

## CAPÍTULO 2

# DESARROLLO DE RECUBRIMIENTOS CON SAPONINA DE QUINUA (*CHENOPODIUM QUINOA WILLD.*) PARA EL CONTROL DE LA PODREDUMBRE VERDE EN NARANJA (*CITRUS SINENSIS*)

Data de aceite: 01/04/2024

**Aranibar G. M.**

Escuela profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú.

**RESUMEN:** La quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) es un grano andino que en los últimos 15 años tomo una gran importancia comercial. Uno de los inconvenientes es la presencia de un factor antinutricional conocida como saponina. El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto inhibitorio de recubrimientos elaborados a partir de saponina quinoa aplicado sobre *Penicillium digitatum* de cepa aislada y cepa codificada. Se realizaron pruebas in vivo de los recubrimientos a cuatro concentraciones 15000, 11300, 7500 y 3700 ppm; se evaluaron los parámetros de calidad: índice de daño, firmeza y presencia de hongos. La pérdida de firmeza fue de 6.6 % en las muestras con recubrimiento a una concentración de 15000 ppm y las muestras control presentaron 5.96 % de pérdida de firmeza y el índice de daño proveniente de la cepa aislada fue 11.49 y de la cepa codificada fue de 10.02. Por otro lado,

la presencia de hongos en las muestras con recubrimiento a una concentración de 15000 ppm fue a los 13 días, mientras que la muestra patrón tuvo presencia de hongos a los siete días, mostrando así una diferencia de cinco días de retraso. Se concluye que los recubrimientos desarrollados en esta investigación son una buena alternativa para el control de podredumbre verde ya que retrasa su aparición.

**PALABRAS-CLAVE:** Recubrimiento, quinoa, saponina, inhibición, *Penicillium digitatum*.

### DEVELOPMENT OF COATINGS WITH QUINOA SAPONIN (*CHENOPODIUM QUINOA* WILLD.) FOR THE CONTROL OF GREEN ROT IN ORANGE (*CITRUS SINENSIS*)

**ABSTRACT:** Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) is an Andean grain that in the last 15 years took a great commercial importance. One of the drawbacks is the presence of an antinutrition factor known as saponin. The objective of this research was to evaluate the inhibitory effect of coatings made from saponin quinoa applied on *Penicillium digitatum* isolated strain and codified strain. In vivo tests of the coatings were performed

on four presented, 15,000, 11300, 7500 and 3700 ppm; The quality parameters were evaluated: damage index, firmness and presence of fungi. The loss of firmness was 6.6% in the samples with an approach of a concentration of 15000 ppm and the control samples showed 5.96% loss of firmness and the damage index from the isolated strain was 11.49 and the strain encoded was 10.02. On the other hand, the presence of fungi in the samples with a concentration of 15,000 ppm at 13 days, while the pattern sample occurred in seven days, thus showing a difference of five days of delay. It is concluded that the coatings in this research are a good alternative for the control of green rot and that it delays its appearance.

**KEYWORDS:** coating, quinoa, saponin, inhibition,

## INTRODUCCIÓN

La principal aplicación de la quinua es como alimento, principalmente por el alto valor proteico de sus granos (Kozioł, 1992). Uno de los inconvenientes es la presencia de un factor antinutricional que es la saponina (Monje & Raffaillac, 2009), una sustancia de sabor amargo localizada principalmente en el epispermo del grano, que deben ser eliminadas antes del consumo humano (Lescano, 1994). Para su eliminación, las empresas procesadoras de quinua, han desarrollado un proceso de beneficiado donde se separa el epispermo del grano mediante dos procesos: el primero es basado en la fricción entre granos por acción mecánica (escarificado) obteniéndose un polvo rico en saponinas denominado “mojuelo”.

El segundo es un proceso de lavado con agua para eliminar el epispermo restante. El rendimiento del “mojuelo” es de alrededor de 4.5% respecto al grano, por lo que cada año se generan toneladas de estos residuos (León, 2003; Mujica, 2006).

La atención de muchas investigaciones se ha centrado en la diosgenina sin embargo sus precursores, las saponinas, por si mismos son compuestos que pueden tener un gran interés biotecnológico, ya que están involucrados en la defensa de las plantas contra microorganismos, especialmente hongos (Osborn, 1996).

