	25.50	(0.14) ^{xc}	26.82 (0.65) ^{yc}
			28.25 (0.90) ^{zb}

^{x,y,z} Superíndices diferentes en la misma fila indican diferencias significativas por efecto del recubrimiento ($p < 0,05$)

^{A,B,C} Superíndices diferentes en misma la misma columna indican diferencias significativas por efecto del tiempo ($p < 0,05$)

¹ g ácido cítrico/100 g

El efecto del recubrimiento mostró una influencia notable en las variables % en zumo tabla 11, firmeza, pérdida de peso (figura 6 a y b respectivamente) y contenido en vitamina C (tabla 12), tal y como se observa en su correspondiente tabla o figura tiende a una mayor pérdida de peso, menor firmeza, menor nivel de vitamina C y menor % de zumo en el sentido: control>quitosano>quitosano-limón. Así los frutos recubiertos perdieron menos peso, siendo este efecto significativo a partir de la semana 6 de almacenamiento para los dos tipos de recubrimientos y en especial para los frutos recubiertos con la formulación Quitosano-limón al final del almacenamiento (13% de pérdida de peso frente al 21% del control). En estos frutos se detectaron además los niveles más altos de porcentaje en zumo (entorno 44% frente al 36% de los frutos control). En diferentes estudio de aplicación de recubrimientos de quitosano a cítricos, se observaron resultados comparables en cuanto a la pérdida de peso de los frutos recubiertos (Galad et al., 2004, Chien et al., 2007; Contreras et al., 2008).

En cuanto a la vitamina C se mantienen altos niveles hasta las 8 semanas en todos los frutos en general (pérdidas de tan sólo un 10%). A tiempos de almacenamiento comparables (8 semanas), en las condiciones ambiente se detectaron pérdidas mayores de vitamina C (más del 50%). Al final del almacenamiento refrigerado (13 semanas), se detectan niveles significativamente más altos en los frutos recubiertos, sobre todo con las formulación quitosano-limón (28.25 mg. ácido ascórbico/100 mL zumo). Lo descrito anteriormente pone de manifiesto que las bajas temperaturas tienen un mayor efecto en la conservación de esta variable hasta determinados

tiempos de almacenamiento que podrían estar para estos frutos alrededor de las 8 semanas. A partir de este tiempo, puede que el exceso de almacenamiento refrigerado inicie daños por frío y con ello reacciones de deterioro que explicarían el brusco descenso de vitamina C a niveles comparables con las conseguidas en condiciones ambiente, como han descrito otros autores (Miller y Heilman,1952; Palma et al., 2005).

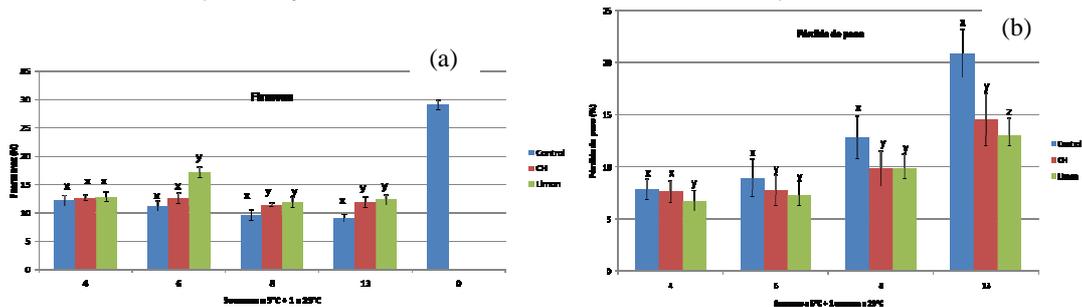


FIGURA 6. Fuerzas máximas para las naranjas en condiciones de frigoconservación (a) y Porcentaje de pérdida de peso para las naranjas en condiciones de frigoconservación (b). ^{X,Y,Z} Superíndices diferentes en la misma fila indican diferencias significativas por efecto del recubrimiento ($p < 0,05$)

