



# DESAFÍOS EN MADURACIÓN Y POSTCOSECHA DE FRUTOS Y HORTALIZAS

Carmen Merodio-María Isabel Escribano-María Teresa Sánchez-Ballesta-Irene Romero  
(Editoras)

# Control biológico como estrategia para el control de la podredumbre marrón en precosecha y postcosecha de cereza

E. Arias<sup>1</sup>, D. Gimeno<sup>1</sup>, M.E. Venturini<sup>2</sup>, R. Oria<sup>1</sup>, A.P. Gracia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Alimentos de Origen Vegetal (GIAOVE). Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2), Universidad de Zaragoza – CITA, Zaragoza, ES. [apgracia@unizar.es](mailto:apgracia@unizar.es)

<sup>2</sup>Grupo de Investigación Protección Vegetal Sostenible (PROVESOS). Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2), Universidad de Zaragoza – CITA, Zaragoza, ES.

## Resumen

La cereza dulce (*Prunus avium*) es un fruto percedero muy susceptible al ataque de hongos fitopatógenos durante su almacenamiento. Los principales agentes responsables de estos daños son *Monilinia* spp y *Botrytis cinerea* (Feliziani *et al.*, 2013). Tradicionalmente, los tratamientos con fungicidas de la familia de los triazoles, entre los que se encuentra el tebuconazol, son los más utilizados en fruta de hueso para combatir las enfermedades fúngicas, pero pese a sus ventajas, su uso es cada vez más restringido, estando incluido en la lista comunitaria de sustancias activas candidatas a su sustitución del Reglamento (CE) 1107/2009, siendo necesaria la búsqueda de métodos alternativos para combatir dichas enfermedades. Por esta razón, el objetivo de este estudio es evaluar el efecto de la aplicación precosecha y postcosecha de *Bacillus velezensis* BUZ-14 como sustituto del tebuconazol frente al desarrollo de *Monilinia* spp. en cereza cv. Brooks.

Se evaluó la capacidad de control de la podredumbre por parte *B. velezensis* BUZ-14, comparando su efecto con el ejercido por el tebuconazol (tratamiento control). Se evaluaron los atributos relacionados con la calidad de fruto (firmeza, SST, acidez total y grado de deshidratación del pedúnculo) y contenido de compuestos fenólicos totales y actividad de la enzima peroxidasa como parámetros del estado del sistema inmunológico del cultivo. *B. velezensis* BUZ-14 fue capaz de controlar y reducir la incidencia de podredumbres no solo en el momento de la cosecha, si no también tras un periodo de 10 días de frigoconservación respecto al uso de tebuconazol, observándose también como la firmeza de las cerezas era significativamente superior en ambos puntos de análisis. Por último, se observó como la aplicación del agente de biocontrol ejerció un efecto positivo en el sistema inmunológico del cultivo aumentando la concentración de compuestos fenólicos totales como de la actividad de la enzima peroxidasa en los frutos.

**Palabras clave:** biocontrol, podredumbre parda, *Prunus avium*, calidad

## INTRODUCCIÓN

*Monilinia* spp. es el agente causal de la podredumbre parda en frutales de hueso y por tanto capaz de generar elevadas pérdidas económicas. Hasta la fecha, la forma más habitual de combatir las enfermedades en los cultivos ha sido mediante el uso indiscriminado de pesticidas de síntesis química que representan una amenaza tanto para la salud humana como para el medioambiente. Pese a ser sustancias con elevado poder antimicrobiano, su uso está siendo cada vez más restringido por la normativa comunitaria, surgiendo la necesidad de encontrar alternativas eficaces para el control de las enfermedades. Una de estas alternativas es el biocontrol, que utiliza agentes antagonistas o metabolitos producidos por estos para inhibir la proliferación de organismos indeseables. El género *Bacillus* destaca por su alta capacidad de

formar esporas, promover el crecimiento de las plantas y ejercer efectos antifúngicos gracias a la síntesis y liberación de diversos metabolitos secundarios. Por esta razón, el objetivo de este estudio es evaluar el efecto de la aplicación precosecha y postcosecha de *Bacillus velezensis* BUZ-14 como sustituto del tebuconazol frente al desarrollo de *Monilinia* spp. en cereza cv. Brooks.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