Los cultivos de frutas son atacados por muchas enfermedades y plagas, siendo uno de los agentes principales los hongos fitopatógenos una de las principales causas de las pérdidas postcosecha en cítricos (Mathews, 2008).

En la postcosecha de cítricos las principales enfermedades son causadas por los hongos patógenos *Penicillium digitatum* (podredumbre verde) y *Penicillium italicum* (podredumbre azul) (Brito *et al.*, 2012), los cuales presentan mayor incidencia, llegando a producir cerca de 80% de las pérdidas postcosecha en cítricos. La infección del fruto tiene lugar a través de heridas o micro heridas producidas en la corteza antes, durante o después de la cosecha, lo que da como resultado infecciones irreversibles en un espacio de tiempo de 48h a 20 - 25°C (Ochoa *et al.*, 2007); el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto inhibitorio de recubrimientos elaborados a partir de saponina quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) aplicado sobre *Penicillium digitatum* de cepa aislada y cepa codificada.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento e identificación de las cepas de *Penicillium digitatum*

#### a. Preparación de la cepa de *Penicillium digitatum* codificada

Cepa codificada ATCC 36038: *Penicillium digitatum* fue obtenido del banco de cepas del Instituto Oswaldo Fiocruz – Brasil. La cepa activa fue reactivada en agar Mueller Hilton y conservada en refrigeración, para la parte experimental se reactivó en agar Potato Dextrosa (PDA). La concentración de esporas fue ajustada a  $1 \times 10^5$  usando la escala de Mc Farland y se incubaron a 25 °C durante siete días.

#### b. Aislamiento de la cepa natural de *Penicillium digitatum*

Para obtener las cepas de *Penicillium digitatum*, se empleó la metodología de aislamiento de microorganismos a partir del tejido infectado planteada por Mondino, (2012), donde se obtuvo esporas de la superficie de naranjas con presencia de hongos, y se sembró en placas de PDA a 25 °C durante siete días. Posteriormente se realizó la identificación y purificación del microorganismo *Penicillium digitatum* según la metodología propuesta por el ICMSF, 2006.

### Evaluación de la actividad antifúngica en pruebas in vitro de la saponina

La evaluación de la actividad antifúngica se realizó a través de la metodología de difusión en agar propuesta por Viuda *et al.*, (2008) en el cual se inocula discos con saponina a diferentes concentraciones (15000, 11300, 7500 y 3700 ppm) en el medio de cultivo PDA. Se dio seguimiento por 10 días.

### Elaboración del recubrimiento

Se siguió la metodología de Tongdeesoontorn *et al.*, (2011) donde se formuló un recubrimiento base, al cual se le añadió a diferentes concentraciones de saponina de quinua (15000, 11300, 7500 y 3700 ppm).

Para la aplicación del recubrimiento, las naranjas fueron sumergidas durante tres minutos en cada formulación, secadas a T° ambiente durante 20 min, se realizaron tres incisiones en la zona ecuatorial de las naranjas, y se sembraron 10 µL de la suspensión en cada incisión lo cual equivale a 105 esporas /mL según la escala Mc Farland, se almacenaron a 25 °C por 2 semanas. Posteriormente se evaluó el índice de daño, presencia de hongos y la firmeza.

### Evaluación del índice de daño

Se evaluó el índice de daño utilizando una escala hedónica para cada daño teniendo

en cuenta el rango de 0 a 4 para la valoración (donde 0 = índice de daño nulo y 4 = índice de daño severo) (López, 2012). Se utilizaron las siguientes ecuaciones:

El síntoma de daño (SD) se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de SD} = \frac{\text{Nivel de daño} \times \text{Número de frutas en el nivel dañado}}{\text{\#Total de frutas evaluadas}} \quad (1)$$

Se calculó el índice de daño (ID) mediante la siguiente ecuación:

$$ID = \frac{\sum \text{Índice de cada síntoma de daño}}{2} \quad (2)$$

Los daños considerados son dos: firmeza y presencia de hongos.

