



INSTITUTO DE
TECNOLOGÍA
QUÍMICA



EXCELENCIA
SEVERO
OCHOA



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



UNIVERSITAT
POLITÀCNICA
DE VALÈNCIA

“NUEVOS MATERIALES CON PROPIEDADES ANTIFÚNGICAS PARA EL TRATAMIENTO POSTCOSECHA DE CÍTRICOS”

Trabajo Fin de Máster en Química Sostenible

MARIA DEL MAR ORTIZ GIMENO
TUTOR: ANTONIO EDUARDO PALOMARES GIMENO
DIRECTOR EXPERIMENTAL: ADRIÁN PLA HERNÁNDEZ
VALENCIA, SEPTIEMBRE 2020

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Tecnología Postcosecha del I.V.I.A. por posibilitar la realización de este trabajo y a todos sus miembros que compartieron conmigo algún instante durante su realización.

Al Aula Cemex-Sostenibilidad por la ayuda concedida para la realización de TFM relacionados con la química sostenible.

RESUMEN

La presente tesis fin de máster del programa de Química Sostenible ha desarrollado el tema de la búsqueda de nuevos materiales de origen natural con propiedades antifúngicas para su aplicación como recubrimiento alimentario sobre frutos cítricos. Para ello se ha realizado en primer lugar una búsqueda bibliográfica analizando los procesos alternativos al uso de fungicidas tradicionales. Así se ha visto que estos procesos alternativos pueden ser físicos, biológicos o químicos de bajo riesgo, siendo estos últimos los que tienen un mayor potencial de aplicación. Entre ellos se ha observado que el empleo de sustancias naturales como extractos vegetales y aceites esenciales es una buena alternativa debido a su baja toxicidad y actividad antibacteriana y antifúngica. Sin embargo, el uso de estos materiales aplicados a la conservación de alimentos presenta el problema de su rápida evaporación, consiguiendo una actividad puntual que no se mantiene en el tiempo. Por ello, se ha propuesto trabajar con estructuras porosas (zeolitas y arcillas) que contengan aceites esenciales (aceite esencial de tomillo), buscando que la interacción soporte-aceite permita una difusión controlada del mismo, incrementando el tiempo de liberación del fungicida (aceite de tomillo) y aumentando así su actividad biocida en el tiempo. Este trabajo se ha desarrollado en colaboración con el AINIA donde se han realizado los ensayos con fruta real, intentando determinar si el uso de estos nuevos materiales puede conseguir retrasar la putrefacción de los cítricos y alargar su vida útil y periodo comercial.

Pese a solo poder haber sido posible realizar un grupo de ensayos por la alerta sanitaria y las restricciones impuestas, los resultados obtenidos han mostrado la posibilidad de usar estas técnicas para el control de los hongos en cítricos, observando que el resultado obtenido dependía del tipo de soporte sobre el que se coloca el aceite esencial y del tipo de hongo sobre el que actúa. Sin embargo, serían necesarios más ensayos para una aplicación óptima de estos materiales.

Palabras clave: Postcosecha, cítricos, tratamientos antifúngicos, aceites esenciales, materiales biocidas, recubrimientos comestibles.

ÍNDICE

1. Introducción	6
1.1 Química verde y desarrollo sostenible	6
1.2 Industria agroalimentaria	9
1.3 La industria cítrica	9
1.3.1 La recolección y el transporte de los cítricos	10
1.3.2 Tratamiento de los cítricos recolectados	12
1.3.3 Ceras y recubrimientos comestibles.....	14
1.3.4 Seguridad y calidad alimentaria de cítricos en postcosecha	17
1.4 Enfermedades postcosecha	18
1.4.1 <i>Penicillium italicum</i> y <i>Penicillium digitatum</i>	20
1.4.2 <i>Geotrichum citri-aurantii</i>	21
1.5 Tratamientos biocidas	22
1.5.1 Biocidas convencionales.....	23
1.5.2 Estrategia CINCEP	26
2. Objetivos.....	28
3. Análisis bibliográfico de procesos alternativos al uso de fungicidas tradicionales	29
3.1 Métodos físicos	29
3.1.1 Tratamientos con calor.....	29
3.1.1.1 Tratamientos con aire caliente o curado	30
3.1.1.2 Tratamientos con agua caliente.....	30
3.1.2 Irradiaciones	30
3.1.2.1 Radiaciones ionizantes	30
3.1.2.2 Radiaciones no ionizantes	32
3.1.3 Atmósferas controladas	33
3.2 Métodos biológicos	34
3.3 Métodos químicos de bajo riesgo.....	37
3.3.1 Sales: Compuestos GRAS y aditivos alimentarios	37
3.3.2 Sustancias inductoras de resistencia	39
3.3.3 Sustancias naturales.....	43

3.3.3.1 Extractos vegetales	43
3.3.3.2 Aceites esenciales	44
3.3.4 Recubrimientos comestibles antifúngicos	48
3.4 Combinación de métodos de control.....	49
4. Preparación del material biocida	51
4.1 Materiales	51
4.1.1 Sólidos	51
4.1.2 Líquidos	51
4.1.3 Incorporación del aceite esencial.....	52
4.2 Métodos de caracterización.....	52
4.2.1 Difracción de Rayos X	52
4.2.2 Análisis textural	53
5. Evaluación de la actividad biocida	54
5.1 Ensayo de fitotoxicidad.....	55
5.2 Ensayos para determinar la actividad biocida	55
6. Resultados y discusión	57
6.1 Caracterización de los materiales.....	57
6.1.1 Zeolita LTA	57
6.1.2 Arcilla	59
6.2 Estudios fungicidas	60
6.2.1 Determinación de la fitotoxicidad	60
6.2.2 Determinación de la actividad fungicida	61
7. Conclusiones	70
8. Bibliografía	71

1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo fin de máster trata sobre el desarrollo de nuevos materiales de origen natural con propiedades antifúngicas, utilizando para ello estructuras porosas y aceites esenciales. Estos materiales se utilizan para el tratamiento de cítricos, buscando aumentar su tiempo de vida y disminuir de esta forma las pérdidas de alimento. Este tema entra de lleno en el campo de la Química Verde y contribuye a los objetivos de Desarrollo Sostenible tal como se pone de manifiesto en esta introducción. En la misma se analiza además el mercado cítrico, las enfermedades más importantes producidas por hongos en este tipo de frutas y los materiales biocidas utilizados en la actualidad para controlar los mismos.

1.1 Química verde y desarrollo sostenible

El término “Química” proviene de la palabra alquimia, entendido como el conjunto de prácticas científicas donde están incluidas la metalurgia, la filosofía, la astronomía o la medicina. La definición de la palabra química ha evolucionado mucho a lo largo de los años, pero actualmente, según la Real Academia Española, se define como la ciencia que estudia la estructura, las propiedades y las transformaciones de los cuerpos a partir de su composición. ^[1]

La historia de la química abarca un periodo de tiempo muy amplio, comprendido desde la prehistoria hasta el día de hoy. En este contexto, aparece en el siglo XIX la industria química, la cual fue al principio muy bien recibida debido a todos los beneficios que esta generaba, como la síntesis de fármacos y antibióticos, el desarrollo de nuevos materiales, la generación de productos de consumo (perfumes, detergentes, pinturas, aditivos...), tratamientos para cultivos, obtención de gas natural y petróleo, etc. Pero esta perspectiva se ha visto alterada como consecuencia de la generación durante estos procesos industriales, de productos tóxicos, dañinos tanto para el medio ambiente (lluvia ácida, destrucción de la capa de ozono, efecto invernadero, etc.), como para el ser humano. Además, cabe mencionar que en numerosos procesos químicos se generan multitud de residuos. Así, por ejemplo, se calcula que muchos procesos de la industria farmacéutica generan entre 25-100 kg de subproductos por cada kg de producto deseado (factor E).^[2] El factor E de diferentes procesos industriales aparecen en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Generación de residuos atendiendo el factor E según el tipo de industria. [2]

INDUSTRIA	TONELADAS DE PRODUCCIÓN	FACTOR E (kg desechos/ kg producto)
Refino de petróleo	10^6-10^8	<0,1
Industria Química	10^4-10^6	<1 - 5
Química Fina	10^2-10^4	5 - 50
Farmacéutica	$10-10^3$	25 - 100

Debido a las preocupaciones ambientales y con el objetivo de buscar nuevas alternativas a la química tradicional que eliminen estos efectos perjudiciales o, al menos, los minimice, surge el término de “Química Verde”. La Química Verde o Sostenible, sinónimo de sostenibilidad ambiental y salud, consiste en el diseño de procesos y productos químicos que reduzcan al mínimo la utilización y la generación de sustancias peligrosas. Este concepto se aplica a todo el ciclo de vida de un producto químico, desde su diseño, pasando por la fabricación, hasta llegar a su uso. A pesar de que la primera vez que se emplearon las palabras Química Verde se atribuyeron a Paul Anastas (miembro de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos) en 1991, este término ya había sido empleado en anteriores ocasiones como por ejemplo en 1978 por el investigador Trevor Kletz en uno de sus artículos donde hablaba de la búsqueda de procesos sostenibles y el empleo, de forma responsable, de los procesos químicos. [3]

Según estos autores, el diseño de procesos y productos respetuosos con el medio ambiente se debe basar en los 12 principios de la Química Verde, establecidos por Paul Anastas y John Warner, en su libro “Green Chemistry: Theory and Practice” en 1998, los cuales se enumeran en la *Tabla 2*.

