

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

***EFECTO DE LA APLICACIÓN DE  
RECUBRIMIENTOS  
ANTIFUNGICOS CON CARVACROL  
SOBRE LA VIDA UTIL Y LA  
CALIDAD SENSORIAL DE  
MANZANAS GOLDEN DELICIOUS***

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

ALUMNO/A: Elena Rodríguez Yesares

TUTORES ACADEMICOS:

Chelo González Martínez

M<sup>a</sup> Eugenia Martín Esparza

COTUTOR/A :

DIRECTOR EXPERIMENTAL:

Mayra Sapper

*Curso Académico:2019-2020*

**VALENCIA, 11 de septiembre de 2020**

# **EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTOS ANTIFUNGICOS CON CARVACROL SOBRE LA VIDA UTIL Y LA CALIDAD SENSORIAL DE MANZANAS GOLDEN DELICIOUS**

Elena Rodríguez Yesares, Mayra Sapper, Eugenia Martín Esparza<sup>1</sup>, Consuelo González Martínez<sup>1</sup>

## **RESUMEN**

En el presente trabajo se han estudiado diferentes formulaciones de recubrimientos elaborados a base de alcohol polivinílico (PVA) y almidón de patata (S) con la incorporación de carvacrol (C) que proporciona la acción antifúngica al recubrimiento. Se evaluó la retención de carvacrol por el recubrimiento y la densidad de sólidos en superficie. También se evaluó su efectividad antifúngica durante el almacenamiento poscosecha de manzanas *Golden Delicious* inoculadas con *Penicillium expansum* y la aceptación por los consumidores a través de catas sensoriales. Su aplicación fue muy efectiva contra el crecimiento de *Penicillium expansum*, al reducir significativamente la incidencia y severidad del hongo, especialmente aquellas formuladas con mayor proporción de almidón y carvacrol (50PVA:50S-C<sub>40</sub> y 50PVA:50S-C<sub>80</sub>). Sin embargo, los resultados del análisis sensorial pusieron de manifiesto el impacto negativo del carvacrol sobre el aroma y sabor de las manzanas, incluso tras el lavado y el pelado de la fruta.

**PALABRAS CLAVE:** almidón, PVA, carvacrol, recubrimiento, manzanas, *Penicillium expansum*, antifúngico.

## **RESUM**

Al present treball s'han estudiat diferents formulacions de recobriments elaborats amb base d'alcohol polivinílic (PVA) i midó de creïlla (S) amb l'incorporació de carvacrol (C) que proporciona l'acció antifúngica al recobriment. Es va avaluar la retenció de carvacrol pel recobriment i la densitat de sòlids en superfície i la seua l'efectivitat antifúngica sobre l'emmagatzemament postcollita de les pomes *Golden Delicious* inoculades amb *Penicillium expansum*. A més, l'acceptació pels consumidors a través d'anàlisis sensorials també fou estudiada. Els resultats mostraren que la aplicació del recobriments amb carvacrol van ser molt efectives contra el

creixement de *Penicillium expansum*, al reduir significativament la incidència i severitat del fong, especialment en aquelles formulades amb major proporció de midó i carvacrol (50PVA:50S-C<sub>40</sub> i 50PVA:50S-C<sub>80</sub>). No obstant això, els resultats de l'anàlisi sensorial mostraren un possible rebuig dels consumidors a estos recobriments, donada la baixa acceptació de l'aroma i el sabor del producte tractat, inclús després del llavat i el pelat de la fruita recoberta.

PARAULES CLAU: midó, PVA, carvacrol, recobriments, pomes, *Penicillium expansum*, antifúngic.

## ABSTRACT

In this work, different coatings based on polyvinyl alcohol (PVA) and potato starch (S) have been studied with the incorporation of carvacrol (C) that provides the antifungal action to the coating. The retention of carvacrol by the coating and the density of solids on the surface was evaluated together with the antifungal effectiveness on the post-harvest storage of *Golden Delicious* apples previously inoculated with *Penicillium expansum*. Moreover, a sensory analysis was also carried out to study the acceptability of the coated product. The carvacrol loaded coatings were highly effective against the growth of *Penicillium expansum*, significantly reducing the incidence and severity of the fungus, especially in those formulated with higher proportion of starch and carvacrol (50PVA:50S-C<sub>40</sub> and 50PVA:50S-C<sub>80</sub>). However, the results of the sensory analysis showed the negative impact of these coatings on the aroma and taste of the coated apples, even after the washing and peeling of the fruit.

KEYWORDS: starch, PVA, carvacrol, coating, apples, *Penicillium expansum*, antifungal.

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

## INTRODUCCIÓN

Los productos hortofrutícolas sufren diversos cambios bioquímicos desde su recolección hasta su consumo, el origen de los cuales puede ser físico o microbiológico (Singh y Sharma, 2018). La podredumbre azul ocasionada por el *Penicillium expansum* es una de las enfermedades fúngicas más comunes en manzanas, peras y otras frutas ricas en pectina (Ma et al., 2017). La infección inicial aparece en la mayoría de los casos en las partes dañadas de la fruta, como contusiones o heridas. Aunque las infecciones suelen comenzar en el campo, su crecimiento en el fruto tiene lugar durante el almacenamiento poscosecha de la fruta, lo que se traduce en considerables pérdidas económicas. En las frutas de pepita, los síntomas de la enfermedad incluyen lesiones acuosas de color marrón claro.

Tradicionalmente, el manejo poscosecha de la fruta fresca implica el uso de fungicidas químicos sintéticos. Sin embargo, la preocupación creciente por su relación con aspectos relacionados con la salud y el medio ambiente, junto con la falta de aprobación de renovación de algunos de las moléculas activas más efectivas, ha dado lugar al desarrollo de métodos alternativos, naturales y seguros para el control de las enfermedades poscosecha. La aplicación de recubrimientos comestibles es uno de los métodos más efectivos para aumentar la vida útil de los frutos, ya que estos recubrimientos actúan como barrera al intercambio de gases, reduciendo las alteraciones microbiológicas y teniendo un efecto similar al almacenamiento en atmósfera modificada o controlada (Vargas et al., 2008). Consiste en una película compuesta por un material apto para el consumo humano, el cual se aplica de forma líquida sobre la superficie del alimento por medio de diferentes métodos como inmersión, pulverización o filtración (McHugh y Senesi, 2000).

Además, se plantean alternativas frente a los tratamientos fungicidas tradicionales con productos de origen natural, inocuos para el consumidor, como son los aceites esenciales extraídos de plantas, los cuales se adicionan a los recubrimientos comestibles (Atarés y Chiralt, 2016). Los componentes activos antimicrobianos actúan de forma continua con el alimento, aumentando la vida útil, y manteniendo las cualidades sensoriales y la seguridad alimentaria del mismo (Han, 2003).