La evaluación de la presencia de hongos (*Penicillium digitatum*) en naranjas, se hizo en función a una escala hedónica. (Figura 1)

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evaluación del efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de saponina para inhibir el crecimiento de *Penicillium digitatum*

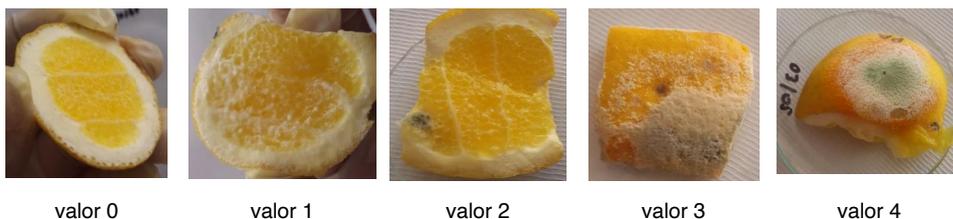


Figura 1: Escala hedónica para la evaluación de la presencia de hongos.

La metodología de disco difusión demostró que el hongo *Penicillium digitatum* tanto de cepa codificada como cepa aislada es resistente a la saponina. En la presente investigación se observa que el polvillo de quinua no generó halo de inhibición, a diferencia del antifúngico Tiabendazol que se empleó como control positivo de inhibición; el cual generó halos de inhibición de 16.7 mm como promedio con una concentración de 15000ppm. Por otro lado, los discos con diosgenina, tampoco generaron halo de inhibición siendo este componente mayoritario (5 %) de la molécula de saponina, lo cual indica que ambas sustancias (polvillo de quinua y diosgenina) no son agentes controladores de *Penicillium digitatum*. Corzo, (2012) afirma que, debido a la presencia de algunos metabolitos secundarios como los alcaloides,

esteroides, y triterpenos pueden ser los responsables del efecto no inhibitorio. Por otro lado, estudios realizados por Bader *et al.*, (2000) demostró que la actividad antifúngica de las saponinas frente a diferentes cepas de *Candida albicans* puede ser influenciada por la variación de las unidades de carbohidratos enlazados en la aglicona. Demostrando que los compuestos de saponina presentan poca o ninguna actividad antifúngica.

Stuardo & San Martin, (2008) en su investigación “Propiedades antifúngicas de la saponina de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) tratados con álcalis contra *Botrytis cinérea*” concluye que los extractos de quinua sin tratar con álcali mostraron actividad mínima contra el crecimiento del micelio de *B. cinérea*. Además, no se observaron efectos contra la germinación de conidias, incluso a 7 mg saponinas/ml. Sin embargo, cuando los extractos de saponina fueron tratados con álcali, el crecimiento del micelio y la germinación de los conidios fueron inhibidas de manera significativa. A dosis de 5 mg/ml, se observó 100 % de inhibición de la germinación de conidias, incluso después de 96 h de incubación. La mayor actividad antifúngica de saponinas alcalinas tratada es probablemente debido a la formación de derivados de saponina más hidrófobos que pueden tener una mayor afinidad con los esteroides presentes en las membranas celulares. Por lo cual confrontando esta investigación con la de Stuardo & San Martin, (2008) se dedujo que la saponina con sus propios compuestos no tiene efecto inhibitorio sobre algunas familias de hongos como es el caso del *Penicillium digitatum*.

Los resultados mostrados en este trabajo, efecto inhibitorio de la saponina de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) en la flora fúngica natural e inducida de *Penicillium digitatum* en naranjas (*Citrus sinensis*), no coinciden con los resultados reportados previamente en la literatura. Tenorio *et al.*, (2010) donde mencionan que se evaluaron concentraciones de saponina aislada de *Chenopodium quinoa* Willd para disminuir la velocidad de crecimiento de hongos fitopatógenos por el método de dilución en placa. Se demostró que la saponina puede inhibir el crecimiento hasta un 42 % de *Aspergillus flavus*, 35 % de *Ulocladium* spp, y 47 % de *Fusarium* a los cuatro días iniciales del experimento. Tenorio *et al.*, (2010) concluye que las saponinas pueden considerarse como agentes controladores de hongos fitopatógenos.

Por otro lado, Gómez *et al.*, (2009) estudió la actividad antifúngica de saponinas esteroidales de *Discorea* contra hongos fitopatógenos. La actividad antifúngica se evaluó por microdilución en medio líquido, con cuatro cepas de hongos, tres fitopatógenos y un saprofito: *Mucor* sp., *Fusarium* sp., *Fusarium moniliforme* y *Trichoderma* sp. respectivamente. Se tuvo una actividad antifúngica de 50 a 200 µg/ml de las dos clases de saponina, siendo la cepa del hongo *F. moniliforme* la más sensible que los otros hongos. Según el mismo autor la diferencia en la resistencia puede estar relacionada a la presencia de saponinas específicas que le permiten al hongo hidrolizar las saponinas e infectar a una especie vegetal determinada.

