



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

EFECTO DE LA APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTOS A BASE DE BIOPOLÍMEROS Y CARVACROL SOBRE LA CALIDAD POSCOSECHA DE MANZANAS

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN
DE LA CALIDAD Y LA SEGURIDAD ALIMENTARIA

ALUMNA:
ÁNGELA JÁVAGA TÉBAR

TUTORA ACADÉMICA:
CONSUELO GONZÁLEZ MARTÍNEZ

COTUTOR/A:
EUGENIA MARTÍN ESPARZA

DIRECTORA EXPERIMENTAL:
MAYRA SAPPER

Curso Académico: 2018-2019

VALENCIA, JULIO DE 2019

EFECTO DE LA APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTOS A BASE DE BIOPOLÍMEROS Y CARVACROL SOBRE LA CALIDAD POSCOSECHA DE MANZANAS

Ángela Jávaga Tébar, Mayra Sapper, Eugenia Martín Esparza¹, Consuelo González Martínez¹

RESUMEN

Se han estudiado diferentes formulaciones de recubrimientos a base de alcohol polivinílico (PVA) y almidón de patata (S) con la incorporación de carvacrol (C) emulsionado para mejorar la acción antifúngica de las dispersiones formadoras de recubrimiento (DFR). Su efectividad en el almacenamiento poscosecha de manzanas de la variedad *Golden delicious* fue evaluada mediante el análisis de la densidad superficial de sólidos, la pérdida de peso, la tasa de respiración, la evolución de la firmeza de la fruta y la eficacia antifúngica de estos recubrimientos como tratamiento curativo contra *Botrytis cinerea*. La aplicación de los recubrimientos activos con carvacrol ensayados no tuvo un efecto destacable sobre la fisiología metabólica de la manzana ni sobre las propiedades mecánicas de la fruta, seguramente debido a su baja viscosidad, que dio lugar a una baja densidad superficial de los recubrimientos utilizados. Sin embargo, su aplicación fue muy efectiva contra el crecimiento de *Botrytis cinerea*, especialmente en las formulaciones con mayor contenido en carvacrol (100PVA:0S-C₄₀ y 50PVA:50S-C₈₀), reduciendo significativamente la severidad de la infección del hongo.

PALABRAS CLAVE: Almidón, alcohol polivinílico, carvacrol, recubrimientos, manzanas, antifúngico.

RESUM

S'han estudiat diferents formulacions de recobriments amb base d'alcohol polovinílic (PVA) y midó de creïlla (S) amb la incorporació de carvacrol (C) emulsionat per a millorar l'acció antifúngica de les dispersions formadores del recobriment (DFR). La seua efectivitat en l'emmagatzemament després de la collita de pomes de la varietat *Golden delicious* va ser avaluada per mitjà de l'anàlisi de la densitat superficial de sòlids, la pèrdua de pes, la taxa de respiració, la evolució de la fermesa de la fruita y l'eficàcia antifúngica d'estos recobriments com a tractament curatiu contra *Botrytis cinerea*. L'aplicació dels recobriments actius amb carvacrol assatjats no va tindre un efecte destacable sobre la fisiologia metabòlica de la poma ni sobre les propietats mecàniques de la fruita, segurament a causa de la seua baixa viscositat, que va donar lloc a una baixa densitat superficial dels recobriments utilitzats. No obstant, la seua aplicació va ser molt efectiva contra el creixement de *Botrytis cinerea*", especialment en les formulacions

amb major contingut en carvacrol (100PVA:0S-C₄₀ y 50PVA:50S-C₈₀), reduint significativament la severitat.

PARAULES CLAU: midó, alcohol polovinílic, carvacrol, recobriments, pome, antifúngico.

ABSTRACT

Different coating formulations based on polyvinyl alcohol (PVA) and potato starch (S) with the incorporation of emulsified carvacrol (C), have been studied in order to improve the antifungal action of the coating-forming systems (CFS). Its effectiveness in post-harvest storage of *Golden delicious* apples variety has been assessed in terms of the solids surface density, the evolution of the fruit weight loss, respiration rate and firmness, and the antifungal efficacy as a curative treatment against *Botrytis cinerea*. The application of the tested active coatings did not have a remarkable effect on the apple metabolic physiology or on the fruit mechanical properties, probably due to its low viscosity, which resulted in a low solids surface density. However, its application was very effective to control the growth of *Botrytis cinerea*, especially in the formulations with higher carvacrol content (100PVA:0S-C₄₀ y 50PVA:50S-C₈₀), reducing the severity of this mould.

KEYWORDS: starch, polyvinyl alcohol, carvacrol, coatings, apple, antifungal.

¹ Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, España.

INTRODUCCIÓN

Las frutas y verduras permanecen como tejidos vivos hasta el momento en que se consumen y son propensos a cambios fisiológicos y bioquímicos, que pueden tener orígenes físicos o patológicos (Palou et al., 2015), y se ven afectados por diversos factores como la temperatura, la humedad relativa (HR), la composición de la atmósfera durante y después de la cosecha y el tipo y grado de infección por microorganismos o el ataque de insectos (Singh y Sharma, 2018).

Las enfermedades poscosecha son una de las causas más relevantes que afectan a la calidad de productos hortofrutícolas durante el almacenamiento, principalmente generadas por hongos de la especie *Botrytis*, *Penicillium*, *Monilia*, entre otros (Castillo et al., 2010), y la resistencia natural de las frutas y verduras a estas enfermedades disminuye con el tiempo de almacenamiento y la madurez (Troncoso-Rojas y Tiznado-Hernández, 2014). La especie *Botrytis cinerea* es considerada una de las enfermedades poscosecha más comunes de varias frutas, incluidas las manzanas (Batta, 2004; Palou et al., 2015). La infección comienza con un área circular más oscura donde los tejidos son más blandos que el resto de partes de la fruta, y la esporulación posterior, cuyo color varía de blanco a gris, se desarrolla desde el lugar de la infección en condiciones de temperatura ambiente y alta humedad (Romanazzi y Feliziani, 2014).

Los tratamientos con ceras sintéticas convencionales y fungicidas químicos han sido utilizados durante años para controlar la descomposición poscosecha y prolongar la vida útil de la fruta. Sin embargo, las nuevas regulaciones restrictivas con respecto a sus residuos, la reducción de los límites legales de aceptabilidad y la continua aplicación de estos tratamientos ha conducido a una creciente preocupación hacia estos compuestos y a la proliferación de cepas patógenas resistentes (Sapper et al., 2018).

