

Recubrimientos comestibles formulados con sales GRAS para controlar la antracnosis y mantener la calidad de frutos cítricos frigoconservados

V. Martínez-Blay¹, P. Quintanilla^{1,2}, M.B. Pérez-Gago¹ y L. Palou¹

¹ Centro de Tecnología Poscosecha (CTP), Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), 46113 Moncada, Valencia. Email: quintanilla_pal@externos.gva.es

² Vicerrectorado de Investigación, Universitat Politècnica de València, Cami de Vera, s/n, 46022 Valencia.

Resumen

Colletotrichum gloeosporioides es el agente causal de la antracnosis de los cítricos. Este trabajo evaluó la eficacia antifúngica *in vitro* (reducción del crecimiento miceliar en medio PDA) de varias sustancias GRAS ('generally recognized as safe'), a diferentes concentraciones, contra este patógeno. Los mejores resultados se obtuvieron con metilparabeno sódico (0,1%), etilparabeno sódico (0,1%) y bicarbonato amónico (2%). Posteriormente, sales seleccionadas se utilizaron como ingredientes antifúngicos de recubrimientos comestibles formulados con hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y cera de abeja (BW). Estos recubrimientos se aplicaron en ensayos curativos *in vivo* a mandarinas 'Nadorcott' y naranjas 'Valencia Late' inoculadas artificialmente con *C. gloeosporioides* 24 h antes y se obtuvieron reducciones de la severidad de la enfermedad respecto al control del 50-70% en el caso de las mandarinas y del 10-35% en el de las naranjas. Los recubrimientos HPMC-BW con sorbato potásico (2%), benzoato sódico (2%) y silicato potásico (2%) fueron los más efectivos para controlar la enfermedad. Estos recubrimientos se seleccionaron para estudiar su efecto sobre naranjas 'Valencia Late' no inoculadas y frigoconservadas. Tras 56 días a 5°C y 90% HR, seguidos de 7 días de simulación de vida comercial a 20°C, se observó que los recubrimientos no redujeron de forma importante la pérdida de peso de las naranjas e incluso en el caso de los formulados con sorbato potásico la incrementaron, debido posiblemente a cambios en la permeabilidad de la cutícula. Por otro lado, los recubrimientos modificaron la atmósfera interna del fruto, pero estos cambios no afectaron negativamente a la calidad físico-química y sensorial de la fruta.

Palabras clave: *Colletotrichum gloeosporioides*, poscosecha, naranjas, mandarinas.

INTRODUCCIÓN

La producción citrícola (*Citrus* spp., Rutaceae) mundial supera los 130 millones de toneladas. España es el sexto productor de cítricos en fresco, superando los 6 millones de toneladas, y el primero en exportación (FAOSTAT, 2018). Las enfermedades de poscosecha de los cítricos son causadas por hongos patógenos que infectan la fruta antes, durante o después de la cosecha pero que se desarrollan tras la recolección, representando un riesgo económico continuo para el sector. La antracnosis de poscosecha, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., se inicia con infecciones latentes de campo en el fruto favorecidas por temperaturas y humedades relativas (HR) elevadas.

Sus síntomas son manchas oscuras en el fruto que pueden ocupar gran parte de su superficie y mostrar masas de conidios de color salmón (Smilanick et al., 2020).

La extensión mediante frigoconservación del periodo comercial de los cítricos puede incidir negativamente en la calidad de la fruta y aumentar la incidencia de enfermedades de poscosecha como la antracnosis. Los recubrimientos comestibles (RCs) pueden reducir el deterioro de frutas y hortalizas al crear una barrera semipermeable frente a gases, reduciendo la respiración y la pérdida de peso y firmeza, y además actuar de soporte de sustancias activas, como agentes antimicrobianos (Valencia-Chamorro et al., 2011). La incorporación de sales GRAS ('generally recognized as safe') con acción antifúngica a RCs a base de hidroxipropil metilcelulosa (HPMC) y lípidos ha emergido en los últimos años como una alternativa viable y no contaminante frente a tratamientos poscosecha tradicionales como las ceras formuladas con fungicidas químicos (Fagundes et al., 2013; Guimarães et al., 2019). En este trabajo se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de sales GRAS contra *C. gloeosporioides* y se desarrollaron nuevos RCs con HPMC, cera de abeja (BW) y las sales seleccionadas efectivos para controlar la antracnosis y mantener la calidad fisicoquímica y sensorial de fruta frigoconservada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se probaron las sales bicarbonato amónico (ABC), carbonato amónico (AC), bicarbonato potásico (PBC), carbonato potásico (PC), silicato potásico (PSi), sorbato potásico (PS), benzoato sódico (SB), etilparabeno sódico (SEP), metilparabeno sódico (SMP) y propionato sódico (SP). El crecimiento *in vitro* de *C. gloeosporioides* (diámetro de colonia) se evaluó en placas Petri con medio PDA modificado con soluciones acuosas de las sales a las concentraciones (v/v) de 0,2, 1 y 2% (0,01, 0,05 y 0,1% para SEP y SMP). Cada placa se inoculó con un tapón miceliar de 5 mm de diámetro (cultivos del hongo de 7-14 días). Se usaron 4 réplicas (placas) por sal y concentración. Se evaluó la reducción del crecimiento miceliar respecto al control (%) tras incubación, 7 días, a 25°C.