El carvacrol es el componente principal de los aceites esenciales de tomillo y orégano. Es un compuesto que tiene un gran efecto antimicrobiano, por lo que es objeto de estudio (Requena et al., 2017). Los principales inconvenientes para su aplicación son: la volatilidad de los compuestos que ejercen actividad antifúngica, lo que produce olor y sabor en la fruta, alterando las propiedades organolépticas del alimento, riesgos de fitotoxicidad y su limitada viabilidad comercial debido al alto coste de la producción a escala comercial (Palou et al. 2016). Diversos estudios muestran que evitando su

contacto directo con el fruto y modulando su liberación se evita este problema, por lo que se han desarrollado recubrimientos activos elaborados a partir de biopolímeros naturales, como son los polisacáridos o proteínas, y dichos aceites esenciales (Atarés y Chiralt, 2016).

Uno de los biopolímeros foco de investigación actual es el almidón, debido a su biodegradabilidad, su capacidad como plastificante, palatabilidad y biodisponibilidad (Li et al., 2019). Además, presenta una baja permeabilidad a gasee. En cambio, al compararlo con polímeros sintéticos, presenta limitaciones como su carácter hidrofílico y desfavorables propiedades mecánicas (Teixera et al., 2009).

El alcohol polivinílico (PVA) es un polímero soluble en agua con una formación altamente polar por hidrólisis y polimerización de acetato de vinilo. Es un material sintético biodegradable y adecuado para ser combinado con materiales poliméricos naturales, como el almidón de patata (Gaikwad et al., 2016).

En el presente estudio se combinaron alcohol polivinílico (PVA), almidón de patata (S) y carvacrol (C) para evaluar la posible aplicación como recubrimiento comestible para el tratamiento poscosecha de manzana *Malus domestica* Borkh cv. *Golden Delicious* frente a *Penicillium expansum*. En concreto, se ha estudiado, por una parte, la retención de carvacrol por el film y su estructura mediante microscopía FESEM, y por otra parte, tras la aplicación del recubrimiento en manzana, la densidad superficial de sólidos (DSS), capacidad antifúngica del recubrimiento frente a *Penicillium expansum* y evaluación de las propiedades organolépticas de la fruta a través de un análisis sensorial.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Materiales**

Las disoluciones que forman el recubrimiento están compuestas de almidón de patata (Roquette Laisa España S.A., Benifaió, Valencia, España), Alcohol Polivinílico de peso molecular 13,000-23,000 hidrolizado al 87-89% (Sigma Aldrich Química S.L., Madrid, España) y carvacrol como componente con poder antifúngico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Como agente plastificante se usó glicerol (PanReac Química S.A., Castellar de Vallès, Barcelona, España).

Como absorbente de humedad se usó pentóxido de fósforo puro y como disolvente metanol (PanReac Química S.A., Castellar de Vallès, Barcelona, España).

Las manzanas (*Malus domestica* Borkh cv. *Golden Delicious*) fueron adquiridas en un mercado de Valencia (España). La fruta fue seleccionada de acuerdo a la uniformidad de tamaño, forma, color, y a la ausencia de defectos en su superficie.

### **Elaboración de las dispersiones formadoras de recubrimiento (DFR) y de los films**

Las formulaciones con diferentes relaciones de almidón de patata (S) y alcohol polivinílico (PVA) se elaboraron a partir de dos disoluciones madre en las siguientes proporciones: 0PVA:100S y 100PVA:0S. Como agente plastificante se adicionó glicerol (GLI) en relación polímero:glicerol 1:0,25. El compuesto activo escogido fue carvacrol (C), que se añadió por emulsificación directa en proporción 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 el total de sólidos.

**TABLA 1.** Fracción másica de cada compuesto ( $X_i$ ) en el total de sólidos. (siendo i: S=almidón, PVA=Alcohol polivinílico, GLI= glicerol, C=carvacrol)

| <b>Formulación</b>              | <b>X<sub>s</sub></b> | <b>X<sub>PVA</sub></b> | <b>X<sub>GLI</sub></b> | <b>X<sub>C</sub></b> |
|---------------------------------|----------------------|------------------------|------------------------|----------------------|
| <b>100PVA:0S</b>                |                      | 2,5                    |                        |                      |
| <b>100PVA:0S-C<sub>40</sub></b> |                      | 2,5                    |                        | 1                    |
| <b>75PVA:25S-C<sub>40</sub></b> | 0,625                | 1,875                  | 0,156                  | 0,75                 |
| <b>50PVA:50S-C<sub>40</sub></b> | 1,25                 | 1,25                   | 0,312                  | 0,5                  |
| <b>50PVA:50S-C<sub>80</sub></b> | 1,25                 | 1,25                   | 0,312                  | 1                    |

La preparación de las disoluciones formadoras de recubrimiento (DFR) se realizó por emulsión 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 a temperatura ambiente. El agente plastificante se incorporó a la dispersión de almidón en relación polímero:glicerol 1:0,25. El agente antifúngico se adicionó a la dispersión 100PVA:0S y se homogeneizó durante 4 min a 12500 rpm con un Ultraturrax (Yellow Line Model DI 25 basic, IKA, Staufen, Alemania). Finalmente, se realizaron las mezclas en las diferentes proporciones, que se mantuvieron en agitación magnética suave durante 1 h.

Para la obtención de los films, una cantidad de DFR con un contenido de sólidos totales de 1,5 g fue extendida en placas de teflón (150 mm de diámetro) para obtener una densidad de sólidos de 84 g/m<sup>2</sup>. Los films se secaron por convección natural durante 48 h a 25°C y 45% de humedad relativa. Tras el secado, los films extraídos de las placas se dejaron acondicionar a 25°C.

## **Caracterización de los films**

### **RETENCIÓN DE CARVACROL**

Para evaluar la retención del compuesto activo durante la formación del film, se colocó una cantidad conocida de film (0,005 mg), por triplicado, en viales de ámbar que contenían 15 mL de una solución de metanol al 50% (v/v), herméticamente sellado, y se dejaron en agitación a 300 rpm durante 24 h a 25°C para favorecer la extracción de carvacrol. Posteriormente, las muestras se filtraron con filtros de 0,45 µm, y se midió la absorbancia (A) a 275 nm, mediante el uso de un espectrofotómetro (Evolution 201 UV-Vis, Thermo Fisher Scientific Inc., Inglaterra), tal como se ha descrito en trabajos previos (Tampau et al., 2017). La concentración de carvacrol (CA) retenido por los films fue determinada mediante una curva patrón obtenida con disoluciones de carvacrol en el mismo solvente conteniendo entre 1,188 ppm y 71,28 mg/mL ( $C=0.014 \cdot A+0.0048$ ;  $r^2 = 0.9995$ ). El extracto del film sin carvacrol se consideró como blanco.