Con el objetivo de reducir el uso de aditivos químicos en la industria alimentaria, la comunidad científica ha realizado un esfuerzo en buscar una alternativa sostenible y respetuosa con el medio ambiente y ha aumentado el interés en el empleo de aditivos alimentarios naturales con propiedades antifúngicas y antioxidantes que no tienen efecto negativo en la salud humana (Alves-Silva et al., 2013). Los aceites esenciales extraídos de plantas y especias poseen dichas propiedades (Viuda-Martos et al., 2010) proporcionadas por sus componentes fenólicos de naturaleza terpenoide (Hulin et al., 1998). El carvacrol, componente principal de los aceites esenciales de orégano y tomillo, es un compuesto que exhibe una actividad antimicrobiana de amplio espectro, por lo que su estudio resulta interesante (Requena et al., 2017).

No obstante, a pesar del gran potencial de los aceites esenciales, la principal limitación de su aplicación es la posible inducción de un fuerte olor y sabor en la fruta, la alta volatilidad de los compuestos que ejercen actividad antifúngica, riesgos de fitotoxicidad y problemas tecnológicos asociados con aplicaciones a escala comercial (Palou et al., 2016). Para solventar este problema se han desarrollado recubrimientos activos a base

de biopolímeros naturales, como polisacáridos o proteínas, con aceites esenciales, que han demostrado poseer un efecto antibacteriano y antifúngico (Atarés y Chiralt, 2016), evitando el contacto directo con el fruto y modulando su liberación. Los recubrimientos actúan como barrera al intercambio de gases, reduciendo las alteraciones microbiológicas y la transferencia de gases, proporcionando un efecto similar al almacenamiento en atmósfera modificada o controlada (Vargas et al., 2008).

En la actualidad, debido a su abundancia y bajo coste de producción, existe un gran interés en la utilización de almidón (S) como componente de películas comestibles y recubrimientos biodegradables (Palacín, 2012). Los recubrimientos a base de almidón proporcionan una película inodora y transparente que presenta muy baja permeabilidad al oxígeno y otros gases, lo cual supone una ventaja en su aplicación como material de envasado de productos hortofrutícolas, que podrían además ser portadores de compuestos activos para el control antifúngico (Ortega-Toro et al., 2017). Sin embargo, presenta algunas limitaciones para su empleo a causa de su fuerte carácter hidrofílico y escaso poder barrera al vapor de agua y pobres propiedades mecánicas, comparado con los polímeros sintéticos convencionales (Teixera et al., 2009).

Se han realizado diferentes intentos para resolver estos problemas obteniendo mezclas de almidón con otros biopolímeros o bioplásticos (Bonilla et al., 2013; Gupta et al., 2014; Ortega-Toro et al., 2014) que se obtienen a partir de fuentes renovables o síntesis y son biodegradables. De los bioplásticos, el alcohol polivinílico (PVA), los poliésteres alifáticos, como los poli B-hidroxialcanoatos (PHA) y el ácido poliláctico (PLA) o la poli-ε-caprolactona (PCL), representan alternativas interesantes debido a sus buenas propiedades mecánicas y, en algunos casos, de naturaleza hidrófoba, que pueden contribuir a modular las propiedades del almidón. Entre todos ellos, el PVA exhibe mayor biocompatibilidad con las moléculas de almidón a un menor coste (Lu et al., 2009) y presenta buena capacidad de formación de películas transparentes e inodoras, con alta resistencia a la tracción y flexibilidad y buenas propiedades barrera al oxígeno y a los aromas, características que se deben a la presencia de grupos OH y a la formación de enlaces de hidrógeno (Bonilla et al., 2014).

En el presente trabajo, se aplicaron recubrimientos de PVA y S que incorporaban carvacrol para evaluar: (1) el comportamiento poscosecha de la fruta recubierta en términos de pérdida de peso, tasas de respiración y propiedades mecánicas y (2) la eficacia antifúngica de estos recubrimientos como tratamiento curativo contra *Botrytis cinerea* en manzanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Las disoluciones formadoras de recubrimiento (DFR) se prepararon a partir de almidón de patata (Roquette, Lestrem, France), alcohol polivinílico de peso molecular 13,000-23,000 y grado de hidrólisis 87-89% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) y carvacrol como compuesto antifúngico (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Como agente plastificante se utilizó glicerol (Panreac Química S.A., Castellar de Vallès, Barcelona, España). El Agar Patata Dextrosa (PDA) y el NaCl utilizados para el análisis microbiológico fueron adquiridos de Scharlab (Barcelona, España) y Panreac Química S.A. (Castellar de Vallès, Barcelona, España), respectivamente.

Diseño experimental y elaboración de las dispersiones formadoras de recubrimiento (DFR)

Las formulaciones con diferentes relaciones de almidón de patata (S) y alcohol polivinílico (PVA) se obtuvieron a partir de dos disoluciones madre en las siguientes proporciones: 0PVA:100S y 100PVA:0S. Como plastificante se adicionó glicerol (GLI) en relación polímero:glicerol 1:0,25. Se adicionó por emulsificación directa carvacrol (C) como compuesto activo en una proporción de un 40 u 80% respecto al peso del PVA (en la nomenclatura, C₄₀ y C₈₀ respectivamente). La Tabla 1 indica las diferentes formulaciones acompañadas por la fracción másica de cada componente respecto al total de sólidos.

TABLA 1. Fracción másica (Xi) de cada compuesto en el total de sólidos de cada formulación (siendo i: S-almidón, PVA- alcohol polivinílico, GLI-glicerol, C-carvacrol)

Formulación	X _S	X _{PVA}	X _{GLI}	X _C
100PVA:0S		2,5		
100PVA:0S- C ₄₀		2,5		1
75PVA:25S- C ₄₀	0,625	1,875	0,156	0,75
50PVA:50S- C ₄₀	1,250	1,25	0,312	0,5
50PVA:50S- C ₈₀	1,250	1,25	0,312	1

La preparación de las disoluciones formadoras de recubrimiento (DFR) se realizó por emulsificación directa. La dispersión de almidón se llevó a cabo en agua destilada al 2,5 % (p/p) y se mantuvo a 95 °C durante 30 min para inducir la gelatinización. De manera paralela, el PVA se dispersó en agua destilada al 2,5 % (p/p) y se mantuvo a 90 °C durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo se dejaron enfriar las dispersiones hasta temperatura ambiente. A la dispersión de almidón se incorporó directamente glicerol en relación polímero:glicerol 1:0,25. Se adicionó carvacrol a la dispersión de PVA y las dispersiones se homogeneizaron durante 4 min a 12500 rpm, con ayuda de un homogeinizador Ultraturrax (Yellow Line Model DI 25 basic,

IKA, Staufen, Alemania). Posteriormente se realizaron las mezclas en las diferentes proporciones, y se mantuvo en agitación magnética suavemente durante 1 h. Las dispersiones se desgasificaron utilizando una bomba a vacío (MZ 2C NT, Vacuubrand GMBH + CO KG, Wertheim, Alemania) y se dejaron reposar cubiertas con papel de plata y parafilm hasta el día siguiente debido a que la presencia de espuma dificultaba su aplicación.