Tabla 2. Enumeración de los 12 principios de la Química Verde. [4]

PRINCIPIOS DE LA QUÍMICA VERDE	
1	Prevención
2	Economía atómica
3	Uso de metodologías seguras para generar productos de baja toxicidad
4	Diseño de productos químicos seguros
5	Reducir la utilización de sustancias auxiliares (disolventes) e intentar que sean inocuas
6	Eficacia energética
7	Uso de materias primas de fuentes renovables
8	Evitar los derivados
9	Fomentar la catálisis
10	Generar productos biodegradables
11	Evitar la contaminación a través de metodologías analíticas en tiempo real
12	Prevenir/reducir el riesgo de accidentes químicos

La Química Verde está estrechamente relacionada con el Desarrollo Sostenible, término surgido en el informe “Nuestro Futuro en Común” por la ONU en 1987 ^[5] que se define como aquel progreso capaz de satisfacer las necesidades del presente sin comprometer los recursos del futuro, buscando un equilibrio entre lo económico, lo social y el medio ambiente. A raíz de esto, en 2015, se desarrolló la “Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible” que comprende 17 objetivos, que persiguen la igualdad entre las personas, la protección del planeta y asegurar la prosperidad. ^[6] Estos objetivos, como se muestra en la *Figura 1*, son el fin de la pobreza, hambre cero, salud y bienestar, educación de calidad, igualdad de género, agua limpia y saneamiento, energía asequible y no contaminante, trabajo decente y crecimiento económico, industria e innovación, reducción de las desigualdades, ciudades y comunidades sostenibles, producción y consumo responsables, acción por el clima, vida submarina, vida de ecosistemas terrestres, paz y justicia e instituciones sólidas y alianzas para lograr los objetivos.

Figura 1. Objetivos de Desarrollo Sostenible. ^[6]



El sector químico puede contribuir el logro de muchos de estos propósitos y, en este contexto, siguiendo las bases de la Química Verde, el Desarrollo Sostenible y los objetivos de la Agenda 2030, se propone el presente TFM que pretende el desarrollo y uso de nuevos materiales con actividad biocida que sean capaces de alargar la vida útil y de asegurar la calidad de los cítricos después de su recolección. Este estudio podría contribuir a desarrollar los objetivos 2 (hambre cero) y 3 (salud y bienestar) de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible y suponer un avance en la industria agroalimentaria.

1.2 Industria agroalimentaria

La industria agroalimentaria trabaja en la elaboración, transformación, preparación y envasado de productos alimentarios para su posterior consumo. Esta industria tiene contacto tanto con el sector primario, donde consigue las materias primas, por ejemplo, la agricultura o la ganadería, como con el sector terciario, aquel a donde van destinados los bienes finales obtenidos.

El sector agroalimentario no ha parado de crecer en los últimos años. Según el informe anual 2017-2018 de la industria alimentaria española realizado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, en la Unión Europea, la industria alimentaria es la principal actividad de la industria manufacturera y en 2018 alcanzó un valor superior a los 1.109.000 millones de euros de cifra de negocios, representando así el 13,8% del consumo. Cuenta con 294.000 empresas y 4,57 millones de empleados. Las pequeñas y medianas empresas representan el 48,1% del total de cifra de negocios del sector alimentario y el 61,3% del conjunto de los puestos de trabajo que genera. La industria alimentaria española ocupa el quinto puesto en valor de cifra de negocios con un 8,7%, por detrás de Reino Unido (10,7%), Italia (12,0%), Alemania (15,4%) y Francia (16,2%).

En España, según la Estadística Estructural de Empresas del INE realizada en 2018, la industria agroalimentaria desempeña un papel fundamental dentro de la economía, ocupando el primer puesto dentro del sector industrial, con un valor de producción de 113.593 millones de euros y representando el 18% de las personas ocupadas. El número de empresas de la industria de la alimentación es de 31.342, representando así el 15,1% de toda la industria manufacturera. Dentro de este sector, una de las industrias más importantes, es la relacionada con el mercado cítrico, que al ser la industria que trata este TFM, se desarrollará más extensamente en el punto siguiente.

1.3 La industria cítrica

Dentro del mercado de los cítricos, existen dos grupos claramente diferenciados, el mercado de fruta fresca y el mercado de cítricos procesados. El primero, consiste en vender la fruta en su estado natural, es decir, sin alterar su estado físico. El segundo, compra la fruta fresca y realiza transformaciones y modificaciones hasta llegar a otro subproducto, por ejemplo, el zumo o la mermelada. El consumo en fresco de los frutos es una de las características que determinan la citricultura española.

España figura entre los 10 primeros productores mundiales de cítricos, frutas y hortalizas. Ocupa la sexta potencia como productor de cítricos, y concretamente la sexta posición como productor de naranjas (tras Brasil, China, India, Estados Unidos, y México) y la segunda de mandarinas (tras China). La producción mundial de naranjas en la

campaña 2018-2019 llegó a alcanzar los 54,3 millones de toneladas, aumentando 6,3 millones de toneladas respecto al año anterior, debido principalmente a las condiciones meteorológicas muy favorables de los Estados Unidos y Brasil.

Atendiendo a la superficie cítrica cultivada en España, el naranjo supone un 48%, el mandarino un 38,1% y muy por detrás, estarían el limonero con un 12,6% y el pomelo con el 0,6%.

Según la FAO, España es el principal exportador de cítricos del mundo. Las zonas principales donde se concentra la producción son la Comunidad Valenciana, Andalucía y la Región de Murcia. Aproximadamente, se destina un 60% de lo que se produce a los mercados internacionales y del resto, el 20% se destina para consumo propio en fresco y el otro 20% se dirige a la industria del zumo y otros. Concretamente, la Comunidad Valenciana es la primera región española exportadora de cítricos, representando un 76% del total de España y este porcentaje se incrementa para mandarinas hasta un 86% y para naranjas en un 78%. En términos generales, el comercio internacional de las naranjas gira en torno a tres exportadores principales que representan aproximadamente el 60% de todo el comercio mundial, estos son España, Sudáfrica y Egipto.

Atendiendo al Boletín de Comercio Exterior de Cítricos de la campaña 2018-2019 de la Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios facilitada por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, la cantidad de cítricos exportados por España fue de 3.940.297 toneladas, con un valor de más de 3.000 millones de euros. El 91% de los cítricos tuvieron como destino el mercado de la Unión Europea, siendo la naranja el cítrico más exportado en volumen. En la *Tabla 3* se puede apreciar la evolución del comercio exterior de cítricos en España desde el año 2011 hasta 2018, haciendo referencia tanto a exportaciones como importaciones.

Tabla 3. Comercio exterior de cítricos de España. [7]

CAMPAÑAS	EXPORTACIONES (t)	IMPORTACIONES (t)
2011-2012	4.003.143	184.248
2012-2013	4.009.499	193.449
2013-2014	3.874.665	161.233
2014-2015	4.292.591	192.698
2015-2016	3.646.174	272.930
2016-2017	3.627.201	278.620
2017-2018	3.940.297	209.617

1.3.1 La recolección y el transporte de los cítricos

El momento de la recolección es de vital importancia en la industria cítrica, ya que afectará de forma crítica a la calidad final de la fruta. La mayor parte de los podridos

visibles tanto en los almacenes citrícolas como de cara al consumidor, son debidos mayoritariamente a los daños producidos durante la recolección, y es por ello por lo que se deben disminuir estas lesiones.

La recolección de los cítricos se realiza a mano. En algunos países es muy común realizarla a tirón, pero con esta técnica se suelen romper los tejidos, generando así un punto de ataque para los hongos fitopatógenos. Por ello, se ha de realizar empleando unos alicates específicos, con puntas curvadas y un realce en la contrahoja para que no raspe la fruta, que cortan el pedúnculo lo más corto posible a ras del cáliz y de esta forma se evita poder pinchar a otros frutos en el transporte.



Figura 2. Recolección de cítricos con un alicate específico para no dañar los frutos.

El trato del fruto debe ser cuidadoso para evitar producir golpes y lesiones que deriven a corto plazo en heridas o roturas y a largo plazo en manchas, que más tarde se convertirán en podredumbre por la acción de los hongos. Por este motivo, se debe evitar tirar desde una cierta altura los frutos al recipiente de cosecha, volcar sin cuidado alguno la fruta desde el recipiente de cosecha a las cajas de transporte y se debe procurar no apretar demasiado la fruta durante la recolección.

Los frutos que están en el suelo no deben de ser recolectados, ya que aparte de haber sufrido un impacto al caer del árbol y poseer ciertos tejidos más débiles también han estado en contacto con los hongos del suelo y pueden contagiar así al resto de frutos sanos.