### **ANÁLISIS DE LA MICROESTRUCTURA**

La microestructura de las películas se estudió con un Field Emission Scanning Electron Microscope (FESEM) (ZEISS®, modelo ULTRA 55, Alemania).

Las muestras se acondicionaron previamente en desecadores con pentóxido de fósforo (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) para eliminar el agua presente. Posteriormente, fueron sumergidas en nitrógeno líquido para obtener secciones transversales criofracturadas. Todas las muestras se montaron sobre soportes de cobre y fueron recubiertas con platino. Las observaciones se realizaron utilizando un voltaje de aceleración de 2 kV.

### **Aplicación de los recubrimientos en la fruta**

Los diferentes recubrimientos se aplicaron a las manzanas previamente sometidas a un proceso de limpieza y desinfección mediante inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1%, seguida de enjuagado abundante con

agua corriente y secado por convección natural a temperatura ambiente. Se emplearon 5 manzanas para cada formulación.

Posteriormente, el recubrimiento se aplicó por inmersión de la fruta en las diferentes DFR, de forma manual, durante 3 segundos. Las muestras control no recubiertas fueron sumergidas en agua. Después se favoreció el secado de los recubrimientos usando un ventilador durante 30 min, eliminándose así el exceso de recubrimiento mediante goteo por gravedad. Trascurrido este tiempo se dejaron a temperatura ambiente durante 24h. La fruta fue finalmente almacenada a 25°C y 65% de humedad relativa durante 14 días.

### Densidad superficial de sólidos (DSS)

La DSS fue evaluada por diferencia de peso de la fruta antes y después de la aplicación del recubrimiento, utilizando una balanza de precisión (Kern PFB 120-3, Alemania) y, posteriormente, aplicado la ecuación (1) (Marín et al., 2017):

$$DSS(g \cdot m^{-2}) = \frac{(m_R - m_0) \cdot X_{sDFR}}{m_0} \cdot \rho_m \cdot \frac{1}{S_e} \quad (1)$$

Donde:  $m_R$ = 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);  $\rho_m$ = densidad de la manzana (0,9 g·cm<sup>-3</sup>). Para la obtención de la superficie específica ( $S_e=6/d$ , m<sup>2</sup> superficie/m<sup>3</sup> manzana), se calculó el diámetro promedio (d) de la manzana asimilando su volumen al de una esfera.

### Efectividad antifúngica de los recubrimientos

El estudio de la actividad antifúngica de los recubrimientos se realizó frente a *Penicillium Expansum*. El cultivo del hongo (CECT-20906) fue sembrado en tubos de ensayo con agar patata dextrosa (PDA; Scharlab, Barcelona, España) e incubado a 25°C durante 10 días para acelerar su esporulación. La suspensión de esporas se preparó añadiendo aproximadamente 10mL de suero fisiológico (0,7% p/p de NaCl y 0,01% p/p de Tween 85) a los tubos, y las esporas se recogieron con un asa esterilizada previamente.

Para inocular las manzanas, se ajustaron las suspensiones a 1x10<sup>5</sup> esporas·mL<sup>-1</sup> en una cámara de Neubauer, de acuerdo con trabajos previos (Baert et al., 2008). Para obtener el número de esporas en millones/ mL de disolución se utilizó la ecuación (2).

$$\frac{x \text{ esporas}}{y \text{ cuadros}} \times \frac{\text{cuadros cámara}}{\text{volumen cámara}} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ mL}} = \text{Millones de esporas/mL} \quad (2)$$



Para el tratamiento antifúngico se utilizaron 12 manzanas por formulación. Para ello se realizó una herida (aproximadamente 1,6 mm de diámetro y 2 mm de profundidad) en un punto de la zona ecuatorial de la fruta con la punta de una varilla de acero inoxidable, y se inocularon con 20µL de la suspensión de esporas 24h antes de la aplicación de los recubrimientos.

El grupo control, una vez inoculada de igual modo al ya descrito, fue recubierta con agua.

Posteriormente las muestras inoculadas y recubiertas y los controles se almacenaron en bandejas de plástico perforadas aptas para estar en contacto con alimentos, a 20 °C y 55% HR, en una cámara incubadora refrigerada (EQUiTEC, Eris 615 HR, Valencia, España).

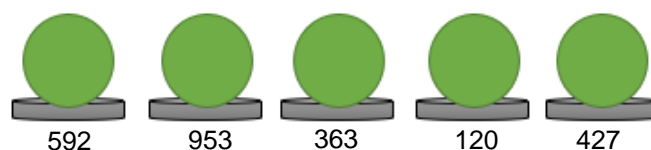
Los resultados se expresaron en términos de severidad del tratamiento, teniendo en cuenta la lesión producida por la inoculación del hongo. Para ello, se midió el diámetro de crecimiento del hongo horizontal y verticalmente (mm) con un pie de rey. La medición se realizó a los 4, 6, 8, 11 y 13 días de estudio, ya que eran los días que mejor reflejaban el crecimiento del hongo.

Además, también se determinó el porcentaje de incidencia, que indica el número de muestras infectadas respecto al total a cada tiempo.

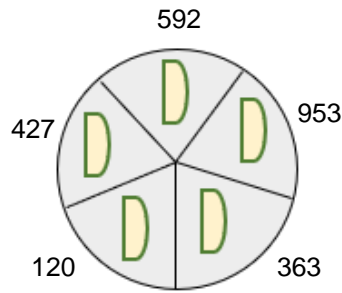
## Análisis Sensorial

Un total de 40 jueces no entrenados evaluaron las muestras 2 días después de ser recubiertas en términos de apariencia, aroma, sabor y preferencia global, usando una escala hedónica de 9 puntos. Las muestras fueron presentadas aleatoriamente con un código de tres dígitos y el análisis se realizó en una sala de catas normalizada según UNE-87-004. Los jueces debían limpiar su paladar con agua entre muestras.

Se realizaron dos análisis sensoriales. La primera cata se realizó a partir de manzanas recubiertas con las formulaciones: 100PVA:0S, 100PVA:0S-C<sub>40</sub>, 50PVA:50S-C<sub>40</sub>, 50PVA:50S-C<sub>80</sub> y una muestra control sin recubrir. Las muestras fueron situadas y codificadas de forma aleatoria como se observa en la Figura 1 para evaluar la apariencia y como se indica en la Figura 2 para examinar el perfil olfato-gustativo. Al final de la cata se cuestionó la aceptación global, con intención de que los catadores mostraran su preferencia como consumidor englobando todos los resultados anteriores.