El presente ensayo se realizó en una parcela de cerezos de la variedad Brooks, de 4,1 Ha de superficie, ubicada en la localidad de Albalate de Cinca (Huesca), 41°43'55.1"N 0°08'19.4"E. La densidad del cultivo es de árboles Ha<sup>-1</sup>, con un marco de plantación de 4x2 y sistema de formación de eje ramificado. El régimen de riego a manta es de 11 d desde finales de marzo hasta la recolección y de 22 d tras la recolección.

### Insumos aplicados en precosecha y método de aplicación

*Bacillus velezensis* BUZ-14: Producto líquido formulado a base de la cepa BUZ-14. El producto se aplicó sin diluir, conteniendo 10<sup>8</sup> ufc mL<sup>-1</sup> a una dosis de 1000 L Ha<sup>-1</sup>.

Fungicida: fungicida de síntesis química a base de tebuconazol 20% y fluopiram 20%. Se aplicó a una dosis de 0,38 L Ha<sup>-1</sup> diluido en 1000 L de agua.

El agente de biocontrol BUZ-14 se aplicó con pulverizador aplicador de fitosanitarios con batería (Matabi evolution 15 ltc) en 5 ocasiones y el tratamiento convencional con fungicida de síntesis se aplicó con la ayuda de una cuba de atomización siguiendo las directrices establecidas por el fabricante del fungicida en tres momentos claves para la posible proliferación de la enfermedad en el cultivo.

### Parámetros físico-químicos de calidad postcosecha

#### *Textura*

la medida instrumental de textura se realizó mediante un procedimiento no destructivo con un durometro (Durofel, Agrotecnologie, Francia) con una sonda de 6 mm de diámetro, realizando dos medidas en cada fruto. Los resultados obtenidos se expresaron en unidades durofel. Se utilizaron 50 frutos de cada tratamiento.

#### *Sólidos solubles totales (SST)*

Para la determinación del contenido en sólidos solubles totales (SST) se siguió la técnica descrita en los Métodos Oficiales de Análisis de Zumos de Frutas (AOAC, 1984). La medida se realizó utilizando 2 gotas de 3 zumos obtenidos a partir de 8 frutos de cada tratamiento en el caso de melocotón y nectarina, y de 15 frutos en el caso de la cereza, analizándose en un refractómetro digital (Atago, Tokio, Japón) con corrector automático de temperatura, por lo que los resultados se expresaron en °Brix a 20 °C.

#### *Acidez total*

El contenido total en ácidos naturales se determinó por valoración con una solución de hidróxido sódico por el método potenciométrico (AOAC, 1990). El análisis se realizó por triplicado para cada uno de los frutos por el siguiente procedimiento: 10 mL de zumo obtenido para la determinación de los sólidos solubles se diluyó con 90 mL de agua destilada, y se valoraron con hidróxido sódico 0,1 N hasta alcanzar pH=8,1. Se utilizó para la valoración el titulador automático (Crison, Barcelona, España) y la acidez total se expresó en g de ácido málico/kg p.f., por ser éste el ácido mayoritario de los frutos estudiados.

### *Índice de deshidratación*

Tras la identificación del grado de pardeamiento de los pedúnculos de las cerezas utilizando una escala de clasificación compuesta por 4 grados (Figura 1), se determinó el índice de deshidratación de cada uno de los lotes de tratamiento postcosecha. Para ello se utilizó la siguiente fórmula (Yang *et al.*, 2010):

$$= [(G)*(n)]/(N),$$

donde G corresponde al grado de deshidratación del pedúnculo (G1, G2, G3 y G4), n es el número de frutos en cada grado de deshidratación y N el número total de frutos.