La cosecha debe realizarse en el período adecuado y con la madurez suficiente, este último parámetro se determina mediante el índice de madurez (IM) del fruto y es uno de los aspectos más importantes en la recolección de cítricos.^[8] Los cítricos son frutos no climatéricos, por tanto, cuando se separan del árbol no continúan madurando y no pueden llegar a alcanzar el equilibrio entre la concentración de azúcares y acidez. En muchas ocasiones, el consumidor asocia la madurez con el color, y por este motivo se ha fijado un índice de color (IC) mínimo para cada variedad.

Otro factor importante son las condiciones climáticas. Es importante que la recolección no empiece hasta que la fruta esté completamente seca, ^[9] ya que sobre la piel mojada o con rocío, el recolector puede llegar a dejar los dedos marcados. ^[10] Además, el agua que haya absorbido la corteza hace que las glándulas oleíferas estén más turgentes y, por tanto, cualquier roce durante la recolección puede provocar su rotura y en consecuencia la salida de su aceite esencial, siendo este fitotóxico para el propio fruto, produciendo una vía de entrada para los patógenos.

Una vez los cítricos han sido recolectados, deben ser transportados lo antes posible al almacén atendiendo una serie de cuidados. Así, para evitar que se aplaste la fruta, la altura de llenado de las cajas no debe superar la altura de esta y las cajas deben estar bien sujetas. Además, el transportista debe llevar una velocidad adecuada para evitar demasiados roces entre los frutos.

1.3.2 Tratamiento de los cítricos recolectados

Cualquier proceso al que se someta a la fruta una vez recolectada, ya sea físico o químico, entre otros, se trata de un tratamiento postcosecha.

Los procesos productivos desarrollados en las centrales citrícolas difieren en función de la especie, variedad, época de recolección, especificaciones del cliente y destino comercial, aunque hay muchas etapas comunes desde que entra el producto hasta que sale para su comercialización.

A continuación, se van a describir las etapas más importantes para el procesado de los cítricos: ^[11]

I. Recepción de las materias primas

Se descarga la fruta del camión y se realiza un control inicial de la mercancía, comprobando la procedencia y el código de trazabilidad. Además, también se realiza al azar un control de calidad mediante una toma de muestra.

A continuación, los palés pasan por un dréncher para reducir al máximo los problemas de contaminación y controlar el podrido minimizando la proliferación de esporas de hongos. Se basa en un circuito cerrado de lavado que, aparte de agua y cloro, también puede contener fungicidas.

Después, el producto puede ser directamente almacenado hasta su procesado final o llevado a la cámara de desverdización, dependiendo de la época y estado de maduración del fruto. En las salas de desverdizado se deben tener en cuenta diversos parámetros, como la humedad relativa, la temperatura, la concentración de etileno y de dióxido de carbono.

II. Volcado y pre-selección

La primera operación realizada en la línea de confección es la despaletización y una vez se vuelcan los frutos en la cinta transportadora, se realiza una primera tría. Se eliminan los restos del campo, los frutos no aptos o que presenten defectos y podredumbres y los frutos aún no maduros, que volverán de nuevo a ser desverdizados.

III. Lavado y pre-secado

Los cítricos son lavados y desinfectados con agua y agentes de limpieza mediante balsas, duchas en cascada o duchas con difusores. Así se consigue eliminar al máximo la suciedad y los residuos depositados sobre la piel de la fruta. Tras el lavado, la fruta pasa por un túnel donde es pre-secada con aire a temperatura ambiente para eliminar así la humedad.

IV. Encerado y secado

Como consecuencia del lavado, los cítricos han perdido parte de su cera natural y es necesario su reposición para evitar que la fruta se deshidrate y pierda valor comercial. Por tanto, después del pre-secado los frutos pasan a la zona de encerado, donde son envueltos con ceras o recubrimientos comestibles, minimizando así la transpiración y la deshidratación, aportando brillo, retrasando la senescencia y preservando los frutos frente a los hongos y las bacterias.

Después de encerar, los frutos pasan al túnel de secado, dado que las formulaciones cerasas son emulsiones acuosas que tras su aplicación deben secarse para evaporar el agua y conseguir que se forme adecuadamente la película.

V. Tría, calibrado y envasado

Una vez secados, los frutos considerados aptos en la mesa de tría son calibrados y clasificados según volumen y diámetro. El envasado depende de la demanda de los consumidores. Normalmente se tienen dos situaciones distintas: el envasado con mallas o el envasado a granel.



Figura 3. Calibrador de rodillos. ^[11]

VI. Refrigeración y expedición

Todos los productos confeccionados, son trasladados a una cámara de pre-enfriamiento para que alcancen la temperatura de conservación y posteriormente se almacenan en la cámara de conservación hasta su expedición.

1.3.3 Ceras y recubrimientos comestibles

Para conseguir aumentar el periodo de comercialización del cítrico recolectado es fundamental la etapa de encerado mencionada en el apartado anterior.

El empleo de ceras se remonta al siglo XII-XIII, donde se sumergían los frutos en cera fundida. Después, se pasó a formular ceras solventes que se acabaron prohibiendo debido a sus problemas de aplicación. Finalmente se llegó a las ceras al agua, basadas, en su mayoría, en combinaciones de emulsiones céreas y disoluciones de resina. Las ceras son recubrimientos que se colocan en la superficie de las frutas con el objetivo de reponer las propiedades barrera de las ceras naturales propias del fruto, perdidas en la etapa de lavado, o de aumentarlas. Las ceras aportan brillo y tienen la función de disminuir la intensidad respiratoria del fruto generando así una barrera al oxígeno y al vapor de agua que evita la deshidratación.

Para la elaboración de ceras para cítricos y frutas en general se usan los aditivos alimentarios incluidos en el Reglamento (CE) n° 1333/2008, donde aparecen las materias primas que se pueden utilizar para recubrir las superficies de los cítricos y otro tipo de frutas, los cuales se muestran en la *Tabla 4*. Hoy en día, las más empleadas son las disoluciones de goma laca combinadas con emulsiones de polietileno, pero no son aplicables en las líneas ecológicas al ser este último de origen sintético. Como sustitución, se usan emulsiones a base de cera de carnauba que pueden estar combinadas con disoluciones de goma laca.^[12]

Tabla 4. Aditivos alimentarios autorizados en la UE para el tratamiento de la superficie de los cítricos frescos sin pelar. ^[13]

NÚMERO DE ADITIVO	DOSIS MÁXIMA LEGAL (mg/l o mg/kg)	DESCRIPCIÓN
E 200-203	20	Ácido sórbico y sorbatos
E 445	50	Ésteres glicéridos de colofonia de madera
E 901	Quantum satis	Cera de abeja blanca y amarilla
E 902	Quantum satis	Cera candelilla
E 903	200	Cera carnauba
E 904	Quantum satis	Goma laca
E 912	Quantum satis	Ésteres de ácido montánico
E 914	Quantum satis	Cera de polietileno oxidada
E 473-474	Quantum satis	Sucroésteres de ácidos grasos y sucroglicéridos

Los recubrimientos comestibles (RC) se definen como una delgada capa de material depositada alrededor del alimento a través de una pulverización o inmersión y que pueden consumirse como parte del producto. Con ellos se crea una atmósfera modificada en torno al fruto que proporciona una barrera semipermeable que tiene el objetivo de mantener la calidad nutricional y prolongar su vida útil.^[14] Los RC poseen buenas propiedades barrera frente al agua, el oxígeno, el CO₂, el etileno y la humedad. Además, mejoran el aspecto visual, manteniendo la firmeza y el color de las frutas.

Estos recubrimientos comestibles son de origen natural y poseen un grupo hidrofóbico (lípidos, ceras...) o un grupo hidrofílico (polisacáridos, proteínas...), pudiendo tener para mejorar su función, una combinación de ambos.^[15] Además, se les suelen añadir otros dos componentes importantes, los emulsificantes y plastificantes. Los plastificantes se añaden para mejorar la flexibilidad y la funcionabilidad de los recubrimientos, mientras que los emulsificantes se usan para favorecer la dispersión de los componentes en la matriz y reducir la actividad de agua en la superficie. Los recubrimientos comestibles se dividen principalmente en 3 tipos:

A. Hidrocoloides

Los hidrocoloides son polímeros hidrofílicos de origen animal, vegetal o sintético. Por lo general, se disuelven parcial o totalmente en agua y aumentan la viscosidad de la fase acuosa, actuando como estabilizador.^[16] Se dividen en dos clases, hidrocoloides a base de polisacáridos e hidrocoloides a base de proteínas.