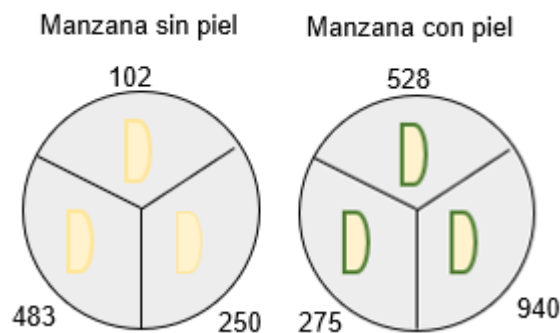


**FIGURA 1.** Disposición y codificación de las manzanas para la cata visual y olfativa de las formulaciones. Donde 592=100PVA:0S-C<sub>40</sub>, 953=Control, 363=50PVA:50S-C<sub>80</sub>, 120=50PVA:50S-C<sub>40</sub> y 427=100PVA:0S.



**FIGURA 2.** Disposición y codificación de las muestras para la cata gustativa de las formulaciones. Donde 592= 100PVA:0S-C<sub>40</sub>, 953= Control, 363= 50PVA:50S-C<sub>80</sub>, 120= 50PVA:50S-C<sub>40</sub> y 427= 100PVA:0S.

En el segundo análisis sensorial, se evaluaron porciones de fruta recubiertas con la formulación 50PVA:50S-C<sub>40</sub> y sin recubrir (control) en términos de aroma, sabor y preferencia global. La intención era saber si el lavado y/o pelado de la fruta antes de ser consumida podía influir en la aceptación del recubrimiento por los consumidores, ya que se recomienda lavar los productos hortofrutícolas antes de su ingesta en crudo y además, un elevado porcentaje de consumidores pelan la fruta. Por lo tanto, tanto las porciones de manzana recubierta como las de la muestra control se presentaron con/sin lavado y con/sin pelado, tal y como se observa en la Figura 3.



**FIGURA 3.** Codificación y distribución de las muestras de manzana para la realización de la segunda cata olfato-gustativa. Donde 102= Control sin piel, 250= Manzana lavada sin piel, 483= Manzana no lavada sin piel y 528= Control con piel, 940= Manzana lavada con piel, 275= Manzana no lavada con piel.

### Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos fue realizado mediante un análisis de la varianza (ANOVA) con el software Statgraphics Centurion XVI.II (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA). Para diferenciar entre tratamientos, se utilizó el test de Fisher (least significant difference, LSD) con un nivel de confianza del 95%.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización de los recubrimientos

#### EFICIENCIA DE RETENCIÓN DE CARVACROL

En la Tabla 2 se muestra el porcentaje de retención de carvacrol de cada recubrimiento. Se esperaba obtener valores bajos de retención de carvacrol, ya que durante el secado del recubrimiento la evaporación de agua provoca un aumento de las pérdidas del carvacrol (y de cualquier otro componente volátil inmiscible) por efecto de arrastre de vapor, tal y como ha sido observado por otros autores trabajando con carvacrol y otros compuestos volátiles similares (Perdones et al., 2016; Tampau et al., 2017; Talón et al., 2019). Sin embargo, como se puede observar en la Tabla 2, los recubrimientos presentaron valores de retención de carvacrol moderados, entre 44 y 59%, dependiendo de la formulación. La máxima capacidad de retención se encontró en la formulación 100PVA:0S-C<sub>40</sub> (59%). Otros autores, que también trabajaron con PVA y carvacrol, encontraron efectos similares (Andrade et al., 2020). La retención de carvacrol por el PVA parece estar potenciada por la presencia de grupos acetato residuales en las cadenas de PVA. Según Wiśniewska et al. (2016), los grupos acetato se ionizan, generando cargas negativas en las cadenas del polímero que pueden interaccionar electrostáticamente con grupos de cargas opuestas, como pueden ser los grupos fenoles del carvacrol. Este mecanismo favorece la unión del carvacrol a las cadenas del PVA, contribuyendo a un aumento efectivo de su retención en la matriz del polímero, ya que el carvacrol ligado es menos susceptible a la evaporación por arrastre de vapor (Andrade et al., 2020; Tampau et al., 2020).

La incorporación de almidón a las disoluciones formadoras de recubrimiento (DFR) disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) la retención de carvacrol. Esto sugiere una menor afinidad del almidón por el carvacrol, ya que no contribuye a su mayor retención. Para un mismo ratio de PVA:almidón en la formulación, la eficiencia de retención aumentó al aumentar la concentración de carvacrol.

**TABLA 2.** Porcentaje de carvacrol en la dispersión inicial, retención de carvacrol (%) en los diferentes recubrimientos y concentración de carvacrol en el film.

| Formulación                      | $X_{\text{Carvacrol}}$ (%) | Retención de carvacrol (%) | Concentración carvacrol final en film (g /g film seco) |
|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|--|
| <b>100PVA:0S</b>                 | -                          | -                          | -  |
| <b>100PVA:0S- C<sub>40</sub></b> | 1                          | 59 (2) <sup>a</sup>        | 0.17   |
| <b>75PVA:25S- C<sub>40</sub></b> | 0,75                       | 44,3 (0,4) <sup>c</sup>    | 0.10   |
| <b>50PVA:50S- C<sub>40</sub></b> | 0,5                        | 47 (1) <sup>c</sup>        | 0.07   |
| <b>50PVA:50S- C<sub>80</sub></b> | 1                          | 54 (2) <sup>b</sup>        | 0.14   |

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones ( $p < 0.05$ ).

## MICROESTRUCTURA

El estudio de la microestructura de los films permite conocer la disposición de los componentes del film, una vez estos están completamente secos, y relacionar el resultado con las propiedades del recubrimiento (Cano, 2013).