COMPORTAMIENTO REOLÓGICO

El comportamiento reológico de las DFR se analizó por triplicado a 25°C con un reómetro rotatorio (HAAKE Rheostress 1, Thermo Electric Corporation, Karlsruhe, Alemania) equipado de un sensor de cilindros coaxiales (Z34DIN Ti). Las curvas de flujo se obtuvieron después de un tiempo de estabilización de 5 min del sensor a 25 °C. El esfuerzo cortante (σ) se midió en función del gradiente de velocidad ($\dot{\gamma}$) de 0 a 500 s⁻¹, con el objetivo de determinar el índice de consistencia (K) y el índice de comportamiento al flujo (n), aplicando el ajuste al modelo de Otswald de Waele. Adicionalmente se determinó el valor de la viscosidad aparente (η) de las dispersiones a 500 s⁻¹ (ecuaciones 1 y 2).

$$\sigma = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (1)$$

$$\eta = \frac{\sigma(\dot{\gamma})}{\dot{\gamma}} \quad (2)$$

Dónde: σ = esfuerzo cortante (Pa); K = índice de consistencia (Pa·s)ⁿ; $\dot{\gamma}$ = gradiente de velocidad (s⁻¹); n = índice de comportamiento al flujo y η = viscosidad aparente (Pa·s).

Aplicación de los recubrimientos y caracterización de parámetros de calidad y estabilidad para la conservación de manzanas

Los recubrimientos se aplicaron a manzanas (*Malus domestica* Borkh cv. *Golden delicious*), adquiridas en un mercado de Valencia, y fueron seleccionadas por inspección visual de acuerdo a su color, tamaño, firmeza y ausencia de daños físicos superficiales. Para la aplicación del recubrimiento las manzanas fueron previamente lavadas con una solución de hipoclorito de sodio 1%, enjuagadas con agua desionizada y secadas a temperatura ambiente. Los recubrimientos fueron aplicados manualmente por inmersión de la fruta en cada DFR durante 3 segundos, comprobando que se había realizado de manera efectiva, y se dejaron secar 24 horas. Las manzanas se pesaron antes y después de la aplicación del recubrimiento. Las frutas permanecieron almacenadas en condiciones ambientales (25 °C y 55% HR), durante 14 días. Se utilizaron 5 frutas sin recubrimiento (control) y 5 frutas por formulación.

Tras la aplicación de los recubrimientos se realizaron las siguientes determinaciones:

DENSIDAD SUPERFICIAL DE SÓLIDOS

La densidad superficial de sólidos (DSS) aplicados en cada manzana recubierta se determinó aplicando la ecuación (3) según (Marín et al., 2017), por diferencia de masa antes y después de la aplicación del recubrimiento, utilizando una balanza de precisión (Kern PFB 120-3, Alemania):

$$DSS = \frac{(m_R - m_0) \cdot X_{sDFR}}{m_0} \cdot \rho_m \cdot \frac{1}{S_e} \quad (3)$$

Dónde: m_R = masa de la manzana recubierta; m_0 = masa de la manzana sin recubrir, X_{sDFR} = fracción másica de sólidos de la DFR (g sólidos/g disolución); ρ_m = densidad de la manzana (g/m^3). Para la obtención de la superficie específica ($S_e=6/d$, m^2 superficie/ m^3 manzana), se calculó el diámetro promedio (d) de la manzana asimilando su volumen al de una esfera, determinando su peso y densidad.

PÉRDIDA DE MASA

El control de la pérdida de peso de las manzanas una vez seco el recubrimiento se llevó a cabo utilizando una balanza analítica (ME235P Sartorius, Alemania) a diferentes tiempos de almacenamiento (3, 7 y 14 días). Para cada una de las formulaciones se utilizaron 5 manzanas recubiertas, y además, 5 manzanas sin recubrir (control). La pérdida de masa (g) se refirió a la masa inicial de la fruta, y finalmente los resultados se expresaron como la velocidad de pérdida de peso (días^{-1}), que se obtuvo a partir de la pendiente de la recta lineal ajustada de los datos de pérdida de peso relativa en función del tiempo.

TASA RESPIRATORIA

La tasa respiratoria de las manzanas en términos de consumo de O_2 y producción de CO_2 (expresada en $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ de O_2 y CO_2), se determinó mediante el equipo CheckMate 9900 PBI Dansensor, (Ringsted, Dinamarca). Se analizaron 4 manzanas recubiertas por formulación introducidas de dos en dos en frascos herméticos y se realizaron medidas de la concentración de gases en el espacio de cabeza a intervalos de 30 minutos durante 4 horas a diferentes tiempos de almacenamiento de las frutas: 3, 7 y 14 días. El mismo procedimiento se ejecutó a 4 manzanas no recubiertas (control), tanto al inicio como a los 14 días de almacenamiento. La velocidad de respiración de las manzanas en términos de consumo de O_2 y producción de CO_2 se determinó a partir de la pendiente de la ecuación lineal ajustada (ecuación (4)).

$$y_{it} = y_{i0} \pm 100 \cdot R_i \cdot \frac{M}{V} \cdot t \quad (4)$$

Dónde: y_{it} = concentración de gas a tiempo t ; y_{i0} = concentración de gas inicial; R_i = velocidad de respiración ($\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$); M = masa de las muestras (kg); V = volumen del espacio de cabeza (mL); t = tiempo.

También se determinó el cociente de respiración (CR), expresado como la relación entre la producción de CO_2 y el consumo de O_2 .

FIRMEZA

Se determinó la firmeza de las manzanas con una prensa universal (Stable Micro Systems, TA.XT plus, Haslemere, England), mediante un ensayo de punción sobre la fruta sin piel, tal como describe Saei et al., (2011), con algunas modificaciones. Se realizaron las mediciones en la fruta entera, colocada sobre un anillo para mantenerla estable, en cuatro puntos diferentes de la zona ecuatorial de la manzana con un punzón de 11 mm de diámetro, a una velocidad de $10 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$ y penetración total de 10 mm. Las medidas se realizaron en cinco manzanas control (no recubiertas) tanto al inicio como a los 14 días de almacenamiento, y también a cinco manzanas por formulación, después de 14 días desde la aplicación del recubrimiento. La fuerza máxima (N) de ruptura de cada muestra ($F_{\text{máx}}$), así como la distancia (mm) correspondiente a la fuerza de fractura ($d_{\text{máx}}$) fueron registradas.

Efectividad antifúngica *in vivo* de los recubrimientos aplicados en manzanas

El estudio de la actividad antifúngica *in vivo* de los recubrimientos se realizó frente a *Botrytis cinerea*. Para ello, el hongo fue inoculado en tubos de ensayo de Agar Patata Dextrosa (PDA) e incubado a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta la esporulación (7 días). La suspensión de esporas se preparó añadiendo aproximadamente 10 mL de suero fisiológico (0,7% p/p de NaCl y 0,01% p/p de Tween 85) a los tubos, y las esporas se rasparon del agar usando un asa estéril, se contaron en una cámara de recuento y, finalmente, la suspensión se ajustó a una concentración de $3\cdot 10^4$ esporas/mL.