- A base de polisacáridos

Estas cadenas de polímeros poseen excelentes propiedades de barrera gaseosa, pero malas propiedades frente a la humedad, ya que son solubles en agua. Dentro de este grupo se encuentran:

1. *Derivados de celulosa*: metil celulosa, hidroxipropil celulosa (HPC), hidroxipropil metil celulosa (HPMC), metil etil celulosa (MEC) y carboximetil celulosa (CMC), entre otros.
2. *Almidón y derivados*: el almidón es una macromolécula formada por dos polímeros distintos, la amilosa (25%) y la amilopectina (75%), cuya estructura molecular se puede observar en la *Figura 4*. Se obtiene a partir de cereales como el trigo, el maíz y el arroz, a partir de tubérculos como la patata o a través de las legumbres.
3. *Quitosano*: es un biopolímero de aminopolisacáridos que posee excelentes propiedades mecánicas y elevada viscosidad. Se elabora de forma comercial mediante la desacetilación parcial de la quitina, un elemento estructural que forma parte del exoesqueleto de los crustáceos (cangrejos, gambas, langostas, etc.) y de insectos.
4. *Gomas*: pueden ser extraídas a partir de vegetales terrestres o marinos y o de microorganismos y poseen la capacidad de incrementar la viscosidad en solución. Se clasifican de la siguiente manera:

- Gomas extraídas de plantas marinas, como el alginato, la goma agar, la goma carragenana.
- Gomas extraídas de semillas de plantas terrestres, como la goma aguar.
- Gomas obtenidas como exudados de plantas terrestres, como la goma arábica.
- Gomas obtenidas a partir de procesos microbiológicos como la goma xantana.
- Gomas obtenidas por modificación química de productos vegetales como las pectinas.

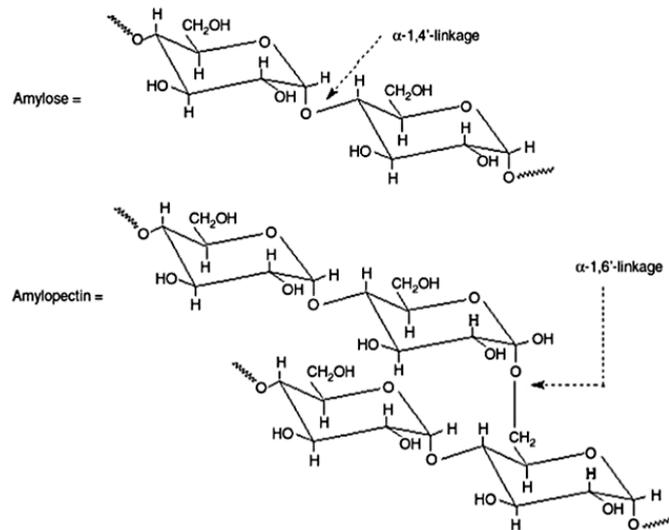


Figura 4. Estructura molecular de la amilosa y la amilopectina.

- A base de proteínas

El RC a base de proteínas posee excelentes propiedades frente al oxígeno y aromas, pero no es una buena barrera para el vapor de agua, debido a su naturaleza hidrofílica. Dentro de este grupo se encuentran por un lado las proteínas vegetales como son la zeína del maíz, el gluten del trigo y la proteína de la soja y por otro lado las proteínas animales como las proteínas del suero, la ovoalbúmina, el colágeno, etc. ^[16]

B. Lípidos

Los lípidos se caracterizan por ser no poliméricos e hidrofóbicos, con muy buenas propiedades barrera frente al agua, pero malas propiedades mecánicas, debido a su falta de cohesividad e integridad estructural que dan lugar a películas quebradizas.

Entre los materiales empleados para la formación de recubrimientos a base de lípidos están las ceras (abejas, carnauba y candelilla), las resinas, los monoglicéridos, los

diglicéridos y los ácidos grasos (ácido esteárico, palmítico, láurico y oleico, entre otros).^[17]

C. Combinaciones

Los revestimientos multicomponentes contienen una combinación de polisacáridos, proteínas y lípidos, con la finalidad de mejorar las propiedades mecánicas y barrera tanto al O₂ como al vapor de agua. Estos compuestos se pueden dividir en compuestos bicapa y en conglomerados. Los compuestos bicapa se basan en la combinación de dos capas de materiales iguales o diferentes (proteína/proteína, lípidos/lípidos, polisacáridos/proteína, lípidos/polisacáridos, etc.) y los conglomerados en la unión de más de dos componentes de diferente naturaleza.^[18]

Tanto en ceras como en recubrimientos, existe la posibilidad de incorporar aditivos alimentarios como agentes antimicrobianos y antioxidantes para evitar el crecimiento microbiano, retrasar el pardeamiento enzimático o la aparición de desórdenes fisiológicos.

1.3.4 Seguridad y calidad alimentaria de cítricos en postcosecha

La demanda por parte de consumidores y de instituciones de alimentos seguros y libres de contaminaciones obliga a tener un control exhaustivo de calidad y seguridad alimentaria. Respecto al concepto de calidad, hay una vinculación de los sistemas de gestión de calidad empresarial con los programas de calidad del producto.^[19]

La calidad en la gestión empresarial viene dada por las normas de la serie ISO, destacando la ISO 9001:2000 y la ISO 14001:2004 de Gestión Medioambiental. También es posible que se rija por la implementación de un sistema de autocontrol por parte de la empresa para detectar los puntos críticos respecto a sanidad e higiene del proceso de producción de los productos. Asimismo, los programas de calidad del producto están regidos por organismos tanto públicos como privados. Por un lado, está la Reglamentación de la Unión Europea, que ha establecido una serie de principios de carácter obligatorio para poder llegar a su propio mercado. A continuación, se van a enumerar algunos de ellos extraídos de AECOSAN, la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición:

- A. El Reglamento (CE) n° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo del 29 de abril de 2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios. Este reglamento y sus anexos definen una serie de objetivos de seguridad alimentaria que deben cumplir las empresas alimentarias. Mediante este, la Unión Europea (UE) pretende garantizar la higiene de los alimentos en todas las fases del proceso de producción, desde la fase de producción primaria, incluyendo también el transporte, la manipulación y el almacenamiento, hasta el consumidor final. Además, también se incluye la obligación por parte de los operadores de la empresa alimentaria de crear, aplicar y mantener

un procedimiento permanente basado en los principios del plan APPCC (Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control) del Codex Alimentarius, basado en prevenir posibles riesgos químicos, físicos o biológicos en toda la cadena de suministro.

- B. El Reglamento (CE) n° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo del 28 de enero de 2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y se fijan los procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. Es conocido como el Reglamento sobre la legislación alimentaria general y hace hincapié en la trazabilidad, tanto de alimentos importados a la UE o exportados desde ella. Se entiende por trazabilidad a la posibilidad de encontrar y seguir el rastro, a través de todas las etapas de producción, transformación y distribución de un alimento.
- C. El Reglamento (CE) n° 2536/98 de la Comisión de las Comunidades Europeas de 26 de noviembre de 1998 que modifica el Reglamento (CEE) n° 920/89 por el que se establecen normas de calidad para las zanahorias, los cítricos, las manzanas y peras de mesa. Respecto a los cítricos, se establece una definición del producto, las disposiciones relativas a la calidad (requisitos mínimos visuales, requisitos de madurez y clasificación), disposiciones relativas al calibrado (peso mínimo y homogeneidad), disposiciones relativas a la tolerancia (tolerancias de calidad y de calibre), disposiciones relativas a la presentación (homogeneidad y acondicionamiento) y disposiciones relativas al marcado del producto (identificación, naturaleza del producto, origen, características comerciales y marca oficial de control).

Por otro lado, están los estándares de calidad de organismos privados y, entre estos protocolos usados como certificaciones de calidad, destacan la norma IFS (International Featured Standard) creada por distribuidores alemanes, franceses e italianos; la norma BRC (British Retail Consortium) desarrollada por los británicos y GLOBALG.A.P. (Good Agricultural Practices).

1.4 Enfermedades postcosecha

Uno de los principales problemas que afectan a la industria citrícola son las enfermedades postcosecha de los productos que van a ser comercializados. Las infecciones de los frutos pueden ocurrir en cualquier etapa de su vida útil, antes de su cosecha, durante su cosecha o en postcosecha. Pero, en el caso de los cítricos, predominan los problemas desde que son recolectados hasta que llegan al consumidor, destacando las enfermedades causadas por hongos filamentosos patógenos que derivan en podredumbres. Así pues, conviene controlar en la medida de lo posible las condiciones del fruto en todo su ciclo y sobre todo en postcosecha para minimizar las pérdidas económicas. Los factores que determinan la incidencia de la enfermedad son

el microorganismo patógeno, el huésped y las condiciones del ambiente, que es lo que se conoce como triángulo de la enfermedad (Figura 5).