### **Análisis del sistema inmunológico de los frutos**

#### *Determinación de la actividad peroxidasa (POX)*

El extracto enzimático se obtuvo mediante la homogeneización en ultraturrax (IKA-W; Staufen, Alemania) de 15 g de material vegetal con 25 mL de tampón fosfato de sodio (0,2 M) y 10 g/L de polivinilpirrolidona (PVP) (K30, Fluka Chemika Sigma-Aldrich). Posteriormente el homogenizado se centrifugó a 4 °C durante 30 min a 4000 rpm (centrífuga Jouan CR 4.11). El sobrenadante se filtró (Whatman No. 4), obteniéndose así el extracto enzimático. Se prepararon 3 extractos enzimáticos por cada lote estudiado.

Para la determinación de la actividad POX se siguió el protocolo descrito por Lopez *et al.*, (1994). Este método se basa en la medida de la producción de compuestos coloreados a una longitud de onda de 460 nm, resultado de la descomposición del peróxido de hidrógeno por la peroxidasa, en presencia de o-dianisidina como agente donante de hidrógeno. Dicha actividad se expresa en unidades de actividad (UA) por g de producto, siendo una UA el equivalente al incremento de 0,1 unidades de absorbancia por minuto (UA/g.p.f (g de peso fresco)).

#### *Cuantificación de compuestos fenólicos totales*

El procedimiento para determinar la concentración de compuestos fenólicos totales utilizado fue descrito por Singleton *et al.*, (1999), basado en la medida espectrofotométrica a 760 nm de los productos reducidos obtenidos de la reacción entre el reactivo de Folin-Ciocalteau y los fenoles de la muestra. El contenido de compuestos fenólicos totales se expresó como mg ácido gálico/100 g.p.f. Se utilizó una solución de ácido gálico (0-250 mg L<sup>-1</sup>) para realizar la recta patrón. El análisis se llevó a cabo en 3 extractos de cada lote de tratamiento.

### **Cálculo de la incidencia de podredumbres**

La incidencia de podredumbres en postcosecha para cada uno de los tratamientos aplicados se calculó aplicándose la siguiente fórmula:

$$Iii \quad (\%) = \frac{\overset{o}{ut} \quad p \quad u}{\overset{o}{ut} \quad tt \quad i} \times 100$$

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Determinación de la incidencia de la podredumbre desarrollada en campo.** Se inspeccionaron 750 frutos procedentes de 3 árboles diferentes (250 frutos de cada árbol) de cada tratamiento en el momento de la cosecha. En el lote tratado con el fungicida de síntesis se detectó un 18% de frutos afectados de podredumbre. Sin embargo, la afección en los frutos a los que se les aplicó *B. velezensis* BUZ-14 fue significativamente inferior, de un 10,1% lo que supone una reducción cercana al 50% de la incidencia de la enfermedad. Wei *et al.* (2011) también comprobaron una eficacia similar por parte de un fertilizante bioorgánico fortificado con una inoculación mixta de dos cepas de *B. amyloliquefaciens* (QL-5 y QL-18) para el control

de *Ralstonia solanacearum* en tomate, con el que se consiguió una reducción significativa de la enfermedad, llegando hasta un 75% respecto al producto sin biofortificar.

**Efecto de los tratamientos en la calidad de fruto en el momento de la cosecha.** La **firmeza** es uno de los atributos más importantes para determinar la aceptabilidad de los frutos en el mercado, y tiende a disminuir gradualmente hasta el fin de su vida útil (Bhatt y Jampala, 2020), y aunque el sabor y atributos visuales de la cereza contribuyen a su aceptación, la textura ejerce una fuerte influencia en la calidad y aceptabilidad del fruto (Harker *et al.*, 2003). Concretamente, la firmeza ha sido identificada como un atributo de textura extremadamente importante para la industria de la cereza (Guyer *et al.*, 1993; Ross *et al.*, 2009). Las cerezas tratadas con el agente de biocontrol BUZ-14 presentaron una mayor firmeza (72,4 unidades durofel) que los del tratamiento convencional (63,1 unidades durofel). Se detectó que esta menor firmeza en el lote con tratamiento convencional está relacionada con un mayor contenido en **sólidos solubles** y **una menor acidez** (Tabla 1) lo que podría estar relacionado con una maduración más temprana (comparada con los árboles tratados solo con el ABC). Este efecto sobre el grado de desarrollo lo observaron también Mannino *et al.* (2020) en un estudio que buscaba mejorar el desarrollo y calidad de tomates con el uso de un bioestimulante compuesto por levaduras y extractos de algas.