Cabe resaltar que mencionados autores no trabajaron con el hongo *Penicillium*

*digitatum*, el cual también es considerado como fitopatígeno. Tal como menciona Ochoa *et al.*, (2007) en su investigación en la cual se aisló e identificó hongos fitopatógenos de naranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) que afectaron la calidad de los frutos durante su almacenamiento, teniendo a los hongos *A. flavus*, *F. oxysporum*, *P. digitatum*, *P. italicum* y *P. variable* como los principales agentes causales de pudriciones y enfermedades en frutos.

Los resultados obtenidos en este trabajo están de acuerdo con los hallazgos de Woldemichael y Wink (2001), en el que la fracción de saponina total de *Chenopodium quinoa* Willd mostró poca actividad antifúngica contra *Cándida albicans*. Sin embargo, cuando las saponinas de quinoa fueron tratadas con álcali, su actividad antifúngica contra *B. cinérea* aumentó significativamente. Esto es probablemente debido a la formación de saponinas más hidrófobas que tienen una mayor afinidad con los esteroides presentes en las membranas celulares de los hongos.

## **Evaluación de la aplicación de los recubrimientos con saponinas**

En general, la mayoría de las naranjas inoculadas desarrollaron infección tras la primera semana de almacenamiento bajo condiciones óptimas (acondicionamiento en la estufa), se determinaron los valores deseados de las variables de respuesta: índice de daño, firmeza al tacto y presencia de hongos; cabe resaltar que esta investigación requiere de quince unidades experimentales (replicas). Los resultados se presentan a continuación:

### **a. Índice de daños (ID)**

En la Figura 2, se observa la variación del ID de las naranjas control y naranjas tratadas con el recubrimiento durante el tiempo de almacenamiento en donde se trabaja con respecto al *Penicillium digitatum* de cepa aislada. Los síntomas de daño en las naranjas, tanto las del control como las evaluadas se observan a partir del tercer día, en el cual las naranjas presentan síntomas de pérdida de firmeza y presencia de hongos.

En el tercer día, el ID en la muestra control fue de 4.34; mientras que las naranjas recubiertas con el tratamiento al 15000 ppm de saponina presentó un índice de daño de 2.20. Al noveno día, la muestra control presentó un ID de 13.34, lo cual indica la pérdida de calidad comercial y afectó la vida útil de la naranja.

Por otro lado, las naranjas tratadas con recubrimientos de saponina presentaron una tendencia similar a las naranjas control con respecto al deterioro, con la diferencia que los daños aparecieron en menor proporción, dando más énfasis a las naranjas con tratamiento a 15000 ppm que obtuvo un índice de daño de 11.49 en el noveno día.

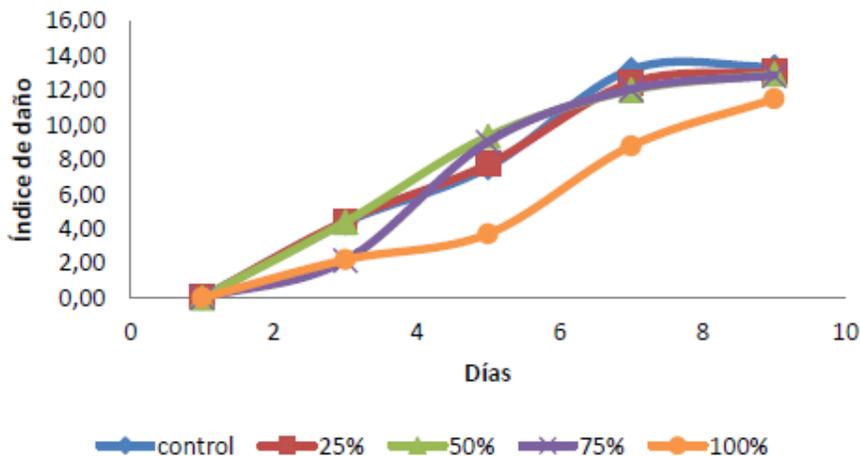


Figura 2: Índice de daño en naranjas control y tratadas con recubrimientos de saponina almacenadas a 25 °C frente a *Penicillium digitatum* de cepa aislada.