Tasa respiratoria

En la figura 7 se observa el consumo de oxígeno y generación de CO₂ de los frutos, recubiertos y no recubiertos, para los diferentes tiempos de almacenamiento refrigerado. Los resultados del tratamiento estadístico mostraron que en general, no hay diferencias significativas en la tasa respiratoria por efecto del recubrimiento. Resultados similares han sido descritos por Vargas et al. (2007) en fresas recubiertas con quitosano durante su almacenamiento a baja temperatura. Las anomalías que se observan en las tasas respiratorias de los frutos inmediatamente después de la aplicación de las formulaciones han sido explicadas con anterioridad por el stress que sufre el fruto y que desaparece a medida que el fruto recubierto se adapta a esta nueva situación. A partir de este momento, se observa una disminución generalizada de la tasa respiratoria de todos los frutos, que es drástica al primer tiempo de control (a las 2 semanas de almacenamiento), con una disminución del consumo de oxígeno y generación de CO₂ mayor del 50% respecto a los frutos control (sin recubrir). Entre las 2 y 8 semanas de almacenamiento el descenso es mucho más lento y progresivo que a temperatura ambiente, hasta llegar a niveles entorno a 5 mL/kg h, tanto en consumo de oxígeno como generación de CO₂. Esta misma tendencia ha sido descrita cuando el fruto es almacenado en condiciones ambiente, aunque en este caso los valores de las tasas respiratorias son ligeramente superiores (tasas respiratorias entorno a 10 mL/kg h, tanto en consumo de O₂ como generación de CO₂). Al igual que en el apartado anterior los valores de la tasa

respiratoria de la materia prima, para el CO₂, son superiores debida a las mismas condiciones mencionadas.

Los valores del cociente respiratorio (figura 8) siguieron la tendencia ya descrita en condiciones ambiente con valores entorno a 1 para todos los tiempos de almacenamiento y frutos, evidenciando el bajo riesgo de reacciones fermentativas.

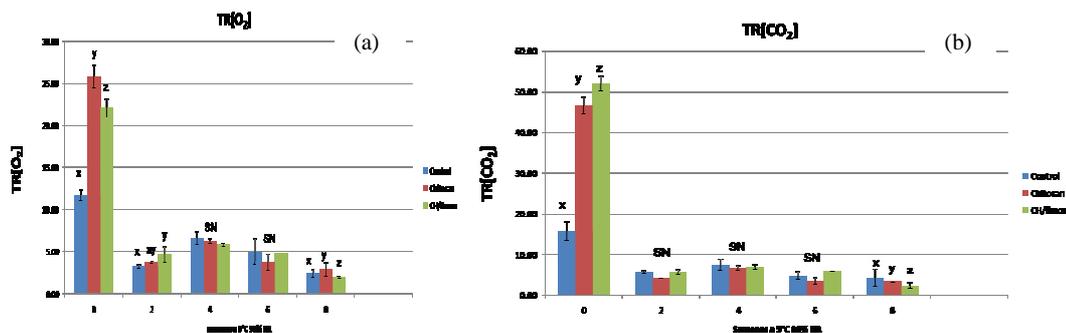


FIGURA 7. Tasa de respiración del O₂ (a) y a la tasa de respiración del CO₂ (b) para las naranjas en condiciones de frigoconservación. ^{X,Y,Z} Superíndices diferentes en la misma fila indican diferencias significativas por efecto del recubrimiento (p<0,05)

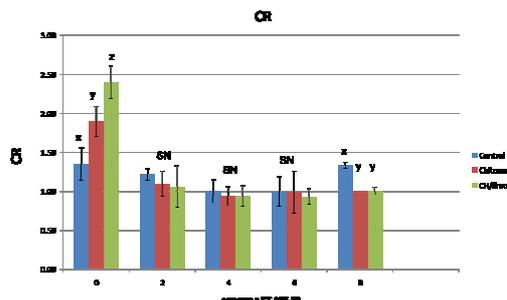


FIGURA 8. Cociente respiratorio de las naranjas en condiciones de frigoconservación. ^{X,Y,Z} Superíndices diferentes en la misma fila indican diferencias significativas por efecto del recubrimiento (p<0,05)

CAPACIDAD ANTIFÚNGICA DE LAS FORMULACIONES.

En general, la mayoría de la naranjas inoculadas desarrollaron la infección tras 1 semana de almacenamiento en las condiciones ambientales, como cabría esperar porque la temperatura y humedad eran beneficiosas para el crecimiento del hongo. Además la fruta utilizada como materia prima tenía un avanzado grado de madurez en árbol lo que puede potenciar el desarrollo de la infección en el fruto.

La figura 9 muestra la evolución del crecimiento del halo alrededor del punto de infección en centímetros para un promedio de las tres heridas. La aplicación de los diferentes recubrimientos no supuso un retraso en la aparición de la infección respecto a las muestras control no tratadas, todas las muestras empezaron a mostrar signos de deterioro fúngico desde el principio

del almacenamiento. Sin embargo es importante resaltar que las muestras recubiertas con quitosano y quitosano-limón presentaron una clara tendencia a un menor crecimiento del halo de infección en el sentido quitosano-limón<quitosano<control (de menor a mayor crecimiento del halo), aunque sin mostrar diferencias significativas a cada tiempo. Este resultado coincide con los obtenidos por Valencia-Chamorro et al. (2008) donde tampoco se observaron diferencias significativas en el crecimiento del hongo.