Para evaluar el **grado de deshidratación** de los pedúnculos, se realizó un análisis visual, comparando los pedúnculos de los frutos recolectados de cada lote con una escala descriptiva de 4 grados de deshidratación (Grado 1: verde intenso, brillante, grueso y sano; Grado 2: verde claro, sin brillo, algo deshidratado, fino en el medio y ancho en los extremos; Grado 3: verde muy claro, con zonas marrones (máximo 1/3 de la longitud total) fino y deshidratado y Grado 4: zonas marrones a partir de 1/3 de la longitud total, fino y con mal aspecto). Dicha escala fue realizada por el Grupo de Investigación Alimentos de Origen Vegetal en trabajos anteriores. Destacar que todos los pedúnculos analizados, se clasificaron en el grado 1 de la escala, independientemente del lote de tratamiento de procedencia.

**Efecto de los tratamientos en campo sobre el potencial de conservación postcosecha de cereza cv. Brooks.** Con el fin de evaluar la capacidad de los tratamientos precosecha sobre el control de las enfermedades durante la conservación postcosecha de la cereza, se planteó un estudio de vida útil durante 10 d en refrigeración a 1 °C y un posterior periodo de simulación de la comercialización de 2 d a 20 °C, en el que se analizó la presencia de podredumbres, así como la calidad comercial del fruto tanto a la salida de frío como tras el periodo de simulación de la comercialización.

Al comienzo del estudio de vida útil, todos los lotes fueron higienizados con una solución de hipoclorito sódico (100 ppm) a 4 °C. Este tratamiento higienizante fue aplicado con un drencher para simular las condiciones de manipulación de los frutos cuando éstos llegan a una central hortofrutícola. Seguidamente, se almacenaron durante 10 d a 1 °C y 98% de HR.

**Efectividad de los tratamientos sobre el desarrollo de la podredumbre marrón en conservación.** Tras 10 d de almacenamiento en frío, el lote de cerezas tratadas con fungicida de síntesis (tebuconazol) en campo, presentó una mayor incidencia de podredumbres (16,0%), mientras que el lote tratado con el agente BUZ-14 fue de 3,5%. Este mismo efecto de control de las podredumbres, lo observaron Madbouly *et al.* (2020) en manzana con 5 levaduras antagonistas, con las que lograron una reducción de hasta un 89,5% de la podredumbre marrón respecto a manzanas control, tratadas con agua destilada estéril. En otro estudio, la levadura *Metschnikowia fructicola* aplicada en plántulas de fresa en precosecha, redujo la incidencia de pudriciones producidas por *B. cinerea* y *R. stolonifer* durante el almacenamiento postcosecha entre 64 y 72%, una reducción significativamente mayor que la de la fenhexamida (fungicida químico) que redujo entre 23% y 35% la enfermedad respecto a las podredumbres de plántulas no tratadas (plántulas control) (Karabulut *et al.*, 2004).

**Evaluación de los atributos de calidad de cerezas Brooks durante el estudio de vida útil comercial.** A los 10 d de almacenamiento en refrigeración (T10), y tras realizar un análisis visual para evaluar el **grado de deshidratación** de los pedúnculos, se observó que, pese a que se detectaron síntomas de deshidratación en todos los tratamientos, el lote con mayor porcentaje de frutos deshidratados fue el lote tratado con tebuconazol como se muestra en la Figura 2.