No obstante, todas estas muestras presentan características no comerciales al noveno día de almacenamiento. Los resultados obtenidos en el análisis cuantitativo con un nivel de significancia del 5 % afecta significativamente el factor concentración, siendo más predominante entre el tratamiento a 15000 ppm de saponina frente a la muestra control.

En la Figura. 3 se observa el índice de daño de naranjas control y tratadas frente al *Penicillium digitatum* de cepa codificada. El naranja control que fue inoculada con *Penicillium digitatum* de cepa codificada presentan un ID de 15.48 en el noveno día de almacenamiento, mientras que la naranja con tratamiento al 15000 ppm obtuvo un ID de 10.02. Los resultados correspondientes al análisis cuantitativo indican que existe grado de significancia al 5% entre los tratamientos a 3700 ppm y 15000 ppm de concentración de saponina. Se evidencia que las naranjas control presentaron un temprano y mayor desarrollo de la pérdida de la calidad comercial frente a las naranjas tratadas con recubrimiento de saponina.

#### b. Firmeza

Para determinar la firmeza se utilizó un analizador de textura: penetrómetro con una sonda esférica de media pulgada de diámetro, una deformación de 5 mJ y una carga de 10 g a una velocidad de prueba de 10 mm/s.

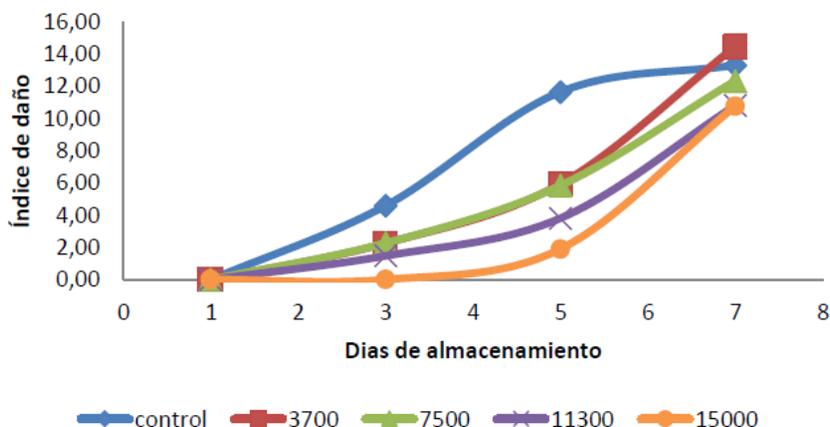


Figura 3: Índice de daño en naranjas control y tratadas con recubrimientos de saponina almacenadas a 25 °C frente a *Penicillium digitatum* de cepa codificada.

Los resultados de la Figura 4 y 5, corresponden al análisis cuantitativo con un nivel de significancia del 5 %, donde la aplicación de los recubrimientos de saponina no mantuvo la firmeza de las naranjas en ninguna de sus concentraciones. Las naranjas control y con tratamiento, mostraron una reducción de firmeza durante el almacenamiento. Para las naranjas control en el día cero el valor registrado como promedio fue de 45.31 mJ/g y de 25.98 mJ/g en el día nueve alcanzando un porcentaje de pérdida de firmeza de 5.96 % al final del almacenamiento. Las naranjas tratadas con saponina registraron valores similares a las de la muestra control con valores de textura desde 45.39 mJ/g hasta 45.93 mJ/g en promedio el día cero y de 25.88 mJ/g hasta 26.40 mJ/g en el noveno día.

La diferencia de ambas Figuras 4 y 5 muestran los valores obtenidos de los recubrimientos aplicados tanto en las cepas aislada (Figura 4) como en la cepa codificada (Figura 5) donde ambas permanecen relativamente cercanas durante el periodo de almacenamiento, lo cual indica un porcentaje de 6,6 % de pérdida de firmeza.

Resultados similares se observaron en mandarinas y naranjas a las cuales se le aplicó recubrimientos a base quitosano y goma laca, los cuales redujeron la pérdida de firmeza en un 5 % después de dos semanas de almacenamiento (Monterde *et al*, 2003; Cuquerella & Jávega, 2002).