El nivel de control antifúngico de los recubrimientos de quitosano puede variar notablemente por diversos factores relacionados con el tipo de quitosano, origen de la quitina, grado de desacetilación y peso molecular del mismo, entre otros (Duta et al. 2008). En cuanto a la incorporación del aceite esencial de limón a la matriz de quitosano, no potenció de forma significativa la efectividad antimicrobiana que ha sido descrita para este aceite en estudios in vitro y aplicado a alimentos (Romeo, 2008; Fischer et al., 2008). La matriz de quitosano puede actuar inmovilizando componentes responsables de la actividad antimicrobiana de los aceites, como han descrito otros autores (Kristo et al. 2008).

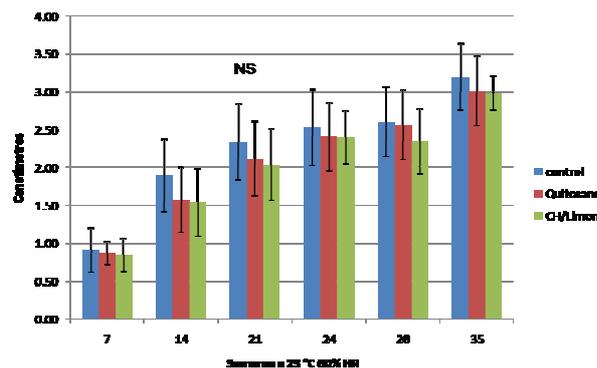


FIGURA 9. Seguimiento del tamaño del halo en centímetros en función del tiempo de almacenamiento para las naranjas infectadas.

CONCLUSIONES:

El fruto en condiciones de almacenamiento ambiente evoluciona como es lógico de una manera rápida y progresiva hacia su deterioro y senescencia. Los resultados reflejan que los recubrimientos a base de quitosano y especialmente la incorporación de aceite esencial de limón a esta matriz mejoran diferentes aspectos de la calidad poscosecha del fruto. El recubrimiento ofrece una barrera a los gases y agua que frena la pérdida de calidad de los frutos tal y como se observa de forma directa en aspectos como las menores pérdidas de peso, mayor % en zumo y firmeza de los frutos recubiertos, especialmente con la formulación CH-limón. Las mejoras descritas en los aspectos de calidad por efecto del recubrimiento está además acompañada de tasas respiratorias y cocientes respiratorios altos de los frutos

recubiertos lo que aleja a los frutos del peligro de putrefacciones al aplicar estas formulaciones.

Las bajas temperaturas de conservación potencian el efecto del recubrimiento, en especial para un periodo de tiempo determinado (entorno a las 8 semanas). El efecto combinado de estos dos factores, acentúa notablemente las mejoras conseguidas por el recubrimiento de los frutos en cuanto a: índice de madurez, pérdidas de peso, firmeza y % en zumo, pero especialmente la menor degradación de la vitamina C, aspecto nutricional característico de los frutos cítricos.

Los recubrimientos a base de quitosano y aceite esencial de limón ofrecen las mejores propiedades para la conservación frigorífica de los frutos. Estos recubrimientos suponen mejoras en diferentes aspectos de calidad como menores pérdidas de peso, % de zumo, firmeza, vitamina C e índice de madurez.

Los recubrimientos de quitosano mostraron poca efectividad en el control de la podredumbre causada por *Penicillium italicum*, que mejoró ligeramente al incorporar el aceite esencial de limón.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a mi tutora María Teresa Cháfer Nácher por darme la oportunidad de hacer este experimento, también a Laura Sánchez Gonzales por estar siempre al pendiente de todo el experimento, a Marlene Rodríguez por hacer todos los zumos de cada experimento, a Carol, Carlos de Jesús, Roxane y todos los que me ayudaron a realizar este experimento.

REFERENCIAS

- Arpaia M. y Kader A. Recomendaciones para Mantener la Calidad Postcosecha, [en línea]. EEUU California. Universidad de Davis. Dirección URL:<<http://www.ucdavis.edu/index.html>>. [Consulta: 18 Sep. 2009].
- Amarante, C., Banks, N.H., 2001. Postharvest physiology and quality of coated fruits and vegetables. Hort. Rev. 26, 161–238.
- Bautista-Baños S, Hernández-Lauzardo AN, Velázquez-del valle MG, Hernández-lópez M, Ait Barka E, Boquez.MolinaE, Wilson Cl. 2006. Crop protección. 25:108-118.
- Benhamou N. 2004. Potencial of the mycoparasite, *Verticillium lecani*, to protect citrus fruit against *Penicillium digitatum*, the casual agent of green mold: A coparison with the effect of chitosan Phytopathology 94:693:705.
- Chien PJ, Sheu F, Lin HR, 2007. Coating citrus(murcott tangor) fruit with low molecular weigth chitosan increases postharvest quality and shelf life. Food chemistry. 100:1160-1164
- Coma V, Martial-Gros A, Garreu S, Copinet A, Salin F, y Deschamps A, 2002. Edible antimicrobial films base don chitosan matrix. J. Food Sci. 67:1162-1169.
- Contreras-oliva A, Bermejo A, Del Rio M.A, Perez Gago M. B, Rojas-Argurdo C, 2008 Efecto del quitosano aplicado como recubrimiento en naranjas cv. Valencia. Avances en maduración y post-recolección de frutas y hortalizas / coord. por Rosa Oria Almudí, Jesús Val Falcón, Ana Ferrer Mairal, 2008, ISBN 9788420011110 , pags. 348-356.
- Cuero R.G. 1999. P 315-333. Antimicrobial action of exogenous chitosan. En: Jollésp; Muzzarelli, R.A.A. (Eds). Chitin and Chitinases. Birkhäuser Verlag.