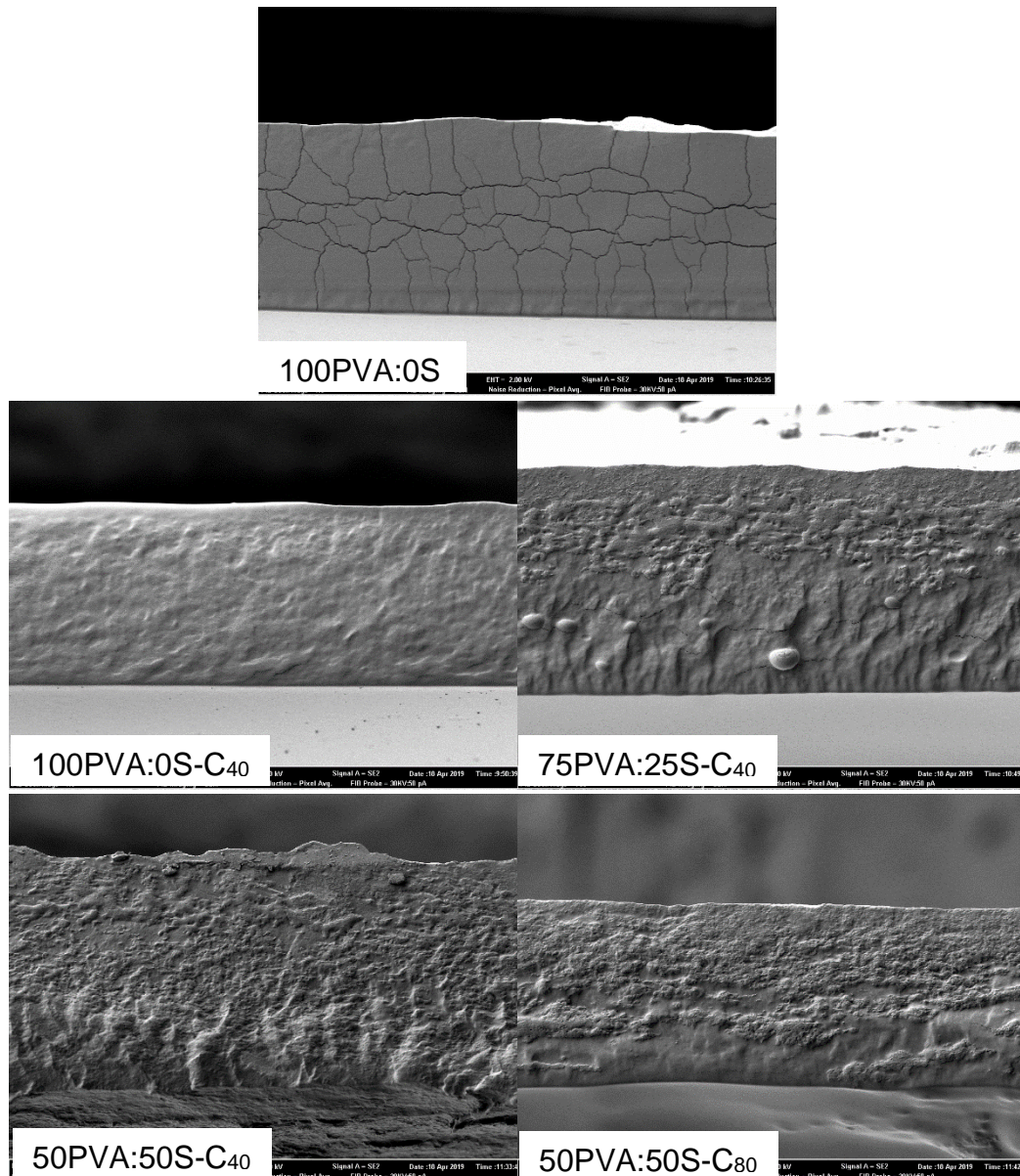
Durante el secado de los recubrimientos se produce la evaporación del disolvente, lo que provoca cambios en la concentración de los componentes y, por consiguiente, en la estructura del film y en su viscosidad, lo que afecta a las propiedades del recubrimiento (Jiménez et al., 2010).

En la Figura 4 se observa el corte transversal de las películas elaboradas a partir de las diferentes formulaciones estudiadas. En primer lugar, cabe destacar que se observan diferencias estructurales notables entre las formulaciones con almidón y sin almidón en su composición. Los films formulados únicamente con PVA (100PVA:0S y 100PVA:0S-C<sub>40</sub>) presentan una estructura más homogénea, tal como ha sido observado por otros autores que han trabajado con un PVA similar (Andrade et al., 2020). Es notable la presencia de microfisuras, debidas seguramente al impacto de los electrones durante las observaciones microscópicas.

La incorporación de carvacrol a los recubrimientos a base de PVA parece incrementar la desigualdad de los films obtenidos (100PVA:0S-C<sub>40</sub>), si bien no aparecen fisuras tras realizar el corte de la película, como sucede en el de 100PVA:0S. Por otro lado, la ausencia de gotas visibles del aceite esencial en estos films sugiere que la mayoría del carvacrol se encuentra ligado a las cadenas de polímero, generando una estructura no emulsionada capaz de unir una cierta cantidad del compuesto sin separación de fases en la matriz.

En todos films con almidón se observó una separación de fases entre polímeros durante el secado. Esto indica la existencia de una cierta incompatibilidad entre los polímeros, lo que da lugar a dos zonas con diferente morfología. Cano et al. (2015) y Sreekumar et al. (2012) observaron un

comportamiento similar en formulaciones de PVA y almidón. Las formulaciones 75PVA:25S-C<sub>40</sub> y 50PVA:50S exhibieron una microestructura similar, independientemente de la concentración de carvacrol empleada. En la formulación 75PVA:25S-C<sub>40</sub>, se pudo observar también la presencia de gránulos de almidón sin gelatinizar.



**FIGURA 4.** Imágenes obtenidas con FESEM de la sección transversal de films.

#### DENSIDAD DE SÓLIDOS EN SUPERFICIE (DSS)

En la Tabla 3 se recogen los resultados obtenidos de la densidad superficial de sólidos (DSS). Estos dependen de la cantidad de recubrimiento que se adhiere a la superficie de la fruta y del contenido en sólidos totales de

la formulación. Este parámetro se ve afectado por la humectabilidad, extensibilidad y viscosidad de las formulaciones.

Se obtuvieron valores bajos de DSS (0,24-0,34 g/m<sup>2</sup>) en comparación con trabajos previos que emplearon dispersiones más viscosas (Sapper et al., 2019). Cabe destacar que se encontraron diferencias significativas con un nivel del 95,0% de confianza entre las formulaciones con mayor retención de carvacrol (100PVA:0S-C<sub>40</sub> y 50PVA:50S-C<sub>80</sub>) y el resto de las formulaciones.

**TABLA 3.** Densidad de sólidos en superficie, DSS (g/m<sup>2</sup>)

| <b>Formulación</b>               | <b>DSS (g/m<sup>2</sup>)</b> |
|----------------------------------|------------------------------|
| <b>100PVA:0S</b>                 | 0,27 (0,03) <sup>a</sup>     |
| <b>100PVA:0S- C<sub>40</sub></b> | 0,33 (0,07) <sup>b</sup>     |
| <b>75PVA:25S- C<sub>40</sub></b> | 0,243 (0,057) <sup>a</sup>   |
| <b>50PVA:50S- C<sub>40</sub></b> | 0,26 (0,04) <sup>a</sup>     |
| <b>50PVA:50S- C<sub>80</sub></b> | 0,34 (0,04) <sup>b</sup>     |

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones ( $p < 0.05$ ).

## INCIDENCIA Y SEVERIDAD

Está demostrado que la aplicación de recubrimientos con incorporación de aceites esenciales o alguno de sus componentes puros permite el control de varias enfermedades ocasionadas por patógenos durante el almacenamiento poscosecha de la fruta (incluyendo *Penicillium expansum*) (Grande-Tovar et al., 2018). Las interacciones de los recubrimientos y sus componentes con la superficie de las manzanas son un factor importante para definir el comportamiento de la fruta recubierta (Basiak et al, 2019). Además, estas interacciones pueden afectar a la capacidad de control de las enfermedades in vivo del recubrimiento con compuestos antifúngicos (Valencia-Chamorro et al, 2011).