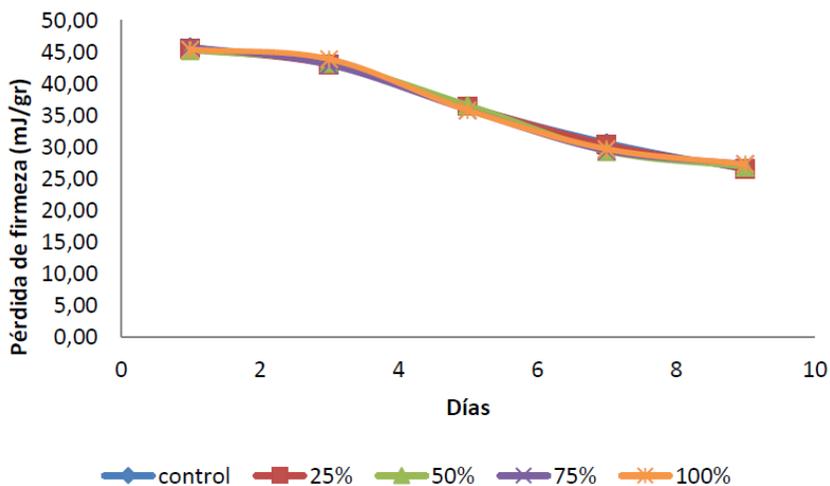


Figura 4: Firmeza en naranjas control y tratadas con recubrimientos de saponina almacenadas a 25 °C frente a *Penicillium digitatum* de cepa aislada.

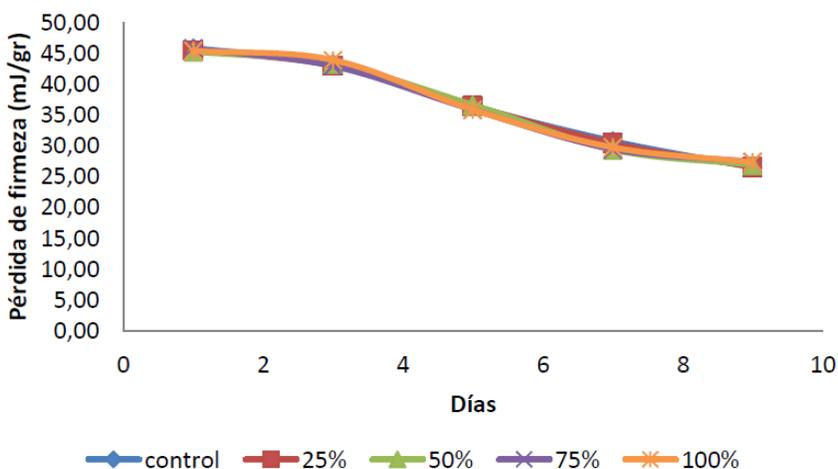


Figura 5: Firmeza en naranjas control y tratadas con recubrimientos de saponina almacenadas a 25 °C frente a *Penicillium digitatum* de cepa codificada.

### c. Presencia de hongos

En general, la mayoría de las naranjas inoculadas con el hongo desarrollaron la infección tras la primera semana de almacenamiento en las condiciones ambientales, debido a que la temperatura y humedad fueron beneficiosas para el crecimiento del hongo, además las naranjas empleadas como materia prima tenían un grado de madurez comercial lo que potencia el desarrollo de la infección del fruto.

Finalmente se determinó que los recubrimientos empleados para reducir el desarrollo de *Penicillium digitatum* de cepa aislada y codificada en naranjas, no presentan diferencia significativa (Nivel de confianza de 95%) entre ninguno de los tratamientos y la muestra control.

En la Figura 6, se observa el incremento del crecimiento de las cepas de *Penicillium digitatum* de cepa aislada con respecto del tiempo.

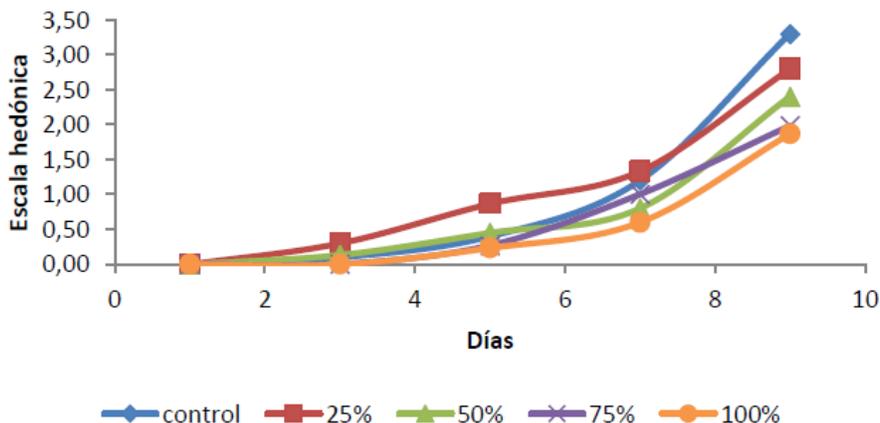


Figura 6: Desarrollo de *Penicillium digitatum* de cepa aislada en naranjas control y tratadas con recubrimientos de saponina almacenadas a 25 °C.

