

## **Aceites esenciales y extractos naturales de plantas como ingredientes antifúngicos de recubrimientos comestibles a base de pectina para controlar la podredumbre verde y mantener la calidad poscosecha de naranjas 'Valencia'**

M.V. Alvarez <sup>1</sup>, L. Palou <sup>2</sup>, V. Taberner <sup>2</sup>, R.F.L. Souza <sup>2</sup>, M.B. Pérez-Gago <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Grupo Investigación en Ingeniería en Alimentos, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Mar del Plata, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, CCT Mar del Plata), Argentina.

<sup>2</sup> Centro de Tecnología Poscosecha (CTP), Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), 46113 Moncada, Valencia, España. e-mail: perez\_mbe@gva.es

### **Resumen**

Se han desarrollado nuevos recubrimientos comestibles antifúngicos a base de pectina y cera de abeja con aceites esenciales y extractos de plantas para reducir las pérdidas de poscosecha en naranjas 'Valencia'. En ensayos *in vitro*, los aceites esenciales de *Satureja montana*, *Cinnamomum zeylanicum* (CN), *Commiphora myrrha* (MY), eugenol (EU), geraniol (GE), y extractos de vainillina y propóleo fueron los más efectivos inhibiendo el crecimiento radial de *Penicillium digitatum* (inhibición de 90-100%). Estos agentes se incorporaron a los recubrimientos a concentraciones entre 0,2-2% (p/p) y se evaluó la actividad curativa en naranjas inoculadas artificialmente e incubadas durante 8 días a 20 °C. Posteriormente, se evaluó el efecto de los recubrimientos seleccionados en el control de la podredumbre verde y la calidad fisicoquímica y sensorial de la fruta durante 8 semanas de almacenamiento a 5 °C más 1 semana a 20 °C. Después de 8 días de incubación a 20 °C, los recubrimientos que contenían 0,2% GE, 0,8% EU o 1,5% MY redujeron la incidencia de la podredumbre verde entre 40-60%, mientras que el formulado con 0,8% CN fue el más efectivo reduciendo la severidad de la enfermedad. Los recubrimientos con 0,2% GE y 0,8% EU también redujeron la incidencia de la enfermedad en más del 50% a las 4 semanas en frío. Además, el recubrimiento con 0,8% EU fue el más efectivo reduciendo la pérdida de peso y proporcionó el mayor brillo a las naranjas recubiertas, lo que demuestra su potencial para reducir las pérdidas en poscosecha de cítricos.

**Palabras clave:** cítricos, *Penicillium digitatum*, control de enfermedades

### **INTRODUCCIÓN**

La podredumbre verde, causada por *Penicillium digitatum* (PD), es una de las enfermedades de poscosecha más importantes a nivel mundial en cítricos, causando grandes pérdidas económicas. Además, las pérdidas de calidad durante poscosecha causadas por deshidratación y alteraciones fisiológicas como los daños por frío también dificultan la comercialización del fruto. Los recubrimientos comestibles (RCs) pueden reducir el deterioro al crear una barrera semipermeable a gases y vapor de agua, reduciendo así la respiración y la pérdida de peso. Además, pueden actuar como soporte de sustancias activas, como agentes antimicrobianos naturales, que permiten el control de enfermedades, alargando la vida útil del fruto. El uso de aceites esenciales (AEs) y extractos naturales

tienen actividad antimicrobiana frente a un amplio espectro de microorganismos y, como están clasificados como sustancias GRAS ('generally recognized as safe'), pueden utilizarse para fines alimentarios. Así, el objetivo de este trabajo fue desarrollar nuevos RCs con actividad antifúngica a base de pectina (PEC) con AEs y extractos naturales para controlar la podredumbre verde y mantener la calidad poscosecha de naranjas 'Valencia' durante frigoconservación.