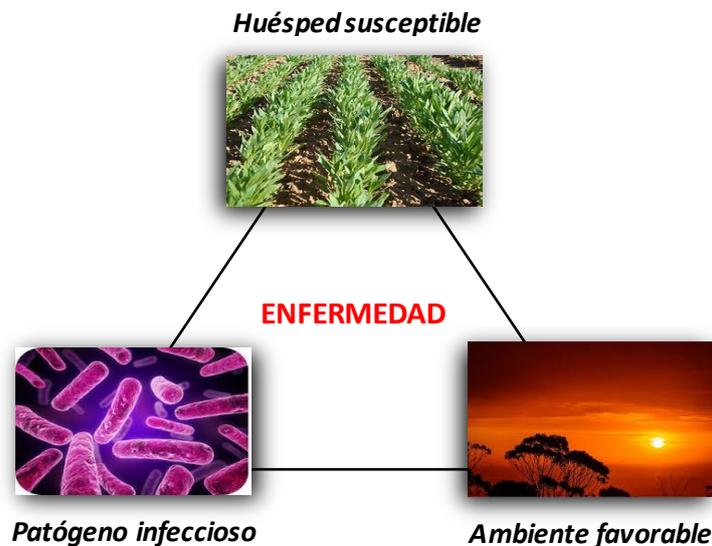


Figura 5. Triángulo de la enfermedad.^[20]

Las enfermedades de postcosecha en cítricos que causan podredumbres se clasifican en dos grupos atendiendo al momento de la infección. Por un lado, están las infecciones precosecha causadas mayoritariamente por los llamados patógenos latentes o quiescentes. Estos patógenos infectan el fruto en el campo, pero por diferentes razones, permanecen inactivos hasta después de la recolección, causando entonces la pudrición. Este conjunto engloba la podredumbre gris (*Botrytis cinerea*), la marrón (*Phytophthora citrophthora*), la negra (*Alternaria citri*), la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) y la podredumbre peduncular causada por los hongos *Lasiodiplodia theobroamae* y *Phomopsis citri*. Por otro lado, se tienen las infecciones postcosecha causadas por los patógenos de herida, donde la contaminación del fruto tiene lugar a través de microheridas o heridas producidas en la corteza. Por lo general, estas heridas tienen lugar durante la cosecha y posterior manipulación de la fruta, aunque también pueden ocurrir antes de la cosecha por acción de los insectos u otras causas abióticas. Dentro de este grupo se encuentra la podredumbre verde (*Penicillium digitatum*), la azul (*Penicillium italicum*), la amarga (*Geotrichum citri-aurantii*) y la podredumbre causada por el género *Rhizopus* (*Rhizopus stolonifer*).^[21]

El problema de la podredumbre comienza al diseminarse las esporas de los hongos. Estas se pueden encontrar tanto en el suelo del huerto como en las cámaras de almacenaje y pueden ser transportadas por corrientes de aire hasta llegar a contaminar a los frutos adyacentes. Si la corteza está intacta sin heridas, la infección no tendrá lugar, pero si posee lesiones y las condiciones ambientales son las idóneas, si qué se producirá

la infestación hasta colonizar los tejidos del fruto generando finalmente los síntomas de podredumbre.^[21]

Este trabajo se centra en combatir los patógenos de herida, concretamente los causantes de la podredumbre azul, verde y amarga.

1.4.1 *Penicillium italicum* y *Penicillium digitatum*

Las condiciones ambientales de España, con clima mediterráneo y donde son habituales los veranos poco lluviosos, favorecen las pérdidas producidas por los patógenos *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*, que causan respectivamente la podredumbre verde y azul (*Figura 6*), siendo el primero el patógeno más común y de mayor actividad reproductiva. La incidencia de ambas podredumbres es bastante elevada ya que generan aproximadamente un 80% del total de las pérdidas por podrido.^[22]



Figura 6. Podredumbre verde (izquierda) y podredumbre azul (derecha) en ensayos in vivo.

Se trata de hongos mesófilos que crecen en forma de filamentos y se reproducen asexualmente por conidias, llegando a generar en una sola fruta hasta 1-2 millones de estas. El aparato conidial que poseen es altamente frágil y suele deshacerse en bastantes elementos celulares, dispersándose así fácilmente por el aire. ^[23]

El *Penicillium digitatum* fue descrito y clasificado en 1881 por Pier Andrea Saccardo. Es capaz de germinar en los medios artificiales de agar extracto de malta (MEA) y agar dextrosa de patata (PDA), y las colonias que se forman son planas con el anverso de color verde oliva y el reverso de color amarillo opaco, como se puede apreciar en la *Figura 7*. Se puede desarrollar fácilmente a 20 °C y humedad relativa alta.

El *Penicillium italicum* fue descrito por Carl Friedrich Wilhelm Wehmer en 1894. Puede crecer entre 3 y 32 °C, aunque se desarrolla con más facilidad a 24 °C y humedad relativa alta. Hay que mencionar que, este hongo, además de poder crecer en MEA y PDA, también puede desarrollarse en agar de Czapek, aunque de forma más limitada. Las colonias que se producen son de color azul o gris verdoso, planas y con frecuencia de aspecto granular, visible en la *Figura 7*.

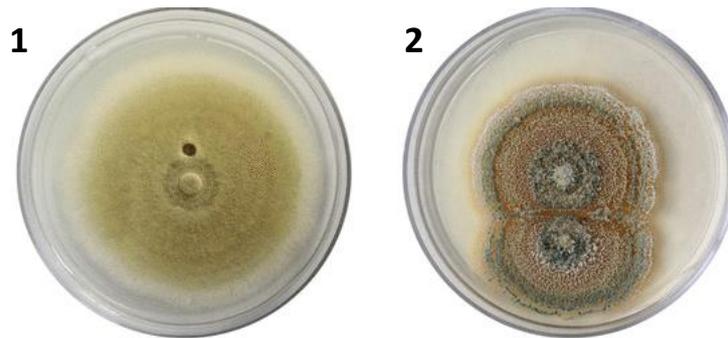


Figura 7. *Penicillium digitatum* (1) e *italicum* (2) en cultivo *in vitro* con agar PDA después de 10 días de incubación. [24]

En cuanto a la sintomatología de ambos patógenos, la infección suele ser percibida a simple vista pasadas unas 48 h. [25] El área circular que rodea a la herida de la corteza del fruto adquiere una decoloración más oscura y se puede hundir fácilmente con la presión del dedo, debido a que estos hongos liberan enzimas hidrolíticas (sobre todo poligalacturonasas y celulasas) que degradan la lignina reblandeciendo así los tejidos. [26]

Respecto a la esporulación, dependiendo de la carga microbiana, tiene lugar aproximadamente después de 3-5 días a temperaturas de incubación de 15-28 °C y se expande radialmente generando una capa coloreada de textura aterciopelada. El *P. digitatum* da una coloración verde oliva, rodeada por una banda ancha de micelio blanco y denso. El *P. italicum*, tiene un área de esporulación de un tono azul o azul verdoso y está rodeada por una banda fina de micelio blanco. Estas características se pueden apreciar claramente en la Figura 6.

Se ha demostrado que los compuestos volátiles y no volátiles de la piel de los cítricos estimulan la germinación y el crecimiento de *P. digitatum* y *P. italicum*. [25]

1.4.2 *Geotrichum citri-aurantii*

Otra podredumbre de herida que ocasionalmente puede ser importante es la podredumbre amarga, causada por *Geotrichum citri-aurantii*. La temperatura para su óptimo desarrollo es de 28 °C aproximadamente y también necesita una humedad relativa de entre 80-90%. La patogenicidad de *Geotrichum citri-aurantii* implica la secreción de endo-poligalacturonasas extracelulares (PG) que ayudan a la rápida descomposición de los tejidos infectados, facilitando la enfermedad y produciendo un reblandecimiento de la fruta. [27] El hongo se expande de forma radial y únicamente

adquiere un color marrón oscuro la zona que está más en contacto con la herida y no se produce ningún tipo de esporulación, como se observa en la *Figura 8*.



Figura 8. Geotrichum citri-aurantii en ensayos in vivo después de 7 días de incubación a 28 °C (elaboración propia).

1.5 Tratamientos biocidas

Con el fin de minimizar las enfermedades postcosecha mencionadas en el punto anterior, la industria cítrica emplea distintos tratamientos biocidas.

Se entiende por biocida cualquier sustancia o preparado que contenga una o más sustancias activas, destinadas a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo nocivo por medios químicos o biológicos. ^[1] Según el Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, estos materiales están divididos en 22 tipos de productos basados en su uso, que se pueden clasificar en cuatro grandes grupos (desinfectantes, plaguicidas, conservantes y otros biocidas). Estas sustancias, antes de ser admitidas en el mercado y con independencia del uso que se les vaya a dar, deben someterse a un proceso de evaluación para su registro, autorización y comercialización. ^[28]

En el Reglamento (UE) n° 528/2012 relativo a la comercialización y uso de biocidas, se presenta una lista exhaustiva de los tipos de biocida con una descripción de cada uno de ellos y su respectiva aplicación. Por lo general, un buen biocida debe tener las siguientes características: amplio rango de actividad (hongos, bacterias y virus), ser muy efectivos incluso en bajas cantidades, alta persistencia, fácil de neutralizar, efectivo a un amplio rango de pH, económico y de buena calidad, compatible con otras especies químicas en el medio, poca toxicidad humana y solubilidad en agua. ^[29]

El uso de biocidas es esencial en la industria alimentaria. Según informes de la FAO, aproximadamente un tercio de todos los alimentos producidos a nivel mundial se pierden o se desperdician. Esto significa que 100 kg/año y 680 mil millones de dólares

se tiran en países industrializados. Las frutas, las verduras, las raíces y los tubérculos son los alimentos que presentan las tasas más altas de pérdidas, estimadas en torno al 45% en 2018, y la parte principal de estas pérdidas se produce desde que se cosechan hasta que llegan al mercado. Los cambios fisiológicos y bioquímicos en los productos básicos, así como las posibles lesiones físicas en la cosecha y durante el almacenamiento prolongado, pueden favorecer el desarrollo de patógenos causantes de enfermedades, siendo esta una de las causas más importantes de pérdidas a través de la cadena de suministro.