Las manzanas se inocularon con 100 μL de la suspensión de esporas, realizando una incisión de 2 mm de profundidad por fruto, 24 h antes de la aplicación de los recubrimientos (utilizando el mismo método de aplicación empleado inicialmente). Las muestras se secaron por convección natural y posteriormente se almacenaron en bandejas de plástico perforadas, donde no entraran en contacto directo entre ellas, a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y 55% HR. Se utilizaron 12 frutas por serie (con y sin recubrimiento). Los diámetros de lesión (mm) se midieron durante los días 2, 5, 7, 9 y 12 de incubación posteriores, reflejando la gravedad de la enfermedad.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron tratados estadísticamente mediante el análisis de varianza (ANOVA), empleando Statgraphics Centurion XVI.II para Windows (Manugistics Corp., Rockville, Md).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de las dispersiones formadoras de recubrimiento

La Figura 1 muestra las curvas de flujo obtenidas experimentalmente para las distintas dispersiones, y se puede observar que todas las formulaciones presentaron inicialmente un comportamiento newtoniano y a partir de un cierto gradiente de velocidad, se volvieron dilatantes. Este efecto puede atribuirse a que el gradiente de velocidad provocó un aumento en la fricción molecular y en consecuencia se produjeron cambios estructurales en la forma de organizarse las moléculas, variando su comportamiento y aumentando el valor de la viscosidad. Se puede observar que la incorporación de mayor concentración de carvacrol aumentó el rango en el que se mantiene el régimen newtoniano, siendo entonces la viscosidad constante en un rango de gradientes de velocidad más amplio.

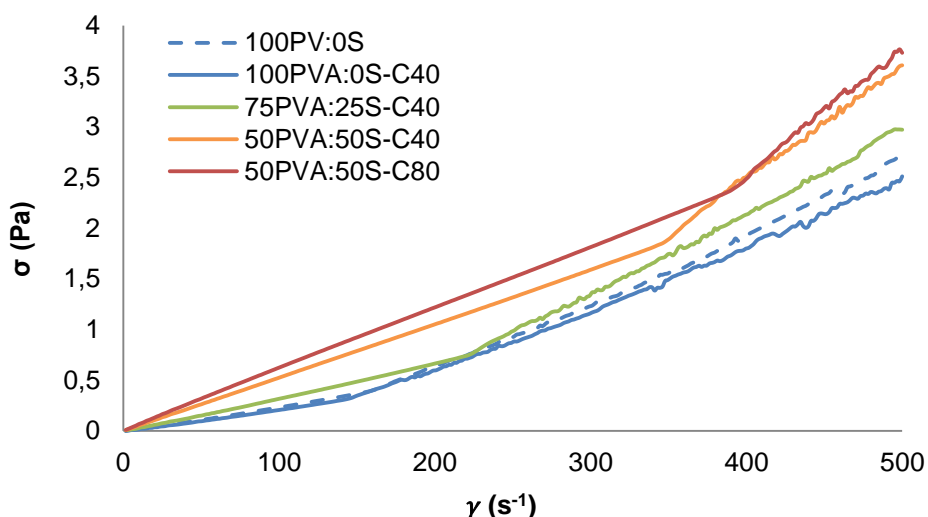


FIGURA 1. Curvas de flujo típicas, a 25°C, de las diferentes formulaciones con carvacrol (—) y sin carvacrol (---).

La Tabla 2 muestra los valores de la viscosidad en los distintos tramos, el gradiente donde ocurre el cambio de comportamiento, los parámetros del ajuste al modelo de Otswald de Waele y la viscosidad aparente a 500 s⁻¹ para el fluido dilatante. En el tramo newtoniano, la viscosidad de las DFR aumentó significativamente ($p < 0.05$) con el aumento del contenido en almidón y carvacrol. A mayores gradientes de velocidad (en el tramo dilatante), se observaron diferencias significativas en los valores de n de las distintas formulaciones, en todos los casos superiores a 1. Las DFR se volvieron significativamente menos newtonianas (y más dilatantes), con menores valores del parámetro K , con el aumento de la concentración de almidón y carvacrol. Además, la incorporación de carvacrol al PVA puro, disminuyó significativamente ($p < 0.05$) la viscosidad de la formulación.

TABLA 2. Parámetros reológicos (tramo newtoniano: viscosidad μ ; gradiente donde ocurre el cambio reológico γ ; tramo dilatante: índice de comportamiento al flujo n , índice de consistencia K y viscosidad aparente a 500 s^{-1} η_{ap}) de las diferentes DFR. Valores medios y desviación estándar.

Muestra	Comportamiento				
	Newtoniano		Dilatante		
	$\mu \cdot 10^{-3} \text{ (Pa}\cdot\text{s)}$	$\gamma \text{ (s}^{-1}\text{)}$	n	$K \cdot 10^{-3} \text{ (Pa}\cdot\text{s)}^n$	$\eta_{ap} \cdot 10^{-3} \text{ a } 500 \text{ s}^{-1} \text{ (Pa}\cdot\text{s)}$
100PVA:0S	2,92 (0,12) ^a	151	1,500 (0,016) ^a	0,24 (0,02) ^c	5,34 (0,06) ^b
100PVA:0S-C ₄₀	2,89 (0,09) ^a	151	1,588 (0,004) ^b	0,133 (0,003) ^b	5,151 (0,002) ^a
75PVA:25S-C ₄₀	3,51 (0,02) ^b	219	1,636 (0,005) ^c	0,118 (0,003) ^b	6,11 (0,02) ^c
50PVA:50S-C ₄₀	5,33 (0,05) ^c	350	1,738 (0,003) ^d	0,074 (0,002) ^a	7,290 (0,003) ^d
50PVA:50S-C ₈₀	6,04 (0,04) ^d	396	1,81 (0,03) ^e	0,0485 (0,1112) ^a	7,57 (0,03) ^e

Diferentes letras (a-e) en la misma columna indican diferencias significativas entre las distintas formulaciones, con un intervalo de confianza del 95%.

Aplicación de los recubrimientos en manzanas

La Tabla 3 recoge los resultados de la densidad superficial de sólidos (DSS) aplicados sobre la superficie de las manzanas con las diferentes DFR, la velocidad de pérdida de peso, los parámetros de firmeza y la tasa respiratoria de cada una de las muestras analizadas, a dos tiempos distintos.

Los valores de la DSS son indicadores del espesor del recubrimiento en la fruta, así que cuanto mayor sea la DSS mayor espesor tendrá el recubrimiento. El valor de la DSS depende de la cantidad de recubrimiento que se adhiere a la superficie de la fruta y del contenido total de sólidos de la formulación, y se ve muy afectado por la humectabilidad y extensibilidad, además de la viscosidad de las formulaciones.