## MATERIAL Y MÉTODOS

En ensayos *in vitro* se evaluaron los AEs de ajedrea (SM; *Satureja montana* L.), canela (CN; *Cinnamomum zeylanicum*), lemongrass (LG; *Cymbopogon citratus*), eugenol (EU), geraniol (GE), mirra (MY; *Commiphora myrrha*), y los extractos secos de té verde (GT; *Camellia sinensis*), vainillina (VA) y propóleo (PRO). Para evaluar el crecimiento de PD frente a los AEs se utilizó la metodología de 'exposición a los componentes volátiles' descrito por Plaza et al. (2004); mientras que para los compuestos no volátiles se utilizó el método de 'dilución en medio agar' según Martínez-Blay et al. (2020). Los compuestos volátiles se aplicaron a las dosis de 10, 20 y 40  $\mu\text{L}$  empapando discos de papel de filtro estériles colocados en la tapa de placas Petri con medio PDA inoculadas con PD (20  $\mu\text{L}$ ;  $10^6$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ ). Los extractos secos y el AE de MY, que no mostró efectividad en la fase de vapor, se evaluaron incorporados al medio PDA a las concentraciones que se muestran en la Fig. 1. El crecimiento micelial a los 7 días de incubación a 25 °C se evaluó calculando la media de dos diámetros perpendiculares de la colonia fúngica. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición respecto al control (placas inoculadas y sin sustancia activa). Los AEs y extractos más efectivos se incorporaron a concentraciones entre 0,2-2% (p/p) como ingredientes antifúngicos de un RC formulado a base de PEC (2%) y cera de abeja (0,7%). Todas las emulsiones contenían glicerol como plastificante y una mezcla de los ácidos grasos oleico y palmítico (1:1) como emulsificantes.

El estudio curativo *in vivo* de los RCs se realizó en naranjas 'Valencia' inoculadas con una suspensión de  $10^6$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  de PD. Tras 24 h de incubación a 20 °C, los frutos fueron recubiertos manualmente y se incubaron a 20 °C y 90 % HR por 12 días. Durante este periodo, se determinaron la incidencia (% frutos infectados) y la severidad (diámetro de lesión, en mm) de la enfermedad. Posteriormente, los RCs con 0,8% CN, 0,8% EU, 0,2% GE y 1,5% MY fueron seleccionados para evaluar su actividad antifúngica durante 6 semanas de almacenamiento a 5 °C y 90 % HR. Además, se evaluó la calidad fisicoquímica (pérdida de peso, firmeza, índice de madurez, etanol y acetaldehído en zumo) y sensorial (calidad global, malos sabores, brillo) de la fruta tras 4 y 8 semanas de almacenamiento a 5 °C y 90 % HR más una semana de vida útil a 20 °C, siguiendo la metodología de Martínez-Blay et al. (2020). Todos los resultados se procesaron mediante análisis de varianza (ANOVA). Para la separación de medias se utilizó la prueba de la Mínima Diferencia Significativa de Fisher (MDS) al 95% de confianza.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los ensayos *in vitro*, SM y EU (a una dosis de 10  $\mu\text{L}$ ), CN y GN (a una dosis de 20  $\mu\text{L}$ ), VA (0,125%) y PRO (0,5%) fueron los agentes más efectivos para inhibir el crecimiento micelial de PD (90-100%). El AE de MY no mostró un efecto inhibitor cuando se ensayó por el método de exposición a los compuestos volátiles, mientras que incorporado

al medio agar mostró un efecto inhibidor moderado (Fig. 1). Los resultados muestran que la eficacia dependió de la dosis y de la composición de los AEs y los extractos ensayados. Normalmente, la actividad antifúngica de estos agentes se debe a un efecto combinado de los diferentes compuestos químicos presentes en los mismos (Kuorwel et al., 2011).