Los RCs fueron emulsiones estables de HPMC y BW formuladas con sales GRAS seleccionadas según los resultados *in vitro*: AC (0,2%), PS (2%), PC (0,2%), SMP (0,1%), SEP (0,1%), SB (2%) y PSi (2%). Contuvieron 1,3% de HPMC (p/p, base húmeda, bh), 3% de BW (bh), ratios constantes de HPMC-plastificante (2:1, glicerol) y BW-emulsificante (3:1, ácido esteárico o Tween-80 para SEP y SMP), una concentración de sólidos del 6% y se prepararon a 95°C con un homogeneizador de alta velocidad. Se evaluó la capacidad de control de la antracnosis de los RCs en mandarinas 'Nadorcott' y naranjas 'Valencia Late' inoculadas artificialmente, mediante una herida (1x2 mm) en la zona ecuatorial del fruto con un punzón sumergido en una suspensión de 2×10^6 esporas mL^{-1} de *C. gloeosporioides*. Tras 24 h a 25°C, los frutos se recubrieron manualmente (300 μL de emulsión). Los controles fueron frutos inoculados sin recubrir. Cada tratamiento se aplicó a 4 repeticiones de 10 frutos. Se determinó la severidad de la enfermedad (diámetro de lesión, en mm) tras 15 días de incubación a 25°C. El efecto de los RCs más efectivos sobre la calidad del fruto se evaluó en naranjas 'Valencia Late' sin inocular conservadas a 5°C, determinándose: pérdida de peso (%), firmeza (% deformación corteza), índice de madurez (IM=CSS/AT; CSS: contenido en sólidos solubles, °Brix; AT: acidez titulable, % ácido cítrico; n=15), concentración de CO_2 (% CO_2 , n=10) y volátiles (mg L^{-1} de etanol y acetaldehído, n=15). Sensorialmente, se evaluó (n=4): sabor global (1=pobre a 9=óptimo), malos sabores (1=ausencia a 5=pronunciados) y apariencia externa (1=mala a

3=buena). Los resultados se procesaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y el test de la Mínima Diferencia Significativa de Fisher (MDS) al 95% de confianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

In vitro se obtuvieron diferencias significativas entre sales y un efecto dependiente de la concentración, siendo más efectivas a mayor dosis. Destaca la inhibición total del crecimiento a los 7 días con SMP (0,1%), SEP (0,1%) y ABC (2%) (datos no mostrados). Los RCs ensayados redujeron la severidad de la antracnosis respecto al control del 50-70% en mandarinas ‘Nadorcott’ y del 10-35% en naranjas ‘Valencia Late’, siendo los RCs con PS, SB y PSi al 2% los más efectivos (Fig. 1). Estos tres RCs se estudiaron sobre la calidad de naranjas frigoconservadas. Tras 56 días a 5°C y 7 días a 20°C ninguno de ellos mejoró la pérdida de peso e incluso los formulados con PS la incrementaron (Tabla 1), debido posiblemente a cambios en la permeabilidad de la cutícula. Todos los RCs modificaron la atmósfera interna de la fruta, aumentando su concentración de CO₂, pero ninguno afectó negativamente su calidad (Tabla 1). Sensorialmente (se muestran promedios para control, HPMC-BW-PS, HPMC-BW-SB y HPMC-BW-PSi respectivamente) no existieron diferencias significativas ni en el sabor global de la fruta (5,7, 5,5, 5,3 y 5,6) ni en la presencia de malos sabores (1,3, 1,3, 1,8 y 1,3). El aspecto de los RCs no mejoró respecto al control, siendo los que contenían PSi los de mejor aspecto (datos no mostrados). Estos resultados confirman que los RCs de HPMC-BW con PS, SB o PSi son alternativas potenciales para controlar la antracnosis de poscosecha en cítricos y mantener la calidad de la fruta durante periodos largos de frigoconservación. Puesto que RCs similares resultaron efectivos en otros patosistemas (Fagundes et al., 2013; Guimarães et al., 2019), se confirma el amplio espectro de estas soluciones poscosecha.