La meta 12.3 de La Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible, pretende reducir a la mitad para 2030 el desperdicio de alimentos por cápita a nivel minorista y de consumo; y también reducir las pérdidas de alimentos a lo largo de las cadenas productivas y de suministro, incluidas las pérdidas posteriores a la cosecha. Por ello, es fundamental investigar en nuevos tratamientos biocidas sostenibles que consigan aumentar el tiempo de vida del alimento recolectado.

1.5.1 Biocidas convencionales

Durante muchos años, las enfermedades postcosecha en todo el mundo han sido controladas mediante la aplicación de fungicidas químicos sintéticos después de la recolección. Cuando la fruta es tratada con este tipo de fungicidas, las pérdidas varían entre el 2 y el 4 %, mientras que cuando no se realiza el tratamiento postcosecha o únicamente se almacena en refrigeración, las pérdidas se pueden llegar a incrementar hasta un 15 o 30 % del total de la fruta cosechada. ^[30] Estos materiales pueden tener diferentes funciones: proporcionar un efecto rehabilitador contra infecciones preexistentes, un efecto preventivo contra posibles nuevas infecciones o bien proporcionar una inhibición de la esporulación que genera la ruptura de los ciclos de infección. ^[21]

La eficacia de un fungicida viene dada por el tiempo y modo de aplicación en el fruto (ducha, inmersión o aerosol), su composición y concentración, su pH y temperatura en el momento de usarlo, así como la especie y la variedad de la fruta sobre la cual se va a aplicar. ^[31]

Los fungicidas autorizados en la UE están regulados por el Reglamento (CE) 1107/2009, que deroga las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE. La aprobación de un producto fungicida supone la realización de una estricta evaluación de riesgos. ^[32] Actualmente, los límites máximos de residuos (LMR) plaguicidas de todos los países de la UE están en armonía, estableciendo el Reglamento 396/2005 referido a los límites máximos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen animal y vegetal. Su anejo II recoge los LMR's ya establecidos y armonizados, mientras que el anejo III recoge los LMR's temporales de aquellos que todavía no están armonizados. ^[33] En la *Tabla 5*, se

puede observar la situación actual de los fungicidas que se pueden usar y comercializar en la postcosecha de cítricos en la Unión Europea y en la *Tabla 6*, se pueden apreciar los límites máximos de residuos (LMR) correspondientes a cada fungicida expresados como mg/kg o ppm, tanto en la UE como en países terceros.

Tabla 5. Estado actual de los fungicidas en postcosecha de cítricos en la UE. ^[34]

FUNGICIDA	INCLUSIÓN	CADUCIDAD
Fludioxonil	1/11/2008	31/10/2020
Fosetil-Al	1/05/2007	30/04/2021
Imazalil	1/01/2012	31/12/2024
Metil-tiofanato	1/03/2006	No definida la inclusión
Ortofenilfenol	1/01/2010	31/12/2021
Pirimetanil	1/06/2007	30/04/2021
Propiconazol	1/06/2004	No renovación
Tebuconazol	1/09/2009	30/06/2020
Tiabendazol	1/04/2017	31/03/2032

Estos fungicidas, por lo general, se aplican en las centrales citrícolas como disoluciones acuosas mediante un sistema de ducha dréncher tras la recepción de la materia prima del campo o también a través de balsas o duchas en la línea de confección, como se ha mencionado en el apartado anterior. Sin embargo, el ortofenilfenol, el imazalil y el tiabendazol también se pueden aplicar en las líneas de confección, recubriendo la fruta al incorporarlos a las ceras, siguiendo el Reglamento (CE) 1107/2009. Además, el imazalil puede aplicarse en forma gaseosa mediante botes fumígenos. ^[32]

Tabla 6. Límites máximos de residuos fungicidas en postcosecha de cítricos (mg/kg). ^[35]

PLAGUICIDA	UE		PAÍSES TERCEROS		
	Establecido	Temporal	SUIZA	USA	CANADÁ
Fludioxonil	10		10	10	10 NML
Fosetil-Al		75 (1)	75 (1)	9	9 NML
Imazalil	5		5	10	5
Metil-tiofanato	6 NMLP (2)		6 (2)	-	10 (3)
Ortofenilfenol	10		5	10	10
Pirimetanil	8		8	10	10 NML
Propiconazol	9 N/5MLP		6	8	8 NML
Tebuconazol	0,9 N/5MLP		-	1N	1NM
Tiabendazol	7		5	10	10

(1) Suma de fosetil, ácido fosfónico y sus sales, expresado como fosetil.

(2) Puede dar como metabolito carbendazima, que tiene un LMR de 0.2 en naranjas (N) y pomelos (P), y 0.7 en mandarinas (M) y limones (L), tanto en la UE como en Suiza. No se tolera en USA en frutos cítricos.

(3) Conjuntamente residuos de metil tiofanato y carbendazima.

Para luchar contra la podredumbre verde y azul, tradicionalmente se han empleado los fungicidas de síntesis química como el imazalil o el tiabendazol. [36] Recientemente, se ha incluido como parte de fungicidas autorizados el pirimetanil, [37] aunque, han empezado a aparecer cepas resistentes a ambos compuestos. Así, se ha detectado en los últimos años, que un porcentaje aproximado del 30% de *P. digitatum* aislados son resistentes al imazalil y en Cataluña también se han identificado varias cepas aisladas de ambas especies resistentes al tiabendazol. [38]

El tratamiento tradicional para el control de *Geotrichum citri-aurantii* hasta el día de hoy se ha basado también en los fungicidas sintéticos. En este caso, a diferencia del género *Penicillium*, el tiabendazol y el imazalil no sirven para combatir la podredumbre amarga, dado que muchas cepas son resistentes a varios ingredientes activos de su composición. [39] También se ha detectado que el o-fenilfenato de sodio y la guazatina tienen efecto sobre la enfermedad, pero su uso se encuentra restringido por presentar riesgo de fitotoxicidad y ser un peligro para la seguridad humana. [40,41] Por último, el propiconazol, era el único fungicida en activo contra esta infección, pero a partir del 19 de marzo del 2020 se ha prohibido su uso en los países de la Unión Europea debido a un estudio realizado por “European Food Safety Authority”, lo que supone una desventaja respecto a otras citriculturas en las cuales sí puede utilizarse este compuesto activo. [41] Así pues, en la actualidad, no se dispone de ningún fungicida específico, válido y eficaz contra *Geotrichum citri-aurantii*.

Sin embargo, la aplicación de forma continuada de fungicidas da lugar a la generación de un exceso de residuos químicos, obliga al tratamiento de los caldos residuales para evitar la liberación de dichos residuos químicos al medioambiente y puede dar lugar al desarrollo de cepas patogénicas resistentes a los tratamientos. Esto ha generado mucha preocupación en la población y por este motivo, se ha establecido a nivel legislativo la Directiva 2009/128/CE relativa al uso sostenible de los plaguicidas. Según esta Directiva, los Estados miembros han de adoptar Planes de Acción Nacionales, PAN, mediante los cuales se reducen los posibles riesgos y efectos sobre el medioambiente y la salud humana. La Directiva también obliga a la Gestión Integrada de Plagas, GIP. Esta estrategia de control consiste básicamente en la aplicación racional de unas medidas biológicas, químicas, biotecnológicas, de cultivo o de selección de cultivo, intentando minimizar el uso de fitosanitarios. [42]

El empleo de fungicidas convencionales también se ve influenciado por una continua alteración en la tendencia de la comercialización de productos hortofrutícolas.

Por una parte, el volumen de productos ecológicos y orgánicos en el mercado ha aumentado considerablemente y en ellos se exige la ausencia total de residuos químicos en el producto final, lo que impide el uso de fungicidas químicos. Por otra parte, algunos supermercados y cadenas alimentarias establecen LMR's más restrictivos que los establecidos por la legislación. Según el supermercado, se establece un máximo de entre 3 y 5 sustancias activas en la fruta, incluyendo aquí los posibles residuos fitosanitarios aplicados en el campo, lo que dificulta el uso de fungicidas convencionales. ^[42]

Por último, cabe mencionar otro aspecto importante que afecta a los fungicidas químicos de postcosecha. Su síntesis requiere un largo período de tiempo y es un proceso costoso, por tanto, a las empresas que los fabrican les resulta poco rentable.