Pese a que generalmente el sabor, altamente relacionado con los °Brix y la acidez total del fruto, y la firmeza se han considerado criterios secundarios para la apreciación de la calidad de las cerezas, se ha demostrado que estos atributos son decisivos para la apreciación de la calidad por parte de los consumidores.

En la Tabla 2, se observa como a lo largo del almacenamiento durante 10 d a 1 °C, la firmeza de los frutos no ha sufrido cambios significativos respecto al inicio de la conservación, aunque los frutos con menor firmeza siguen siendo los tratados con tebuconazol. Estas diferencias tampoco se detectaron en la acidez total, que se redujo desde el inicio de la conservación, hecho que también se ha comprobado en distintas variedades de cereza (Guyer *et al.* 1993), en frambuesa roja (Haffner *et al.* 2002) y en dátiles (Bhatt y Jampala, 2020).

**Influencia de los tratamientos precosecha en el sistema inmunológico del fruto.** Numerosos estudios han demostrado que las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) son microorganismos capaces de generar una respuesta sistémica, activando el sistema inmunológico de las plantas o frutos. Su uso conduce a un mayor contenido de nutrientes en sus tejidos y cambios metabólicos, influyendo también positivamente en la actividad y expresión génica de las enzimas que actúan en el metabolismo primario y secundario de las plantas (Nardi *et al.*, 2016).

- **Determinación de la actividad POX**

La actividad POX es uno de los factores que influyen en los cambios fisiológicos y bioquímicos a lo largo de la conservación de los frutos. Se ha comprobado que, en general, la actividad de este enzima tiende a aumentar durante el almacenamiento en diferentes tipos de frutos como la pera, los arándanos, níspero o la ciruela. En nuestro caso, independientemente de la combinación de tratamientos aplicados, este efecto se ve reflejado en todos los lotes desde el inicio al final de la conservación.

A lo largo de la vida útil de las cerezas, independientemente del tratamiento aplicado en precosecha, la actividad POX aumenta significativamente (Figura 3). Si realizamos un análisis de los datos en función del tipo de tratamiento aplicado en campo, se detecta que existen diferencias estadísticamente significativas entre la actividad POX de las cerezas tratadas con tebuconazol (13,16 UA/g.p.f. en T0F0 y 21,33 UA/g.p.f. en T10F0) y las que recibieron un tratamiento alternativo, siendo un 43,4 % superior al final del almacenamiento (33,88 UA/g.p.f para *B. velezensis* BUZ-14).

- **Determinación de compuestos fenólicos totales**

Del mismo modo que la actividad de las enzimas de oxidación está relacionada con procesos de resistencia frente a diversos estreses, y que esta puede ser impulsada por el uso de ABCs y distintas sustancias bioestimulantes, es de esperar que la síntesis de compuestos fenólicos totales sea directamente proporcional a la actividad de dichos enzimas, ya que resultan clave en las rutas de síntesis de estos compuestos (Assis *et al.*, 2001) y que estos aumenten a lo largo del periodo de conservación. Sheng *et al.* (2018), observaron como el contenido de fenoles en uva de mesa era aumentaba tras 28 d de almacenamiento.

En nuestro caso, no se ha observado un aumento significativo de la concentración de compuestos fenólicos totales a lo largo de tiempo de almacenamiento. Aunque sí que se

detectaron diferencias significativas entre los frutos de los distintos tratamientos al final de periodo de conservación (Figura 4).

## CONCLUSIÓN

El bioformulado a base del agente de control biológico BUZ-14, es capaz de activar el sistema de defensa innato del cultivo y de los frutos, lo cual se comprueba con la mayor concentración de compuestos fenólicos totales, y actividad enzimática peroxidasa observada en las muestras tratadas. Además, se ha observado como los frutos tratados con BUZ-14 mantienen mejor la calidad físico-química, conservando atributos tan importantes como la firmeza en valores elevados.