Cabe destacar que los valores obtenidos fueron bastante bajos, en comparación con el trabajo de Sapper et al., 2019. Sin embargo, las formulaciones 50PVA:50S-C₄₀ y 50PVA:50S-C₈₀ presentaron valores significativamente mayores respecto al resto de dispersiones. Esto puede ser explicado por la mayor viscosidad de estas formulaciones a bajos gradientes de velocidad. El contenido de almidón y carvacrol en las DFR influye en la cantidad de sólidos adheridos, ya que está relacionado con una mayor viscosidad de las dispersiones (el drenaje ocurre a bajos gradientes de velocidad, del orden de 10^{-1} s^{-1} (Steffe, 1996)) y produce la limitación en el drenaje gravitacional de las dispersiones en el momento del secado del recubrimiento.

Por otro lado, no se observó efecto de los recubrimientos ($p > 0.05$) en la velocidad de pérdida de masa de las muestras a los 14 días de almacenamiento, seguramente por la poca cantidad adherida, que limita su efectividad.

En cuanto a las propiedades mecánicas, los valores de firmeza ($F_{\text{máx}}$) y distancia en el punto de fractura ($dm_{\text{máx}}$) a tiempo cero en las manzanas control fueron 29(3) N y 2,9(0,4) mm, respectivamente. Tras dos semanas, la distancia aumentó en todas las formulaciones respecto al valor inicial,

indicando el aumento en la deformidad del tejido con el tiempo, asociado a la pérdida de turgor celular por la deshidratación superficial de las muestras. No se observaron diferencias significativas en cuanto al parámetro firmeza entre los distintos tratamientos al cabo de 2 semanas de almacenamiento. Por otro lado, la mayor distancia de penetración requerida hasta alcanzar la fuerza máxima de fractura se observó en la dispersión 100PVA:0S-C₄₀ y la menor, en la dispersión 50PVA:50S-C₈₀, aunque en ningún caso fueron diferentes significativamente del control.

El efecto de los recubrimientos en la tasa de respiración de las manzanas (control y recubiertas) a los 3 y 14 días se muestra en la Tabla 3. Los recubrimientos pueden servir como barrera a los gases, lo que reduciría las tasas de respiración (Conforti et al., 2007), debido a un bloqueo de los poros de la superficie. La menor tasa de respiración está asociada al menor intercambio de gases y por tanto, menor disponibilidad de oxígeno para respirar. Sin embargo, el grado de modificación de la atmósfera interna de la fruta depende del tipo de material utilizado, de su homogeneidad y su espesor, entre otros (Smith et al., 1987). En general se observó una disminución en el consumo de oxígeno y producción de CO₂ en las muestras recubiertas, aunque la gran variabilidad encontrada hizo que esta disminución no fuera significativa en la mayoría de los casos, a pesar de que este tipo de recubrimientos presentan una alta barrera al oxígeno (Miller y Krotcha, 1997). Esta variabilidad puede ser consecuencia de nuevo, de la poca cantidad de material depositado en la superficie (Banks et al., 1993) o de la falta de una completa cobertura de la fruta una vez se seca el recubrimiento.

La tasa de respiración de oxígeno y de dióxido de carbono del control se mantuvo constante tras 14 días y en las muestras recubiertas, osciló a lo largo del tiempo ensayado sin una tendencia clara.

El cociente respiratorio (CR) es la proporción de CO₂ producido por O₂ consumido por el producto y su valor oscila entre 0.7-1.3 en la respiración aeróbica dependiendo del sustrato metabólico (Kader et al., 1989). En general, dicho cociente respiratorio no cambió a lo largo del tiempo, lo que muestra que no existieron cambios en las rutas metabólicas durante el tiempo de análisis. Tampoco se encontraron diferencias significativas en cuanto al CR de los diferentes tratamientos, excepto para una de las formulaciones con mayor contenido en carvacrol (100PVA:0S-C₄₀), que fue algo mayor.

En general se puede concluir que la aplicación de los recubrimientos activos con carvacrol ensayados no tuvo un efecto destacable sobre la fisiología metabólica de la manzana.

TABLA 3. Densidad superficial de sólidos DSS, velocidad de pérdida de masa relativa al peso inicial (día^{-1}), velocidad de consumo de O_2 y de producción de CO_2 ($\text{mL/kg}\cdot\text{h}$), cociente de respiración (CR) y valores de fuerza máxima de ruptura y distancia en el punto de fractura (dmáx) en el punto del máximo tras dos semanas de almacenamiento, de las manzanas recubiertas con diferentes dispersiones y sin recubrir (control). Los valores de los parámetros mecánicos a tiempo cero en las manzanas control fueron $F_{\text{máx}}$ inicial: 29 (3), dmáx inicial: 2,9 (0,4).

	Muestras					
	Control	100PVA:0S	100PVA:0S-C ₄₀	75PVA:25S-C ₄₀	50PVA:50S-C ₄₀	50PVA:50S-C ₈₀
DSS (g/m^2)	-	0,352 (0,112) ^a	0,30 (0,07) ^a	0,22 (0,08) ^a	0,49 (0,13) ^b	0,53 (0,09) ^b
V pérdida de masa (días^{-1})	-0,34 (0,08) ^a	-0,32 (0,12) ^a	-0,295 (0,012) ^a	-0,33 (0,07) ^a	-0,34 (0,05) ^a	-0,35 (0,05) ^a
F_{máx} (N)	31 (3) ^a	33 (7) ^a	32 (4) ^a	34 (4) ^a	32 (4) ^a	29 (3) ^a
dmáx (mm)	3,9 (0,2) ^{bc}	4,0 (1,3) ^{bc}	4,4 (0,2) ^c	3,9 (0,6) ^{bc}	3,7 (0,5) ^{bc}	3,5 (0,4) ^{ab}
V consumo de O₂ (mL/kg h) t=3	11 (5) ^{ab}	6 (5) ^a	4,8 (1,5) ^a	11,9 (0,6) ^{ab}	9 (4) ^{ab}	15 (2) ^b
V producción CO₂ (mL/kg h) t=3	16 (4) ^b	6,6 (0,9) ^a	11,9 (1,4) ^b	13 (3) ^{ab}	12 (6) ^{ab}	14,5 (1,9) ^b
CR t=3	1,4 (0,5) ^a	0,8 (0,5) ^a	1,8 (0,3) ^a	1,358 (0,003) ^a	1,8 (0,6) ^a	1,26 (0,03) ^a
V consumo de O₂ (mL/kg h) t=14	11 (3) ^{bc}	6 (0,5) ^a	6,7 (1,2) ^{ab}	13 (3) ^c	12 (5) ^{bc}	10,5 (0,8) ^{bc}
V producción CO₂ (mL/kg h) t=14	16 (10) ^{bc}	3 (4) ^a	9,7 (1,4) ^b	16,2 (0,8) ^{bc}	10 (3) ^b	19 (2) ^c
CR t=14	1,46 (0,13) ^{bc}	1,11 (0,07) ^a	1,708 (0,107) ^c	1,308 (0,097) ^{ab}	1,435 (0,102) ^b	1,38 (0,07) ^b

Diferentes letras (a-c) en la misma fila indican diferencias significativas entre las distintas formulaciones al 95%.