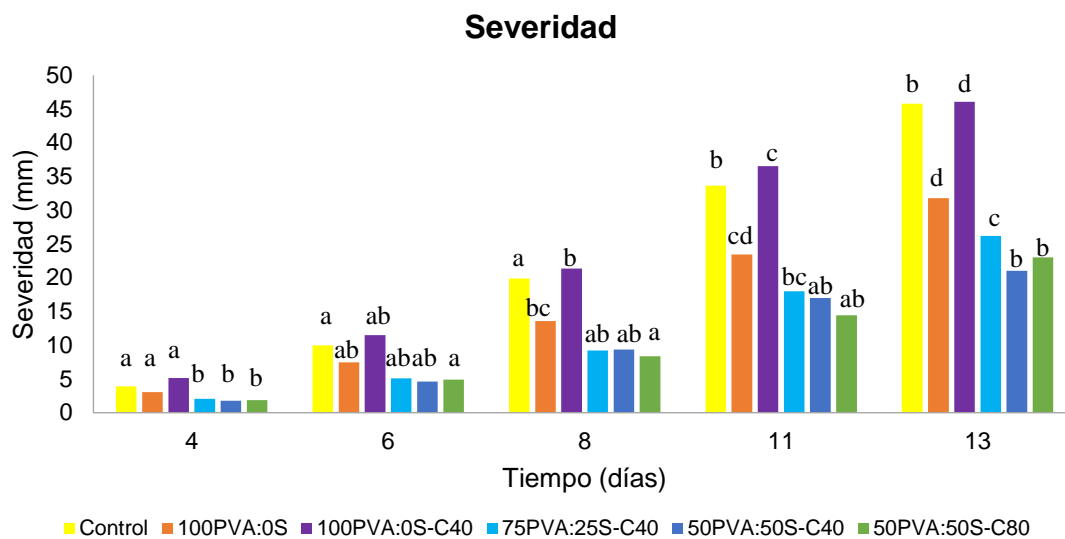
La incidencia permite medir el número de manzanas donde el hongo ha proliferado desde la infección artificial a lo largo de los días de estudio (4, 6, 8, 11 y 13 días). En la Tabla 4 se observa el porcentaje de manzanas con crecimiento fúngico en los diferentes días de estudio. La formulación con una mayor incidencia del hongo fue la 100PVA:0S-C<sub>40</sub>, ya que a día 8 de estudio presentó el 100% de las manzanas infectadas. Las formulaciones donde se produjo una menor incidencia fueron 50PVA:50S-C<sub>40</sub> y 50PVA:50S-C<sub>80</sub>, lo cual podría asociarse a la mayor presencia de almidón, pues es en la primera (con menor concentración de carvacrol de ambas), la que presentó la menor incidencia de todas.

**TABLA 4.** Porcentaje de incidencia del hongo sobre las manzanas (%) a lo largo de los días de estudio.

|                                 | Día 4 (%) | Día 6 (%) | Día 8 (%) | Día 11 (%) | Día 13 (%) |
|---------------------------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|
| <b>CONTROL</b>                  | 50        | 58        | 75        | 83         | 83         |
| <b>100PVA:0S</b>                | 42        | 58        | 75        | 75         | 83         |
| <b>100PVA:0S-C<sub>40</sub></b> | 92        | 92        | 100       | 100        | 100        |
| <b>75PVA:25S-C<sub>40</sub></b> | 42        | 58        | 33        | 75         | 75         |
| <b>50PVA:50S-C<sub>40</sub></b> | 33        | 33        | 33        | 42         | 42         |
| <b>50PVA:50S-C<sub>80</sub></b> | 42        | 58        | 58        | 58         | 58         |

En la Figura 5 es posible observar el aumento en los valores del diámetro de las lesiones (mm) con el tiempo de almacenamiento (relacionado con un incremento en la severidad de la enfermedad ocasionada por el hongo en la fruta) y en la Figura 6, las fotografías de la evolución de las manzanas inoculadas a lo largo del tiempo. Como se puede observar, la severidad del crecimiento fue más acusada en la formulación control y en la formulación 100PVA:0S-C<sub>40</sub>, en la que también destaca el superior % de incidencia (Tabla 4). Las formulaciones a base de PVA y almidón, y con incorporación de carvacrol fueron las más efectivas para controlar el crecimiento de *Penicillium*. La presencia de almidón parece jugar un papel clave en el control del avance del crecimiento del hongo, pues 50PVA:50S-C<sub>80</sub> resultó ser más efectiva que la 100PVA:0S-C<sub>40</sub>, a pesar de la mayor concentración final en carvacrol de ésta última (Tabla 2) (suponiendo que se mantienen proporciones similares del activo en el recubrimiento que en el film seco). Así, la presencia de almidón en los recubrimientos parece afectar a la cinética de liberación del carvacrol, favoreciendo así su acción antimicrobiana. Por otro lado, prácticamente no se encontraron diferencias significativas entre las formulaciones con almidón, como se evidencia en las imágenes de la Figura 6.

Según los resultados obtenidos de incidencia y severidad del hongo sobre las manzanas recubiertas, se puede decir que la presencia de almidón en la formulación favorece la inhibición del hongo, ya que a día 13 de estudio se encontró un menor número de manzanas infectadas, y las que lo están, presentaron un menor crecimiento del microorganismo.







































**FIGURA 5.** Severidad producida por el hongo sobre las manzanas Golden Delicious en comparación con el control. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tiempos de almacenamiento para una misma formulación ( $p < 0.05$ ).

Se puede concluir que los recubrimientos con un efecto antifúngico mayor ante *Penicillium Expansum* fueron los formulados con 50PVA:50S-C<sub>40</sub> y 50PVA:50S-C<sub>80</sub>. Ambos recubrimientos presentaron una incidencia y severidad más bajas respecto el resto de las formulaciones.