## REFERENCIAS

- Assis, J. S., Maldonado, R., Muñoz, T., Escribano, M. I., Merodio, C. (2001). Effect of high carbon dioxide concentration on PAL activity and phenolic contents in ripening cherimoya fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 23(1), 33–39.
- Bhatt, K., Jampala, S. S. M. (2020). Influence of pre-harvest foliar spray of fungal culture filtrates on post-harvest biology of date fruit harvested at Khalal stage. *Postharvest Biology and Technology*, 166, 111220.
- Feliziani, E., Santini, M., Landi, L., Romanazzi, G. (2013). Pre- and postharvest treatment with alternatives to synthetic fungicides to control postharvest decay of sweet cherry. *Postharvest Biology and Technology*, 78, 133–138
- Guyer, D. E., Sinha, N. K., Chang, T. S., Cash, J. N. (1993). Physicochemical and sensory characteristics of selected michigan sweet cherry (*Prunus-Avium* L) cultivars. *Journal of Food Quality*, 16(5), 355–370.
- Harker, F. R., Gunson, F. A., Jaeger, S. R. (2003). The case for fruit quality: an interpretive review of consumer attitudes, and preferences for apples. *Postharvest Biology and Technology*, 28(3), 333–347.
- Karabulut, O. A., Smilanick, J. L., Crisosto, C. H. Palou, L. (2010). “Control of brown rot of stone fruits by brief heated water immersion treatments”. *Crop Protection*, 29(8), pp. 903-906.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Schiavon, M., Ertani, A. (2016). Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. *Scientia Agricola*, 73(1), 18–23.
- Sheng, K., Zheng, H., Shui, S., Yan, L., Liu, C., Zheng, L. (2018). Comparison of postharvest UV-B and UV-C treatments on table grape: Changes in phenolic compounds and their transcription of biosynthetic genes during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 138, 74–81.
- Wei, Z., Yang, X., Yin, S., Shen, Q., Ran, W., Xu, Y. (2011). Efficacy of Bacillus-fortified organic fertiliser in controlling bacterial wilt of tomato in the field. *Applied Soil Ecology*, 48(2), 152–159.

## TABLAS Y FIGURAS

**Tabla 1.** Efecto de los tratamientos precosecha (tebuconazol y *B. velezensis* BUZ-14 sobre la firmeza (unidades durofel), sólidos solubles totales (° Brix), acidez total (mg ac. málico/kg p.f) e índice de madurez (IM = sólidos solubles totales / acidez total) de cerezas cv. Brooks en el momento de la cosecha. Los resultados corresponden a la media ± desviación estándar del análisis de 50 frutos.

Tratamiento precosecha	Firmeza (unidades Durofel)	Sólidos solubles totales (°Brix)	Acidez total (mg ac. málico/kg p.f)	Índice de madurez
<b>Tebuconazol</b>	63,1 ± 6,6a	17,9 ± 0,3a	6,3 ± 0,3a	2,9
<b><i>B. velezensis</i> BUZ-14</b>	72,5 ± 4,2b	14,2 ± 0,3b	8,6 ± 0,4b	1,7

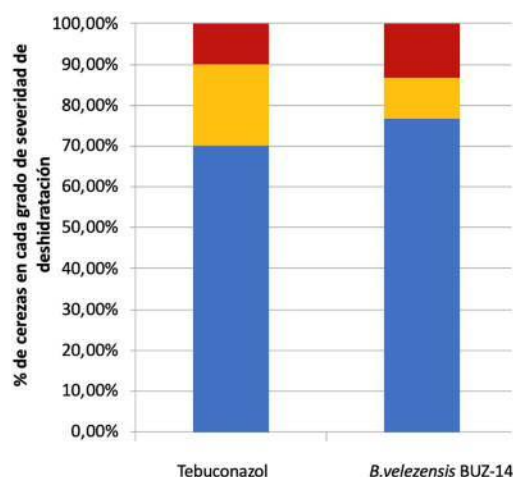
**Tabla 2.** Efecto de los tratamientos precosecha (tebuconazol y *B. velezensis* BUZ-14 sobre la firmeza (unidades durofel), sólidos solubles totales (° Brix), acidez total (mg ac. málico/kg p.f) e índice de madurez (IM = sólidos solubles totales / acidez total) de cerezas cv. Brooks tras 10 d de almacenamiento a 1 °C. Los resultados corresponden a la media ± desviación estándar del análisis de 50 frutos.