Análisis del efecto antifúngico in vivo de los recubrimientos

Numerosos estudios previos han demostrado que la aplicación de recubrimientos con incorporación de aceites esenciales contribuyó al control de diversas enfermedades causadas por patógenos en el almacenamiento poscosecha de fruta (entre ellos *Botrytis cinerea*) por un efecto sinérgico de estos compuestos (Campos-Requena et al., 2017; Grande-Tovar et al., 2018; Perdonés et al., 2012). Se puede observar una amplia variabilidad en la eficacia del control de la enfermedad, básicamente debida a numerosos factores que pueden influir en las propiedades antifúngicas de los recubrimientos. Entre los factores más importantes se pueden citar los siguientes: la naturaleza de la matriz del recubrimiento; el tipo y la concentración de los compuestos antifúngicos; las especies y las cepas de patógenos poscosecha objetivo; la especie, cultivar y condición física y fisiológica de la fruta hospedadora y las condiciones ambientales poscosecha.

La Tabla 4 recoge los valores del diámetro de lesión (mm) de la fruta que indican la severidad de la inoculación de *Botrytis cinerea*. No se observaron diferencias significativas entre las muestras control y las recubiertas con PVA sin carvacrol. En cambio, en las formulaciones con carvacrol el crecimiento del hongo fue significativamente menor que en el control, especialmente en las formulaciones con mayor contenido en carvacrol (100PVA:0S-C₄₀ y 50PVA-50S-C₈₀), que fueron más efectivas y redujeron la severidad del moho gris. Para una mejor observación de los resultados, se han representado en la Figura 2 los valores del porcentaje de reducción de la severidad causada por el hongo gris *Botrytis cinerea* en las manzanas recubiertas respecto a las manzanas control tras 2, 5, 7, 9 y 12 días de almacenamiento. De nuevo puede observarse que la presencia de carvacrol en el recubrimiento afecta de forma importante al grado de inhibición del crecimiento del hongo, siendo mayor a medida que aumenta la cantidad de aceite esencial y disminuye la de almidón. En este sentido parece que la formulación 100PVA:0S-C₄₀ es la que presenta mayor potencial antifúngico durante todo el tiempo de almacenamiento ensayado, si bien a partir del 9º día el porcentaje de reducción de la severidad también fue mayor en la otra formulación con mayor contenido en carvacrol (50PVA:50S:C₈₀). También es posible observar cómo el efecto antifúngico va disminuyendo con el tiempo de almacenamiento, debido probablemente al carácter volátil del aceite.

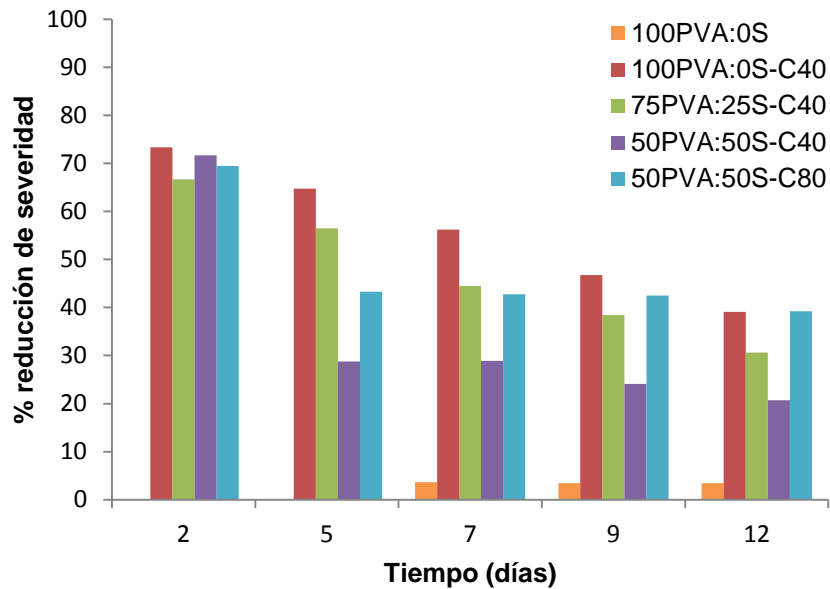


FIGURA 2. Porcentaje de reducción de la severidad producida por el hongo *Botrytis cinerea* en manzanas recubiertas con respecto al control tras 2, 5, 7, 9 y 12 días de almacenamiento.

La evolución del crecimiento del hongo después de la inoculación artificial en manzanas sin recubrimiento (control) y en manzanas recubiertas a diferentes tiempos de almacenamiento (2, 5, 7, 9 y 12 días) se muestra en la Figura 3. Se puede observar un avance del crecimiento del hongo a lo largo del tiempo en todos los casos, pero de manera mucho más acusada en las muestras control no recubiertas. Este resultado refleja la efectividad del carvacrol como agente antifúngico incorporado en esta matriz polimérica. Las interacciones de los recubrimientos y sus componentes con la superficie de la fruta constituyen un factor distintivo para definir el comportamiento particular de la fruta recubierta (Basiak et al, 2019), y en el caso de los recubrimientos formulados con ingredientes antifúngicos, estas interacciones pueden afectar a la capacidad de control de las enfermedades *in vivo* del recubrimiento (Valencia-Chamorro et al, 2011).

TABLA 4. Diámetro de lesión tras 2, 5, 7, 9 y 12 días de almacenamiento de las manzanas recubiertas con diferentes dispersiones y sin recubrir (control).

	Muestras					
	Control	100PVA:0S	100PVA:0S-C ₄₀	75PVA:25S-C ₄₀	50PVA:50S-C ₄₀	50PVA:50S-C ₈₀
Día 2	7,50 (5,09) ^b	8 (4) ^b	2 (2) ^a	3 (3) ^a	2 (4) ^a	2 (4) ^a
Día 5	42 (13) ^{cd}	44 (4) ^d	15 (17) ^a	18 (19) ^{ab}	30 (17) ^{bc}	24 (19) ^{ab}
Día 7	65 (7) ^d	63 (6) ^{cd}	29 (26) ^a	36 (24) ^{ab}	46 (23) ^{bc}	37 (25) ^{ab}
Día 9	84 (9) ^b	81 (9) ^b	45 (32) ^a	52 (29) ^a	64 (28) ^{ab}	48 (31) ^a
Día 12	100 (10) ^b	97 (15) ^b	61 (39) ^a	70 (35) ^a	80 (34) ^{ab}	61 (34) ^a

Diferentes letras (a-d) en la misma fila indican diferencias significativas entre las distintas formulaciones, con un intervalo de confianza del 95 %.