- Duccio R.L. Caccioni, Monica Guizzardi , Daniela M. Biondi , Agatino Renda ,Giuseppe Ruberto Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*
- Eckert JW y Eacks IL. 1989. Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. P179-260. In: The Citrus Industry. Vol 5. Univ California Press, Berkeley, CA, USA.
- Fisher, K., Rowe, C., & Phillips, C. (2007). The survival of three strains of *Arcobacter butzleri* in the presence of lemon, orange and bergamot essential oils and their components in vitro and on food. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 495-499.
- Galed G. Fernández-Valle ME, Martínez A, Heras A. 2004. Application of MRI to monitor process of ripening and decay in citrus treated with chitosan solution. *Magnetic resonance Imaging*. 22:127-137
- Hagenmaier, R.D., Baker, R.A., 1994. Internal gases, ethanol content and gloss of citrus fruit coated with polyethylene wax, carnauba wax, shellac or rosin at different application levels. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 107, 261–265. Hecht, C.E., 1990. *Statistical Thermodynamics and Kinetic Theory*.
- Kristo E, Konstantinos P. Koutsoumanis, Costas G. Biliaderis. (2008) Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes* *Food Hydrocolloids* 22 373–386
- Li H, Yu T. 2000. Effect of chitosan on incidence of brown rot quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. *J Sci. Food Agric.* 81:269-274.
- Miller EV y Heilman AS. 1952. Ascorbic acid and physiological break down in fruits of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) *science*. 116:505-506.
- M. Viuda-Martos, Y. Ruiz-Navajas, J. Fernández-López *, J. Pérez-Alvarez 2007. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control* 19 (2008) 1130–1138
- Navarro M, Cháfer M, Gonzalez-Martinez C. proyecto de fin de carrera diseño y aplicación de recubrimientos comestibles a base de aceite esencial de árbol de té Universidad politécnica de valencia escuela técnica superior de ingenieros agrónomos 2008.
- Normas para la producción integrada en cítricos (RI §1032106) 27/11/2008. Resolución de 27 de octubre de 2008, del director general de Investigación y Tecnología Agroalimentaria, por la que se establecen las normas para la producción integrada en cítricos, en el ámbito de la Comunitat Valenciana (DOCV de 26 de noviembre de 2008).
- Romeo, FV 2008. Antimicrobial effect of some essential oils *Journal of essential oil research* 20 (4): 373-379
- Palma A, D' Aquino S, agabbio M, Schirru S, 2005. Changes in flavonoids, ascorbic Acid, Polyphenol content and Antioxidant Activity in cold stored <<Fortune>> Mandarin. 5th International Postharvest Symposium. *Acta Hort.* 682, ISHS. Pag. 617-622.
- P.K. Dutta, Shipra Tripathi, G.K. Mehrotra, Joydeep Dutta. (2008) Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry* xxx xxx–xxx
- Salvador A, Cuquerella J, Monterde A. 2003 Efecto del quitosano aplicado como recubrimiento en mandarinas <<Fortune>>. *Rev.Iber. Tecnología poscosecha.* 5(2):122-127
- Srinvasa PC, Baskaran R, Armes Mn, Harish Prashanth KV, Tharanathan Rn. 2002. Storage studies of mango packed using biodegradable chitosan film. *Eur. Food Res. Technol.* 215: 504-508
- Valencia-Chamorro S, Rojas-Argudo C, Perez-Gago M.B, Palou L, 2008 Efecto del recubrimiento con quitosano en el control de las podredumbres verde y azul de los cítricos. *Avances en maduración y post-recolección de frutas y hortalizas / coord. por Rosa Oriá Almudí, Jesús Val Falcón, Ana Ferrer Mairal, 2008, ISBN 9788420011110 , pags. 488-495*
- Vargas M, Albors A, Chiralt A, Gonzalez-Martinez C. 2006. Quality of cold stored strawberries as affected by chitosan-oleic acid edible coatings. *Postharvest Biology and technology.* 41:164-171.