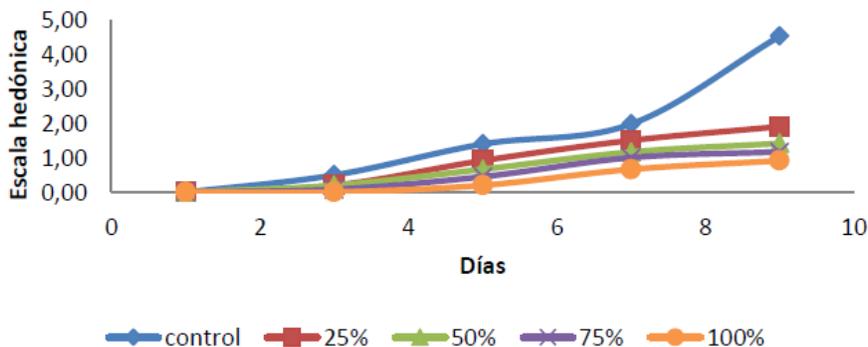


Figura 7: Desarrollo de *Penicillium digitatum* de cepa codificada en naranjas control y tratadas con recubrimientos de saponina almacenadas a 25 °C.

Así mismo se observa en la Figura 7 el incremento de la podredumbre de *Penicillium digitatum* de cepa codificada con respecto del tiempo. Según el análisis efectuado en naranjas tratadas a diferentes concentraciones de saponina, se encontró que la aplicación de los diferentes recubrimientos no genero un retraso en la aparición de la infección

respecto a las muestras control, todas empezaron a mostrar signos de deterioro fúngico a los cuatro días de almacenamiento. Ninguna de estas reduce significativamente el desarrollo de *Penicillium digitatum* tanto de cepa aislada como codificada, como se observa en las Figuras 6 y 7 con respecto a las naranjas control. Este resultado concuerda con los obtenidos por Valencia *et al.* (2008) donde tampoco se observaron diferencias significativas en el crecimiento del hongo.

Brito *et al.*, 2012 afirma que la aplicación de recubrimientos a base de quitosano y aceite esencial de limón en el control de *Penicillium italicum* de naranjas el cual muestra poca efectividad en el control de la podredumbre causada por este microorganismo.

## CONCLUSIONES

Los recubrimientos elaborados a base de saponina no mostraron capacidad inhibitoria. Las muestras control de naranja y las muestras con recubrimientos mostraron valores de deterioro significativamente similares en condiciones ambientales de almacenamiento. Al noveno día de almacenamiento, la pérdida de firmeza fue de 6.6 % en las muestras con recubrimiento y las muestras control presentaron 5.96 % de pérdida de firmeza. Finalmente, con estos resultados podemos deducir que, no hay diferencia en el grado de infección proveniente de una cepa aislada o codificada del hongo en estudio ya que el índice de daño fue de 11.49 y 10.02 respectivamente, por lo tanto, se concluye que la saponina de quinua no es un inhibidor del hongo *Penicillium digitatum* de cepa aislada como de cepa codificada.

La saponina de quinua retarda el crecimiento o la aparición micelial del hongo *Penicillium digitatum* influyendo en la fase de retraso de la curva de crecimiento de hongos, mostrando un retraso de cinco días con respecto a la aparición de hongos jóvenes y una reducción de carga microbiana.

## REFERENCIAS

Bader, G., Seibold, M., Tintelnot, K., & Hiller, K. (2000). Cytotoxicity of triterpenoid saponins – part 2: relationships between the structures of glycosides of polygalacic acid and their activities against pathogenic *Candida* species. *Die Pharmazie*. 55, 72 – 74.

Brito, A., Sanchez, L., Gonzalez, Ch., Vargas, M., & Chafer, M. (2012). Aplicación de recubrimientos a base de quitosano y aceite esencial de limón en el control de la poscosecha de la podredumbre azul de naranjas. Tesis de grado para optar el grado de master en ciencia e ingeniería de los alimentos. Universidad Politécnica de Valencia.