Tratamiento precosecha	Firmeza (Unidades Durofel)	Sólidos Solubles Totales (° BRIX)	Acidez total (g ác. málico/Kg.p.f)	Índice de madurez
<b>Tebuconazol</b>	62,7 ± 4,3a	18,8 ± 1,2a	5,7 ± 0,2a	3,3
<b><i>B. velezensis</i> BUZ-14</b>	72,4 ± 4,8b	16,7 ± 0,7a	6,1 ± 0,1a	2,7

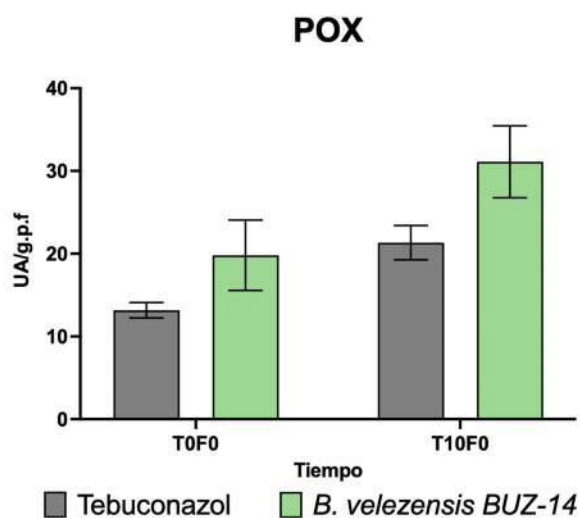


**Figura 1.** Escala de deshidratación de pedúnculos de cereza. Fuente: Grupo de investigación Alimentos de Origen Vegetal.

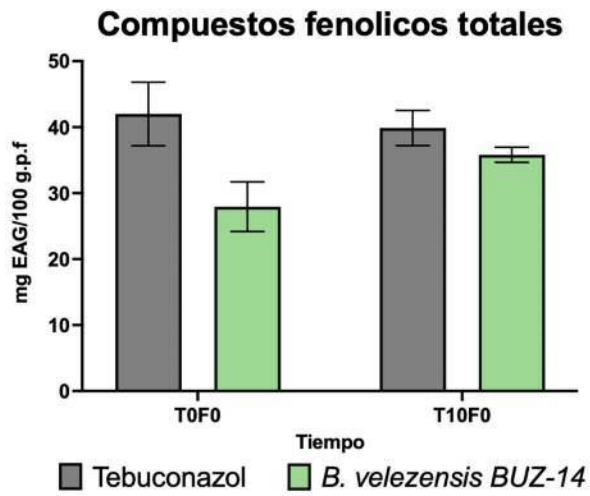




**Figura 2.** Efecto de los tratamientos precosecha tebuconazol y *B. velezensis* BUZ-14 sobre el grado de deshidratación del pedúnculo de cerezas Brooks tras su conservación durante 10 d a 1 °C (T10). ● G1 = no deshidratados, ● G2 = ligeramente deshidratados, ● G3 = deshidratación moderada, ● G4 = deshidratación severa.



**Figura 3.** Actividad del enzima peroxidasa (POX) (UA/ g.p.f.) de cerezas cv. Brooks tratadas con ● tebuconazol ● *B. velezensis* BUZ-14 en precosecha, a lo largo del periodo de vida útil. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de 3 réplicas de cada muestra medidas por triplicado.



**Figura 4.** Concentración de compuestos fenolicos totales (mg EAG (miligramos equivalentes de ácido gálico) /g p.f (peso fresco)) de cerezas cv. Brooks tratadas con • tebuconazol • *B. velezensis* BUZ-14 en precosecha, a lo largo del periodo de vida útil. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de 3 réplicas de cada muestra medidas por triplicado.