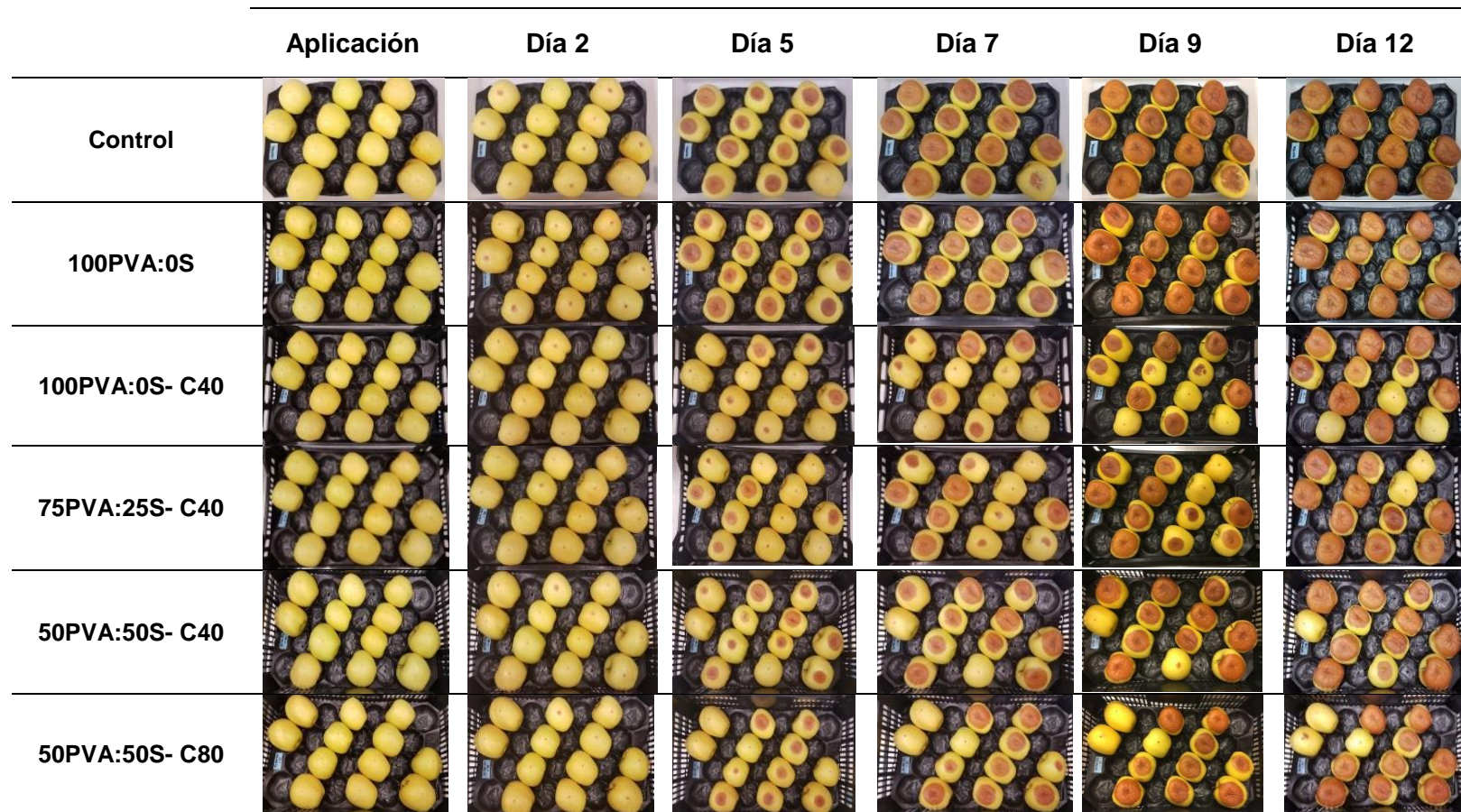


FIGURA 3. Avance del crecimiento interno de *Botrytis cinerea* después de la inoculación en manzanas sin recubrimiento (control) y con recubrimientos de las diferentes dispersiones tras 2, 5, 7, 9 y 12 días de almacenamiento.

CONCLUSIONES

La aplicación de recubrimientos a base de PVA, almidón y carvacrol a manzanas *Golden delicious* no supuso cambios notables en las pérdidas de peso, velocidad de respiración o propiedades mecánicas de la fruta, seguramente debido a su baja viscosidad, que dio lugar a una baja densidad superficial de sólidos de los recubrimientos utilizados. Sin embargo, su aplicación fue muy efectiva contra el crecimiento de *Botrytis cinerea*, especialmente en las formulaciones con mayor contenido en carvacrol (100PVA:0S-C₄₀ y 50PVA:50S-C₈₀), reduciendo significativamente la severidad de la infección. Investigaciones futuras se centrarán en el estudio del impacto sensorial de los recubrimientos sobre la fruta.