CLSI, (2008). Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard. M38 – A2. 28(16), 1 - 2, 34 – 35.

Corzo, D.C. (2012). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 43(3), 81 - 86.

- Cuquerella, J. & Jávega, J. (2002). Efectos fisiológicos de diferentes recubrimientos sobre frutas cítricas durante su almacenamiento. *Citriculture*. 2, 735-737.
- Gómez, J.A., Alba, J., Cerda, C.M., & Ramos, A.C. (2009). Actividad antifúngica de saponinas esteroidales de *Dioscorea* contra hongos fitopatógenos. Centro de investigación y estudios avanzados. Universidad Nacional Autónoma de México.
- ICMSF. (2006). *Microorganisms in foods – microbial Ecology of Food Commodities*. Blackie Academic & Professional. Editorial Acribia. Zaragoza – España.
- Kozioł, M.J. (1992). Chemical Composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Food composition and analysis*, 5, 35-68.
- León, J. (2003). Hibridación y comparación de la F1 con sus progenitores en tres cultivares de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) en Puno, Perú. Tesis de grado para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad nacional del Altiplano. Perú.
- Lescano, J. M. (1994). Genética y mejoramiento de cultivo alto andinos quinua, kañihua, tarwi, kiwicha, papa amarga, olluco, mashua y oca. INADE - PELT –COTESU. Puno – Perú.
- López, J. (2012). Aplicación de recubrimientos comestibles en carambola (*Averrhoa carambola* L.). Tesis de Grado para optar el Título profesional de Ingeniero de Alimentos. Universidad Tecnológica Equinoccial. Ecuador.
- Mathews, K.R. (2008). *Microbiología de las frutas y verduras frescas*. Editorial Acribia. España.
- Mondino, P. (2012). Métodos de aislamiento: Aislamiento de hongos y bacterias. *Fitopatología*. 8, 15 – 22.
- Monje, C. Y., & Raffaillac J. P. (2009). Determinación de saponina total en quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) método Espectrofotométrico. Memoria IV Congreso Nacional de la Asociación Boliviana de Protección Vegetal. - Dpto. Fitotecnia-FCAPV UTO. ABPV. 217-218.
- Monterde, A., Salvador, A., Ben-Abda, J., & Jávega, J. (2003). Efecto de la aplicación de recubrimientos de origen natural en la calidad de mandarinas y naranjas en maduración y post-recolección de frutos y hortalizas. *Levante Agrícola*. 365, 203-208.
- Mujica, A. (2006). Agroindustria de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) en los países andino. Proyecto quinua cultivo multipropósito para los países andinos.
- Mujica, A., Jacobsen, S.E., Izquierdo, J., & Marathee, J.P. (2001). Quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) Ancestral cultivo andino, alimento del presente y futuro. Cultivos Andinos – FAO.
- Ochoa, J.L., Hernández, L.G, Latisnere, H., León, J.L., & Larralde, C.P. (2007). Aislamiento e identificación de hongos patógenos de naranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) cultivada en baja California sur, México. *Revista de Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(5), 352-359
- Osborn, A. (1996). Saponins and plant defense: a soap story. *Trends in Plant Science*. 1(1), 4-9.
- Stuardo, M., & San Martin, R. (2008). Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) alkali treated saponins against *Botrytis cinerea*. *Industrial Crops and Products*, 27, 296-302.

Tenorio, R., Terrazas, E., Álvarez, M.T., Vila, J.L., & Mollinedo, P. (2010). Concentrados de saponina de *Chenopodium quinoa* y de *Caiphora andina*: alternativas como biocontroladores de hongos fitopatógenos. *Revista Boliviana de Química*, 27, 33-40.

Tongdeesoontorn, W., Mauer, L.J., Wongruong, S., Sriburi, P., & Rachtanapun, P. (2011). Effect of carboxymethyl cellulose concentration on physical properties of biodegradable cassava starch-based films. *Chemistry Central*. 5(1), 6.

Valencia, C.S., Pérez, M.B., & Palou, L. (2008). Efecto del recubrimiento con quitosano en el control de las podredumbres verde y azul de los cítricos. IX Simposio Nacional y VI Ibérico sobre Maduración y Postcosecha 2008.

Viuda, M., Ruiz, Y., Fernandez, J., & Perez, J. (2008). 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, 1130–1138.