1.5.2 Estrategia CINCEP

Los inconvenientes descritos en el apartado anterior respecto a los controles químicos convencionales muestran la necesidad de encontrar nuevas opciones para el control de enfermedades postcosecha de cítricos, es por ello por lo que desde hace ya unos cuantos años, muchas empresas privadas y centros de investigación se han puesto manos a la obra para dar con tratamientos antifúngicos sustitutos. Estos nuevos agentes deben ser poco tóxicos, no contaminantes y presentar una actividad fungistática, es decir, suspender el crecimiento y desarrollo de los hongos o la germinación de sus esporas, a diferencia de los fungicidas tradicionales que matan a los fitopatógenos. No obstante, hay que tener en cuenta que su capacidad de actuación puede verse alterada por factores externos, lo cual supone una dificultad para su uso comercial debido a la alta variación de su respuesta. Atendiendo su mecanismo de acción pueden ser o bien curativos para controlar infecciones fúngicas ya existentes o bien preventivos para proteger al fruto y según su naturaleza pueden ser físicos, químicos o biológicos. ^[42]

Han aparecido investigaciones sobre estos nuevos agentes, pero estos han mostrado que la persistencia, el espectro de acción o la efectividad, tanto de forma unitaria como combinada, son menores a los ofrecidos por los fungicidas convencionales. Por ello, el control adecuado de las enfermedades no puede centrarse únicamente en la aplicación de estos tratamientos antifúngicos después de la cosecha, sino que debe basarse en una táctica de control más amplia. De aquí nace la estrategia CINCEP, Control Integrado No Contaminante de Enfermedades de Postcosecha. Esta estrategia se basa en el entendimiento de la epidemiología de los patógenos y de los factores que determinan su incidencia en precosecha (cultivo, condiciones climatológicas y de parcela, manejo en campo...), cosecha (momento, modo...) y postcosecha (higienización de centrales, diseño de instalaciones, manejo en las líneas de confección, condiciones de conservación y comercialización, mercado de destino...) para incidir de forma conjunta sobre el problema, actuando en el momento adecuado

sobre cada uno de estos factores con el objetivo de minimizar las pérdidas económicas. Esto requiere grandes esfuerzos y la apertura de muchos frentes de investigación, tanto de carácter general como particular, con el objetivo de innovar y crear nuevos conocimientos. Con la estrategia CINCEP se obtendrían productos hortofrutícolas con los sellos de calidad de “Residuo Cero” y también sería aplicable a sistemas de producción ecológica. ^[37] El trabajo de este TFM pretende contribuir al desarrollo de esta estrategia.

2. OBJETIVOS

En base a la situación descrita y a los problemas planteados, el objetivo principal de este proyecto es el desarrollo de materiales con actividad biocida basados en componentes de origen natural y su posterior aplicación en cítricos, con la finalidad de controlar el crecimiento de los hongos y conseguir así retrasar su putrefacción y alargar la vida útil. Para ello, se plantean los siguientes objetivos e específicos:

- Hacer un estudio bibliográfico exhaustivo de las posibilidades de uso de procedimientos alternativos a fungicidas convencionales.
- Sintetizar y caracterizar diversas sustancias biocidas basadas en aceite esencial de tomillo soportado sobre materiales zeolíticos y arcillosos.
- Preparar recubrimientos alimentarios a los que se incorpora dicho soporte impregnado.
- Aplicar y estudiar *in vivo* la actividad de las sustancias biocidas incorporadas en recubrimientos alimentarios en mandarinas contra los hongos fitopatógenos más comunes que se desarrollan en cítricos (*Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Geotrichum citri-aurantii*).

3. ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO DE PROCESOS ALTERNATIVOS AL USO DE FUNGICIDAS TRADICIONALES

La finalidad de este TFM es estudiar el uso de nuevos materiales con actividad fungicida que constituyan una alternativa a los procesos químicos utilizados actualmente. Por ello, el primer objetivo de este trabajo es realizar un estudio bibliográfico exhaustivo de los procedimientos alternativos a los fungicidas convencionales aplicado a cítricos.

Esta línea de investigación es considerada en todo el mundo como una estrategia CINCEP y busca desarrollar tratamientos postcosecha antifúngicos y no contaminantes alternativos a los fungicidas de uso convencional. Estos procedimientos se pueden clasificar según su naturaleza en físicos, biológicos y químicos de bajo riesgo.

3.1 Métodos físicos

El uso de tratamientos físicos no deja ningún tipo de residuo en los frutos tratados y tiene un impacto minúsculo para el medio ambiente. Dentro de estos procedimientos despuntan los tratamientos por calor como el curado y el empleo de agua caliente, las radiaciones ionizantes y no-ionizantes y las atmósferas controladas (convencionales, hipobáricas y ozonizadas) y modificadas. ^[43]

Los tratamientos por calor o las irradiaciones tienen la finalidad de reducir la incidencia de podredumbres, en cambio, la conservación frigorífica con atmósferas controladas únicamente ejerce una acción fungistática de inhibición o retraso de crecimiento de los patógenos, es decir, no tienen actividad fungicida siendo así tratamientos complementarios. ^[44]

3.1.1 Tratamientos con calor

La inmersión en agua caliente y los tratamientos con aire caliente a temperaturas superiores a 40 °C e inferiores a 60 °C, de unos segundos a varias horas, han ofrecido resultados prometedores para controlar patógenos en diversas frutas, como manzanas, peras, cítricos, melones, plátanos y bayas. ^[45] Los efectos que poseen estos tratamientos pueden ser de carácter directo e indirecto. Los efectos directos, pueden producir la elongación del tubo germinativo de los conidios o la inhibición de la germinación de las esporas y damnificación de las hifas fúngicas en crecimiento. Los efectos indirectos hacen referencia a la estimulación de resistencia del fruto huésped hacia la infección problema, ^[46] mediante la formación de sustancias como la escoparona y la esopoletina de carácter bacteriostático y farmacológico, ^[47] proteínas como la quitinasa o la β -1,3-glucanasa relacionadas con la patogénesis ^[48] o la inhibición de la síntesis de enzimas hidrolíticas de la pared celular como las poligalacturonasas. ^[46]

3.1.1.1 Tratamientos con aire caliente o curado

Se trata de un método por el cual, una vez llegados los frutos a la central citrícola tras la recolección, se almacenan a una humedad relativa superior al 90% y una temperatura mayor de 30 °C, en períodos de 1 a 3 días. Esta técnica no se está empleando mucho a nivel comercial dado su elevado coste y, además, puede tener efectos adversos sobre la fruta, disminuyendo su calidad debido a un exceso de calor que genera fitotoxicidades o pérdidas de peso. [49]

3.1.1.2 Tratamientos con agua caliente

En cítricos, los tratamientos con agua caliente se pueden aplicar durante la postcosecha, ya sea sumergiendo el fruto en agua caliente o rociándolos con agua caliente mientras se mueven en la línea transportadora. Con esta metodología se pueden lograr los efectos beneficiosos ofrecidos por el curado de forma más barata y simple. El tiempo de aplicación del tratamiento térmico depende de la temperatura del agua, usándose en cítricos temperaturas del agua que van desde 40 °C a 65 °C. [50]

A pesar de ser tratamientos efectivos tanto para la podredumbre verde como azul, tienen poca persistencia y hay poco margen de actuación entre las temperaturas óptimas y las que pueden causar daños definitivos en la superficie. Por ejemplo, temperaturas superiores a 53 °C pueden resultar fitotóxicas y por este motivo, deben realizarse experimentos de optimización para determinar la temperatura del agua y el período de tratamiento. [51]

3.1.2 Irradiaciones

Varios estudios han señalado que la aplicación tanto de irradiaciones no ionizantes (UV-C, UV-B, luz azul) como ionizantes (rayos gamma, β y X) tienen el potencial de reducir la cantidad de enfermedades fúngicas en los cítricos, dependiendo esto del tipo de irradiación y de su capacidad de penetración. [52]

3.1.2.1 Radiaciones ionizantes

Las radiaciones ionizantes, pueden ser obtenidas a partir de fuentes radioactivas que emiten dichas radiaciones de forma espontánea (rayos gamma) o a través de generadores artificiales (generadores de rayos X) o aceleradores de partículas (rayos β o electrones acelerados).

- Rayos Gamma

Hasta la fecha de hoy, los irradiadores gamma utilizan el cobalto-60 o el cesio-137 como fuentes radiactivas, siendo el cobalto-60 el más usado. A bajas dosis es capaz de retardar la maduración del fruto inhibiendo la producción de etileno y la tasa de respiración y es un tratamiento prometedor para reducir la decadencia de cítricos postcosecha gracias a sus efectos perjudiciales sobre la fisiología fúngica y su capacidad de penetración. [53] La eficiencia de este método está vinculada a la radiosensibilidad de cada patógeno. Se ha investigado recientemente el efecto de la irradiación gamma en el crecimiento del moho verde en cítricos y se ha encontrado que el crecimiento fúngico era inhibido, pero este dependía de la dosis aplicada. Aunque una dosis de 1 kGy puede inhibir perfectamente el crecimiento de *P. digitatum*, no es posible su aplicación, dado que genera fitotoxicidad causando manchas y daños en la superficie de los cítricos. [52]

Así pues, este método no se ha generalizado como técnica de control de enfermedades dado que, a dosis no fitotóxicas, es decir, inferiores a 1 kGy, su poder de penetración y su efectividad en el fruto son limitados y no se compensa el elevado coste de las instalaciones. [54] Como alternativa se propone utilizar dosis de menor cantidad, como por ejemplo de 0,25-0,50 kGy, en combinación con otros tratamientos complementarios. [49]