CONCLUSIONES

Los RCs con PS, SB y PSi al 2% suponen una alternativa no contaminante para el control de la antracnosis en cítricos sin afectar negativamente la calidad de fruta frigoconservada. Futuros estudios deben mejorar sus características físicas y su aspecto.

AGRADECIMIENTOS

La actividad investigadora de la Dra. Victoria Martínez-Blay está financiada por el IVIA y el Fondo Social Europeo (Beca IVIA-FSE 2018 n°24). Agradecer al Programa de Recualificación del sistema universitario español del Ministerio de Universidades, por el contrato Margarita Salas – UPV de P. Quintanilla, financiado por la Unión Europea-Next generation EU. Por último, nuestro agradecimiento a Fontestad S.A. por la fruta proporcionada.

REFERENCIAS

- FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2018) Statistics. Disponible online: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> (acceso: 17 de junio 2020).
- Smilanick, J.L., Erasmus, A., Palou, L. 2020. Citrus fruits. In: Postharvest Pathology of Fresh Horticultural Produce, Palou, L., Smilanick, J.L., Eds. CRC Press, Taylor and Francis Group: Boca Raton, FL, USA, pp. 3–53.

Valencia-Chamorro, S.A., Palou, L., del Río, M.A., Pérez-Gago, M.B. (2011). Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally fruits and vegetables: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51: 872-900.

Fagundes, C., Pérez-Gago, M.B., Monteiro, A.R., Palou, L. (2013). Antifungal activity of food additives *in vitro* and as ingredients of HPMC–lipid edible coatings against *B. cinerea* and *A. alternata* on cherry tomato. *Int. J. Food Microbiol.* 166: 391-398.

Guimarães, J., de la Fuente, B., Pérez-Gago, M.B., Andradás, C., Carbó, R.; Mattiuz, B.-H., Palou, L. (2019). Antifungal activity of GRAS salts against *L. theobromae in vitro* and as ingredients of HPMC-lipid composite edible coatings to control Diplodia stem-end rot and maintain postharvest quality of citrus. *Int. J. Food Microbiol.* 301: 9–18.

TABLAS

Tabla 1. Valores medios de pérdida de peso, firmeza (F), índice de madurez (IM), concentración de CO₂, etanol y acetaldehído en naranjas ‘Valencia Late’ recubiertas con HPMC-BW-GRAS (2%) (PS=sorbato potásico, SB=benzoato sódico, PSi=silicato potásico), tras 56 días a 5°C y 7 días a 20°C.

Parámetros de calidad	Control	HPMC-BW-PS	HPMC-BW-SB	HPMC-BW-PSi
Pérdida de peso (%)	3,48 ^{ab}	3,71 ^a	3,91 ^a	2,97 ^b
F (% deformación)	2,66 ^a	2,87 ^a	2,47 ^a	2,46 ^a
IM (CSS/AT)	12,95 ^a	13,28 ^a	12,28 ^a	10,29 ^b
CO ₂ (%)	1,76 ^c	4,30 ^b	4,25 ^b	5,72 ^a
Etanol (mg L ⁻¹)	441,49 ^c	606,90 ^{ab}	543,17 ^{bc}	699,63 ^a
Acetaldehído (mg L ⁻¹)	5,72 ^c	6,88 ^b	7,47 ^{ab}	7,72 ^a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) según el test MDS tras el ANOVA.

FIGURAS

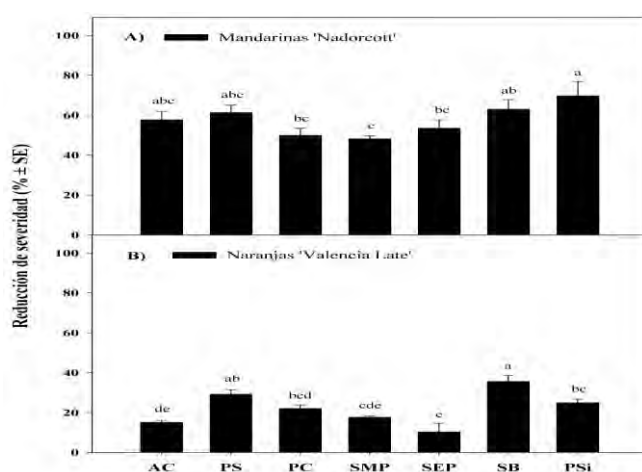


Fig. 1. Reducción de severidad de la antracnosis, respecto al control, en fruta inoculada artificialmente con *C. gloeosporioides* y recubierta con HPMC-BW-GRAS (2%) (AC=carbonato amónico, PS=sorbato potásico, PC=carbonato potásico, SMP=metilparabeno sódico, SEP=etilparabeno sódico, SB=benzoato sódico, PSi=silicato potásico), tras 15 días a 25°C. Letras diferentes marcan diferencias significativas ($P < 0,05$; test MDS tras ANOVA).