En los ensayos *in vivo* con fruta inoculada e incubada durante 8 días a 20 °C, los RCs formulados con 0,4% y 0,8% EU, 0,2% GE y 1,5% MY redujeron significativamente la incidencia de PD en más del 40%, mientras que se observó una reducción de la severidad de la enfermedad superior al 45% con 0,4% EU, 0,8% CN y todas las concentraciones ensayadas de GE (Fig. 2). Los RCs con 0,2% GE y 0,8% EU también redujeron la incidencia de la enfermedad en más del 50% a las 4 semanas en frío (Fig. 3). Sin embargo, al final del periodo de almacenamiento, no se observaron diferencias significativas con el control sin recubrir. En el caso de la severidad de la enfermedad, todos los RCs, excepto PEC-1,5% MY, inhibieron significativamente el crecimiento fúngico durante todo el periodo de almacenamiento en frío, con reducciones que alcanzaron el 40-50% después de 6 semanas. Estos resultados confirman que el efecto de estos agentes naturales es fungistático, tal y como se ha descrito en otros trabajos en cítricos en los que se han incorporado sales GRAS, AEs o extractos naturales a RCs (Martínez-Blay et al., 2020).

Al final del almacenamiento, la aplicación de los RCs con 0,8% UE o 1,5% MY redujeron significativamente la pérdida de peso respecto al control. El resto de parámetros de calidad fisicoquímica evaluados no se vieron modificados por la aplicación de los RCs, a excepción del contenido de etanol y acetaldehído, que fue mayor en naranjas recubiertas, mostrando la capacidad de los RCs para modificar la composición gaseosa interna de la fruta (datos no mostrados). Sin embargo, las propiedades sensoriales de las naranjas no se vieron afectadas negativamente por la aplicación de los RCs (datos no mostrados).

## CONCLUSIONES

Entre los diferentes RCs evaluados, PEC-0,8% EU podría ser un tratamiento comercial prometedor para reducir la podredumbre verde y mantener la calidad poscosecha de los cítricos, proporcionando una alternativa segura a las ceras convencionales formuladas con fungicidas químicos de síntesis.

## REFERENCIAS

- Kuorwel, K.K., Cran, M.J., Sonneveld, K., Miltz, J. and Bigger, S.W. (2011). Essential oils and their principal constituents as antimicrobial agents for synthetic packaging films. *J. Food Sci.* 76: R164–R177.
- Martínez-Blay, V., Pérez-Gago, M.B., de la Fuente, B., Carbó, R. and Palou, L. (2020). Edible coatings formulated with antifungal GRAS salts to control citrus anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and preserve postharvest fruit quality. *Coatings* 10: 730.
- Plaza, P., Torres, R., Usall, J., Lamarca, N. and Viñas, I. (2004). Evaluation of the potential of commercial post-harvest application of essential oils to control citrus decay. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 79: 935–940.

## FIGURAS

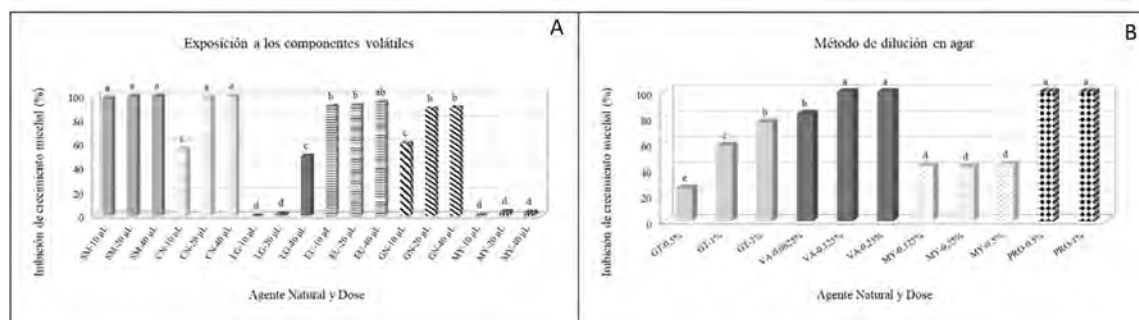


Fig. 1. Reducción del crecimiento micelial *in vitro* de *Penicillium digitatum* frente a compuestos volátiles (A) y extractos naturales (B) tras 7 días de incubación a 25 °C. Medias de tratamientos con letras diferentes son estadísticamente distintas según la prueba MDS ( $p < 0,05$ ).