**Figura 6.** Imágenes de la evolución de crecimiento del hongo en función del tratamiento a lo largo del almacenamiento.

|                      | <b>Aplicación</b>   | <b>Día 4</b>  | <b>Día 6</b>   | <b>Día 8</b>  | <b>Día 11</b>   | <b>Día 13</b>   |
|----------------------|---|---|--|---|---|---|
| <b>Control</b>       |    |    |    |    |    |    |
| <b>100PVA:0S</b>     |    |    |    |    |    |    |
| <b>100PVA:0S-C40</b> |    |    |    |    |    |    |
| <b>75PVA:25S-C40</b> |   |   |   |   |   |   |
| <b>50PVA:50S-C40</b> |  |  |  |  |  |  |
| <b>50PVA:50S-C80</b> |  |  |  |  |  |  |

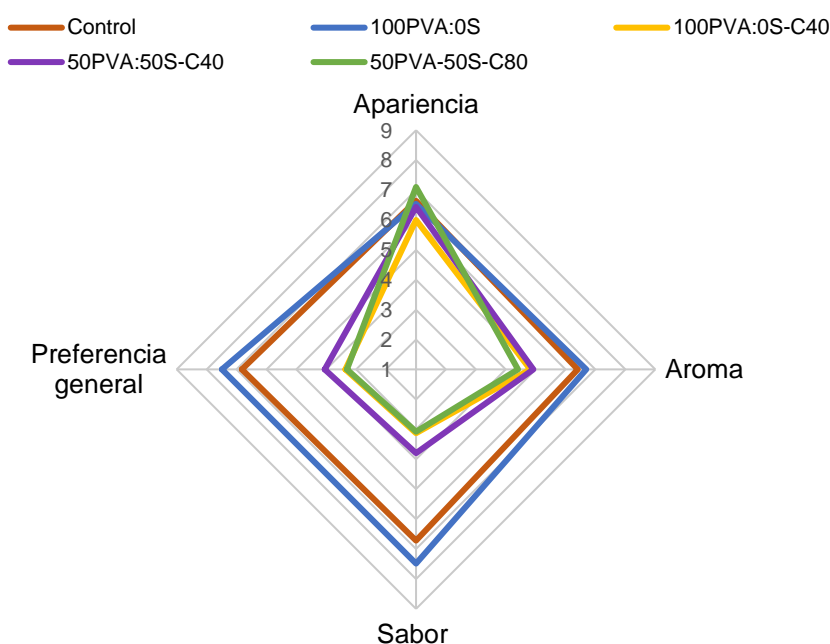
La actividad antifúngica del carvacrol ha sido relacionada con el daño severo ocasionado en las membranas y paredes celulares, lo cual desemboca en deformaciones morfológicas, colapso y deterioro de las conidias y/o hifas (Neri et al., 2006). Efectos similares han sido observados por otros autores al trabajar con aceite esencial de timol (cuyos componentes principales son el timol y el carvacrol), y manzana *Red Fuji* (Banani et al., 2018). Sin embargo, estos autores señalaron la aparición de cierto grado de fitotoxicidad con la aplicación directa del aceite esencial. En el presente trabajo, donde se ha aplicado carvacrol incorporado en las soluciones formadoras de recubrimiento, no ha habido respuesta fitotóxica en la fruta, a las concentraciones ensayadas.

## ANÁLISIS SENSORIAL

El análisis visual y olfato-gustativo de las manzanas recubiertas con las diferentes formulaciones nos lleva a tener una visión de la posible aceptación del consumidor por el recubrimiento comestible desarrollado.

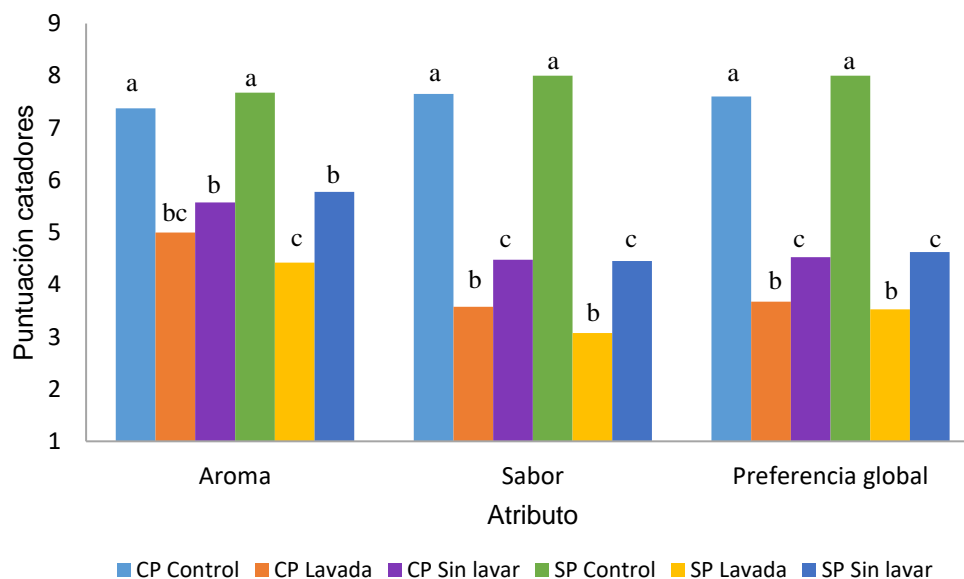
En la Figura 7 se muestra el resultado de la primera cata realizada. Se observa una clara preferencia de los catadores por las manzanas sin tratar o con recubrimiento sin carvacrol en su formulación (Control sin tratamiento y 100PVA:0S), siendo éstas las muestras con una puntuación más alta en la escala hedónica. Esto se debe al impacto negativo del aroma y el sabor del carvacrol sobre el producto aplicado, tal como ha sido observado previamente por otros autores (Cano et al., 2016). Sin embargo, la apariencia no se vio afectada significativamente ( $p < 0,05$ ) por la aplicación de los distintos recubrimientos. La muestra 50PVA:50S-C<sub>40</sub> mostró diferencias estadísticas significativas con un nivel del 95,0% de confianza respecto el resto de las formulaciones. Como se puede observar, fue mejor valorada que las muestras 100PVA:0S-C<sub>40</sub> y 50PVA:50S-C<sub>80</sub> y peor valorada, que la muestra sin tratamiento y la recubierta con 100PVA:0S. La mejor acogida por parte de los catadores del recubrimiento 50PVA:50S-C<sub>40</sub> puede deberse a su menor cantidad final de carvacrol una vez seco el recubrimiento (Tabla 2).

Como conclusión se puede decir que el recubrimiento con mejores características organolépticas fue la formulación 50PVA:50S-C<sub>40</sub>, lo que se debe a la combinación de una proporción más baja de carvacrol y una retención menor por el recubrimiento.