REFERENCIAS

- Alves-Silva, J. M.; Dias dos Santos, S. M.; Pintado, M. E.; Pérez-Álvarez, J. A.; Fernández-López, J.; Viuda-Martos, M. 2013. Chemical Composition and In Vitro Antimicrobial, Antifungal and Antioxidant Properties of Essential Oils Obtained From some Herbs Widely Used in Portugal. *Food Control*, 32(2):371-378.
- Atarés, L.; Chiralt, A. 2016. Essential Oils as Additives in Biodegradable Films and Coatings for Active Food Packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 48, 51-62.
- Banksa, N.H; Dadzie, B.K.; Cleland D.J. 1993. Reducing Gas Exchange of Fruits with Surface Coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 3(3): 269-284.
- Basiak, E., Linke, M.; Debeaufort, F.; Lenart, A.; Geyer, M. 2019. Dynamic behaviour of Starch -Based Coatings on Fruit Surfaces. *Postharvest Biology and Technology*, 147, 166-173.
- Batta Y.A. 2004. Postharvest Biological Control of Apple Gray Mold by *Trichoderma harzianum* Rifai Formulated in an Invert Emulsion. *Crop Protection*, 23(1):19–26.
- Bonilla, J.; Fortunati, E.; Atarés, M.; Chiralt, A.; Kenny, J.M. 2014. Physical, Structural and Antimicrobial Properties of Poly vinyl alcohol– chitosan Biodegradable Films. *Journal Food Hydrocolloids*, 35, 463-470.
- Bonilla, J.; Talón, E.; Atarés, L.; Vargas, M.; Chiralt, A. 2013. Effect of the Incorporation of Antioxidants on Physicochemical and Antioxidant Properties of Wheat Starch–Chitosan Films. *Journal of Food Engineering*, 118, 271-278.
- Campos-Requena, V.H.; Rivas, B.L.; Pérez, M.A.; Figueroa, C.R.; Figueroa, N.E.; Sanfuentes, E.A. 2017. Thermoplastic Starch/Clay Nanocomposites Loaded with Essential Oil Constituents as Packaging for Strawberries- In Vivo Antimicrobial Synergy over *Botrytis Cinerea*. *Postharvest Biology and Technology*, 129, 29–36.
- Castillo, S.; Navarro, D.; Zapata, P.J.; Guillen, F.; Valero, D.; Serrano M.; Martínez-Romero D. 2010. Antifungal Efficacy of Aloe Vera In Vitro and its Use as a Preharvest Treatment to Maintain Postharvest Table Grape Quality. *Postharvest Biology and Technology*, 57,183-188.
- Conforti, F.D.; Jocelyn, A.; 2007. Effect of ThreeLlipid/hydrocolloid Coatings on Shelf Life Stability of Golden Delicious Apples. *Journal of Food Science and Technology*, 42, 1101–1106.
- Grande-Tovar, C.D; Chaves-López, C.; Serio, A.; Rossi, C.; Paparella, A. 2018. Chitosan Coatings Enriched with Essential Oils: Effects on Fungi Involved in Fruit Decay and Mechanisms of Action. *Trends in Food Science and Technology*, 78, 61-71.
- Gupta, V.K.; Priya, B.; Pathania, D.; Singh, A. 2014. Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Biodegradables Starch/PVA Composite Films Reinforced with Cellulosic Fibre. *Carbohydrate Polymers*, 109, 171-179.

- Hulin, V.; Mathot, A.G.; Mafart, P.; Dufosse, L. 1998. Antimicrobial properties of essential oils and flavour compounds. *Sciences des Aliments*, 18, 563-582.
- Kader, A.A.; Zagory, D.; Kerbel, E.L. 1989. Modified Atmosphere Packaging of Fruits and Vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28(1): 1–30.
- Lu, D.R.; Xiao, C.M.; Xu, S.J. 2009. Starch-based Completely Biodegradable Polymer Materials. *Express Polymers*, 3, 366–375.
- Marín, A.; Atarés, L.; Cháfer, M.; Chiralt, A. 2017. Properties of Biopolymer Dispersions and Films Used as Carriers of the Biocontrol agent *Candida sake* CPA-1. *LWT-Food Science and Technology*, 79, 60–69.
- Miller, K.S.; Krochta, J.M. 1997. Oxygen and Aroma Barrier Properties of Edible Films: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 228-237.
- Ortega-Toro, R.; Collazo-Bigliardi, S.; Roselló, J.; Santamarina, P.; Chiralt, A. 2017. Antifungal Starch-Based Edible Films Containing Aloe Vera. *Food Hydrocolloids*, 72, 1-10.
- Ortega-Toro, R.; Jiménez, A.; Talens, P.; Chiralt, A. 2014. Properties of Starch–Hydroxypropyl Methylcellulose Based Films Obtained by Compression Molding. *Carbohydrate Polymers*, 109, 155-165.
- Palacín, J.R. 2012. Efectos de Recubrimientos de Almidón de Yuca, Ácido Ascórbico, N-acetil-cisteína en la Calidad del Plátano (*Musa paradisiaca*). M.Sc. Tesis, Departamento en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Nacional de Colombia.
- Palou L.; Valencia-Chamorro, S.; Pérez-Gago, M. 2015. Antifungal Edible Coatings for Fresh Citrus Fruit: A review. *Coatings*, 5, 962–986.
- Palou, L.; Ali, A.; Fallik, E.; Romanazzi, G. 2016. GRAS, Plant-and Animal-Derived Compounds as Alternatives to Conventional Fungicides for the Control of Postharvest Diseases of Fresh Horticultural Produce. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 41–52.
- Perdones, A.; Sánchez-González, L.; Chiralt, A.; Vargas, M. 2012. Effect of Chitosan-Lemon Essential Oil Coatings on Storage-Keeping Quality of Strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 70, 32-41.
- Romanazzi, G.; Feliziani, E. 2014. Botrytis cinerea (Gray Mold). *Postharvest Decay: Control Strategies*, 4, 131-146.
- Saei, A.; Tustin, D.S.; Zamani, Z.; Talaie, A.; Hall, A.J. 2011. Cropping Effects on the Loss of Apple Fruit Firmness during Storage: the Relationship Between Texture Retention and Fruit Dry Matter Concentration. *Scientia Horticulturae*, 130, 256–265.
- Sapper, M.; Chiralt, A. 2018. Starch-Based Coatings for Preservation of Fruits and Vegetables. *Coatings*, 8(5): 152
- Sapper, M.; Palou L.; Pérez-Gago, M.B.; Chiralt, A. 2019. Antifungal Starch–Gellan Edible Coatings with Thyme Essential Oil for the Postharvest Preservation of Apple and Persimmon. *Coatings*, 9(5):333.
- Singh D.; Sharma, R.R. 2018. Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables and Their Management *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables*, 1, 1-52.
- Smith, S.; Geeson, J.; Stow, J. 1987. Production of Modified Atmospheres in Deciduous Fruits by the Use of Films and Coatings. *HortScience*, 22(5): 772.
- Steffe, J.F. 1996. Rheological methods in Food Process Engineering. 2nd edition, *Freeman Press*, Michigan, USA.
- Teixeira, E.M.; Pasquini, D.; Curvelo, A.A.S.; Corradini, E.; Belgacem, M.N.; Dufresne, A. 2009. Cassava Bagasses Cellulose Nanofibrils Reinforced Thermoplastic Cassava Starch. *Carbohydrate Polymers*, 78 (3), 422–431.
- Troncoso-Rojas, R.; Tiznado-Hernández, M.E. 2014. *Alternaria alternate* (Black Rot, Black Spot). *Postharvest Decay: Control Strategies*, 5, 147-187.
- Valencia-Chamorro, S.A.; Palou, L.; del Río, M.A.; Pérez-Gago, M.B. 2011. Antimicrobial Edible Films and Coatings for Fresh and Minimally Processed Fruits and Vegetables: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(9):872-900.
- Vargas, M.; Pastor, C.; Chiralt, A.; McClements, D.J.; Gonzalez-Martinez, C. 2008. Recent Advances in Edible Coatings for Fresh and Minimally Processed Fruits. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(6):496-511.
- Viuda-Martos, M.; El Gendy, N.G.S.; Sendra, E.; Fernández-López, J.; El-Razik, K.A.A.; El-Sayed, A.; Pérez-Álvarez, J.A. 2010. Chemical Composition and Antioxidant and Anti-

listeria Activities of Essential Oils Obtained from some Egyptian Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9063-9070.