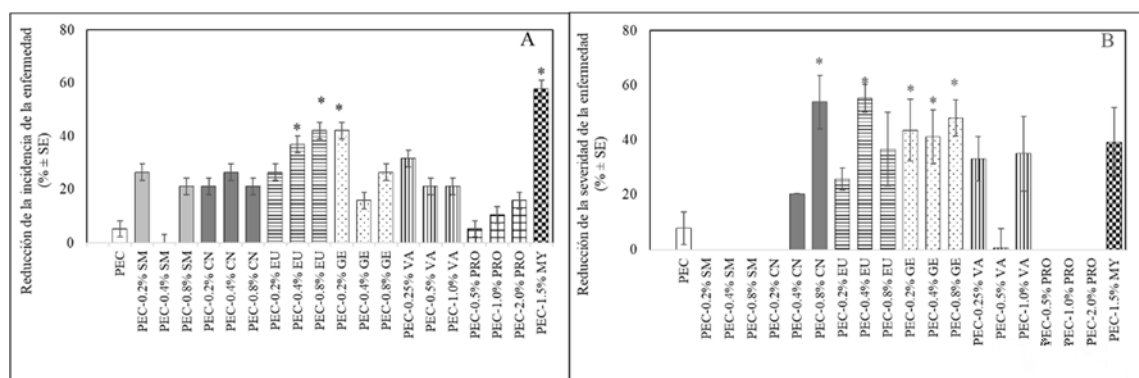


Fig. 2. Porcentaje de reducción de la incidencia (A) y severidad (B) de la podredumbre verde respecto al control sin recubrir en naranjas 'Valencia' inoculadas artificialmente con *Penicillium digitatum* y recubiertas 24 h después con un recubrimiento a base de pectina (PEC) y diferentes AEs o extractos naturales, tras 8 días de incubación a 20 °C. \* indica medias significativamente menores que el recubrimiento de PEC sin agente antifúngico según la prueba MDS ( $p < 0,05$ ).

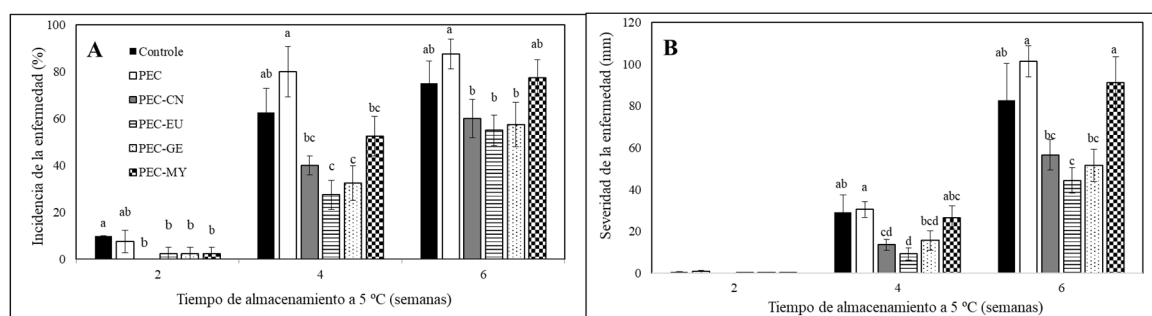


Fig. 3. Incidencia y severidad de la podredumbre verde en naranjas 'Valencia' inoculadas artificialmente con *Penicillium digitatum* 24 h antes aplicar recubrimientos a base de pectina (PEC) y diferentes AEs, durante almacenamiento en frío a 5 °C y 90% RH durante 6 semanas. El control corresponde a fruta inoculada sin recubrir. Para cada tiempo de almacenamiento, medias de tratamientos con diferentes letras son estadísticamente distintas según la prueba MDS ( $p < 0,05$ ).