**FIGURA 7.** Resultado del primer análisis sensorial. La puntuación 1-9 representa la escala hedónica.

En la Figura 8 se pueden observar los resultados obtenidos en el segundo análisis sensorial. Considerando la limitación sensorial que tiene el empleo de carvacrol (de acuerdo a los resultados obtenidos en el primer análisis), se eligió la formulación 50PVA:50S-C<sub>40</sub> ya que fue el recubrimiento con menor concentración de agente activo de entre los que resultaron más efectivos contra *Penicillium expansum*. En este análisis sensorial, se evaluó el efecto del lavado y/o pelado previos al consumo de la fruta recubierta en el aroma, el sabor y la preferencia global. Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre la muestra sin tratamiento, las muestras recubiertas lavadas y sin lavar, en ambos grupos de muestras (con piel y sin piel). Así, las muestras con una puntuación más elevada fueron las manzanas control (con piel y sin piel). Por otra parte y contrariamente a lo esperado, los resultados revelaron que ni el lavado ni el pelado mejoraron la apreciación sensorial de la fruta recubierta. Sin embargo, el panel de catadores mostró una preferencia significativa ( $p < 0,05$ ) por la fruta sin lavar, independientemente de si estaba o no pelada. Estos resultados sugieren que la difusión de carvacrol a través de la piel dañada de la fruta hacia el interior de la manzana ha tenido ya lugar durante el proceso de recubrimiento debido al incremento en la permeabilidad celular en la piel de la fruta por la presencia de terpenoides (Nowotarska et al., 2015; Tsuchiya, 2015). Por lo tanto, esta alteración en la piel por el carvacrol podría favorecer la difusión del agente activo hacia partes internas del tejido durante el lavado, dando lugar a un marcado aroma y sabor.



**FIGURA 8.** Puntuación de los catadores del segundo análisis sensorial de las manzanas recubiertas con 50PVA:50S-C40 y sin recubrir, previamente peladas o lavadas. CP: muestras con piel; SP: muestras sin piel.

## CONCLUSIONES

La aplicación de recubrimientos a base de PVA, almidón y carvacrol a manzanas *Golden Delicious* fue efectiva contra el crecimiento de *Penicillium Expansum* al reducir significativamente la incidencia y severidad del hongo, especialmente al aplicar aquellas formuladas con mayor proporción de almidón y carvacrol (50PVA:50S-C<sub>40</sub> y 50PVA:50S-C<sub>80</sub>). Sin embargo, los resultados del análisis sensorial pusieron de manifiesto el gran impacto sensorial del carvacrol sobre el aroma y el sabor de la fruta, incluso tras el lavado y el pelado de la misma. Por tanto, no se recomienda el empleo de este tipo de recubrimientos en poscosecha. Sin embargo, la aplicación de estos recubrimientos podría ser muy útil como tratamiento pre-cosecha, dada su elevada eficacia antimicrobiana y su baja fitotoxicidad, a las concentraciones de agente activo ensayadas.

## REFERENCIAS

- Andrade, J., Gonzalez-Martinez, C. and Chiralt, A. (2020). Incorporation of Carvacrol into Poly (vinyl alcohol) Films Encapsulated in Lecithin Liposomes. *Polymers*, 12, 497-515.
- 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(12):51-62.

- Banani, H., Roatti, B., Ezzahi, B., Giovannini, O. Gessler, G. Pertot, I., Perazzolli, M. (2014). Characterization of resistance mechanisms activated by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole to downy mildew in different grapevine cultivars. *Plant Pathology*, 63, 334-343.
- 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.
- Cano, A., Jiménez A., Cháfer M., González C. 2013. Efecto de la incorporación de salvado de arroz sobre las propiedades físicas y microestructurales de films biodegradables a base de almidón. Tesis de Máster. Universidad Politécnica de Valencia.
- Cano, A., Fortunati, E., Kenny, J.M, Cháfer, M., Chiralt, A., González-Martínez, C. (2015). Properties and ageing behaviour of pea starch films as affected by blend with poly(vinyl alcohol). *Food Hydrocolloids*, 48, 84-93.
- Cano, A., Cháfer, M., Chiralt, A., Molina, P., Borrás, M., Beltran, C., González-Martínez, C. (2016). Goat's milk cheese quality as affected by coating with edible chitosan-essential oils films. *International Journal of Dairy Technology*, 16, 1-9.
- Díaz, R., Chiralt, Amparo., Moreno, O. Films biodegradables antimicrobianos a base de almidón y gelatina. Trabajo Final de máster. Universidad Politécnica de Valencia.
- Gaikwad, K.K.; Lee, J.Y.; Lee, Y.S. 2016. Development of polyvinyl alcohol and apple pomace bio-composite film with antioxidant properties for active food packaging application. *Journal of food science and technology*, 53(3), 1608–1619.
- Neri, F., Mari M. and Brigati. S. (2006). Control of *Penicillium expansum* by plant volatile compounds. *Plant Pathology*, 55, 100-105. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2005.01312
- Han, J.H. 2003, Novel food packaging techniques. *Antimicrobial food packaging*. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd, 8, 50-70.
- Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., Chiralt, A. 2010. Effect of lipid self-association on the microstructure and physical properties of hydroxypropyl-methylcellulose edible films containing fatty acids. *Carbohydrate Polymers*, 82, 585-593.
- Li, W.; Zheng, K.; Chen, H.; Feng, S.; Wang, W.; Qin, C. 2019. Influence of Nano Titanium Dioxide and Clove Oil on Chitosan–Starch Film Characteristics. *Polymers*. 11 (9), 1418.
- Ma, L., He, J., Liu, H., & Zhou, H. (2018). The phenylpropanoid pathway affects apple fruit resistance to *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology*, 166(3), 206-215. <https://doi.org/10.1111/jph.12677>
- McHugh, T. H.; Senesi, E. 2000. Apple wraps: A novel method to improve the quality and extend the shelf life of fresh-cut apples. *Journal of Food Science*, 65(3):480-485.
- Neri, F., Mari M. and Brigati. S. (2006). Control of *Penicillium expansum* by plant volatile compounds. *Plant Pathology*, 55, 100-105. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2005.01312
- Nowotarska, S.W.; Nowotarski, K.J.; Friedman, M.; Situ, C. (2014). Effect of structure on the interactions between five natural antimicrobial compounds and phospholipids of bacterial cell membrane on model monolayers. *Molecules*, 19, 7497-7515.
- 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.
- Requena, R.; Vargas, M.; Chiralt, A. 2017. Release kinetics of carvacrol and eugenol from poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)(PHBV) films for food packaging applications. *European Polymer Journal*, 92, 185-193.

- 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. <https://doi.org/10.3390/coatings9050333>
- Singh D.; Sharma, R.R. 2018. Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables ant Their Management. *Postharvest Desinfection of Fruits and Vegetables*. 1,1-52.
- Sreekumar, P.A. Al-Harathi. M.A. and De, S.K. (2012). Studies on compatibility of biodegradable starch/polyvinyl alcohol blends. *Polymer Engineering and Science*, 52(10), 2167-2172.
- Tampau, A., González-Martínez, C., Chiralt, A. (2020). Poly(vinyl alcohol)-based materials encapsulating carvacrol obtained by solvent casting and electrospinning. *Reactive and Functional Polymers*, 153, 104603.
- 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.
- Tsuchiya, H. (2015). Membrane Interactions of Phytochemicals as Their Molecular Mechanism Applicable to the Discovery of Drug Leads from Plants. *Molecules* 2015, 20, 18923-18966; doi:10.3390/molecules201018923.
- 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