- Rayos X

Los rayos X son radiaciones electromagnéticas de menor energía que los rayos gamma, con frecuencias de 10¹⁶-10¹⁹ Hz. [55] Se han realizado algunos estudios que investigan el efecto de la irradiación de rayos X en el control de mohos verdes y azules en cítricos. Concretamente, un estudio demostró que la irradiación con rayos X (510 y 875 Gy) en mandarinas intactas aumenta la biosíntesis en la corteza de fitoalexina escoparona y escopoletina, ambas sustancias relacionadas con la resistencia que ofrece el fruto al ataque de un patógeno. Se inoculó *Penicillium digitatum* en clementinas y se irradiaron con 510 Gy y se observaron mayores niveles de escoparona y escopoletina que en los frutos no irradiados y además se inhibió el moho verde. Por el contrario, un tratamiento de irradiación a 875 Gy presentó fitotoxicidad y no indujo la producción de fitoalexinas ni previno el moho verde en las heridas de la corteza. [56]

- Haces de electrones de alta energía

Los haces de electrones se generan a partir de fuentes mecánicas como un acelerador lineal o un generador Van de Graaff a velocidad próxima a la luz, pero debido a la pequeña cantidad de electrones generados, estos no pueden penetrar profundamente en un producto. Sin embargo, los aceleradores de electrones parecen

ser más usados que los rayos gamma debido a que no requieren reabastecimiento de la fuente radioactiva, no generan residuos radiactivos y presentan una aplicabilidad en la irradiación de alto flujo y dosis altas. Así y todo, tienen algunas desventajas, como que la profundidad de penetración es solo superficial. [55] Algunos científicos han llevado a cabo estudios recientemente para evaluar el efecto de la irradiación por haz de electrones en la calidad de las mandarinas. En un estudio concreto, se determinaron las cualidades microbiológicas y fisicoquímicas de mandarinas irradiadas con un haz electrónico de 0.4 y 1 kGy y ambas cifras resultaron ser óptimas para controlar la proliferación microbiana (bacterias aerobias totales, levaduras y mohos), pero el tratamiento con 1 kGy disminuía la calidad del fruto. [57]

Sin embargo, antes de que estos métodos se apliquen comercialmente, debe superarse la desconfianza de los consumidores con respecto a los alimentos irradiados.

3.1.2.2 Radiaciones no ionizantes

- Irradiación UV

La luz ultravioleta es un tipo de radiación electromagnética dividida en UV-C (100-280 nm), UV-B (280-315 nm) y UV-A (315-400 nm) y es percibida fácilmente por los fotoreceptores de los tejidos vegetativos, regulando así las vías metabólicas. Los cítricos se tratan poniéndolos debajo de una lámpara UV durante un tiempo específico, desde segundos hasta horas. [58] La intensidad UV que alcanza la superficie del fruto depende de la distancia que haya entre la lámpara UV y la fruta, así como del tiempo que la lámpara está encendida. [59]

Tanto la irradiación UV-C como la UV-B han sido ampliamente estudiadas para la prevención de podredumbres cítricas, y la eficacia del tratamiento UV depende de múltiples factores como pueden ser el período de cosecha, la fase de madurez del fruto, la profundidad de infección en la piel, el tipo e intensidad de irradiación, la temperatura de almacenamiento durante las primeras 24 horas después del tratamiento UV, etc. [60]

Se ha informado que la irradiación UV-C a 8 KJ/m² reduce significativamente la descomposición causada por mohos verdes y azules en naranjas, pero a mayores intensidades afecta negativamente a la calidad del fruto. [59]

También se ha publicado que la irradiación UV-B en limones genera un engrosamiento de las paredes celulares creando una barrera para el patógeno y adicionalmente, se acumulan metabolitos secundarios en el flavedo de la fruta con actividades antifúngicas, como polifenoles y fitolexinas. [58] Además, se han evaluado con el mismo propósito otro tipo de irradiaciones, como son la radiofrecuencia, las ondas microondas y los pulsos de luz. El tratamiento con luz pulsada consiste en aplicar pulsos sucesivos de luz de 325 μ s, utilizando un espectro de luz emitida que va desde el

ultravioleta (200 nm) hasta el infrarrojo próximo (1000 nm). La eficacia y la cinética de inactivación microbiana de este método es mayor que la ofrecida utilizando luz ultravioleta en continuo. ^[61]

- Luz azul

La luz azul pertenece a la parte del espectro visible (400-500 nm) y regula varios procesos metabólicos en tejidos. Varios estudios han mencionado que la luz azul podría aplicarse para el control de *P. digitatum* y *P. italicum*. ^[62,63]

Aunque el mecanismo exacto de acción biocida de la luz azul todavía no se ha aclarado completamente, se podría suponer que la luz azul tiene un efecto directo en la fisiología fúngica y/o un efecto indirecto sobre la resistencia del fruto a los hongos produciendo metabolitos secundarios en el flavedo de los cítricos. ^[63]

3.1.3 Atmósferas controladas

Las atmósferas controladas son sistemas físicos complementarios al mantenimiento frigorífico. Consisten en cambiar la atmósfera de gases que rodea al producto. Mientras que el frío ralentiza la actividad metabólica del fruto y retrasa su entrada en la senescencia manteniendo así la resistencia natural que posee el fruto a la infección, las atmósferas controladas ejercen una actividad fungistática de inhibición o retraso del crecimiento de los hongos patógenos.

- Atmósferas controladas convencionales

Este tipo de conservación frigorífica se realiza en una atmósfera con un 5-10% de oxígeno y un 0-5% de dióxido de carbono en naranjas y no se ha diversificado su uso dado que no está igualado el coste de las instalaciones con los beneficios que aporta respecto al alargamiento de la vida fisiológica del fruto.

- Atmósferas controladas hipobáricas o de baja presión

Este método trabaja a presiones situadas entre 75 y 175 mmHg y no difiere mucho en las ventajas aportadas por la técnica anterior. ^[64]

- Atmósferas controladas ozonizadas

Esta técnica es de gran interés, no genera un coste adicional excesivo y emplea ozono (O₃) como gas altamente oxidante. Este gas puede resultar dañino para el ser humano, corrosivo para muchos materiales y fitotóxico para los frutos y es por ello, que es muy importante vigilar las concentraciones de gas generadas dentro de las cámaras frigoríficas, así como adoptar todas las medidas de seguridad necesarias.

Se ha demostrado que no es capaz de controlar las infecciones provocadas por *Penicillium spp.* y, por tanto, no puede ser una forma de sustituir a los fungicidas tradicionales en las líneas de confección o en el dréncher. Pero, la ozonización intermitente o continua en las cámaras frigoríficas puede inhibir el crecimiento del micelio y la esporulación reduciendo así la carga de inóculo fúngico, aunque este efecto cesa cuando el ozono deja de estar presente en el ambiente. ^[65] También hay que tener en cuenta que el ozono gaseoso no puede traspasar ni los plásticos y/o los cartones por lo que los frutos deben estar almacenados en envases de gran superficie abierta como cajas o contenedores de campo. ^[66]

3.2 Métodos biológicos

El control biológico de enfermedades vegetales es una alternativa prometedora al uso de los fungicidas convencionales y su uso ha ido en aumento en la última década. ^[67] Se basa en la utilización controlada de microorganismos que antagonizan con los microorganismos patógenos y, por tanto, en este grupo no se incluyen ni la obtención de cultivares del huésped resistentes a las enfermedades ni el uso de sustancias naturales derivadas de plantas o animales. Por lo general, los organismos antagonistas se fijan sobre los frutos como suspensiones acuosas a través de inmersiones en baño o dréncher.

El modo de acción de estos competidores consiste en competir por los nutrientes y/o el espacio, ^[68] secretar antibióticos, ^[69] inducir una serie de defensas relacionadas con la actividad enzimática que pueden activar los mecanismos de protección dentro del huésped y contribuir a la biosíntesis de los compuestos antimicrobianos ^[70] o bien puede ser parasitismo directo. ^[71]

La relación biológica existente entre los antagonistas y los patógenos es, normalmente, bastante específica y por esto, este tipo de método muestra ventajas importantes respecto a los sistemas físicos y químicos. La supervivencia y efectividad tanto en condiciones ambientales como en cámaras frigoríficas y la capacidad de colonizar las heridas de la piel, son varios de los factores que determinan la posibilidad de usar un antagonista contra un patógeno. Un microorganismo como antagonista debe cumplir como mínimo con unas pautas: ser eficaz a bajas concentraciones, genéticamente estable, compatible con procesos comerciales como el encerado, no ser ni él ni sus metabolitos perjudiciales para el hombre y no ser un patógeno en la fruta. ^[72]

Se están realizando avances significativos en la exploración de microorganismos antagonistas como agentes potenciales de control biológico (ACB). Se ha notificado el uso de varias levaduras como ACB contra patógenos en post-recolección como se aprecia en la *Tabla 7* y también se han comercializado varios productos visibles en la *Tabla 8*.

Tabla 7. Algunas levaduras antagonistas probadas. [73]

LEVADURAS ANTAGÓNICAS	PATÓGENOS DIANA
<i>Pichia caribbica</i>	<i>Penicillium expansum</i>
<i>Pichia guilliemondii</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Metschnikowia fructicola</i> , <i>Candida oleophila</i> y <i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i> PL1	<i>Penicillium digitatum</i> , <i>Penicillium expansum</i>
<i>Rhodosporidium kratochvilovae</i> , <i>Cryptococcus laurentii</i> y <i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Candida sake</i>	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Botrytis cinerea</i>

Tabla 8. Productos de biocontrol basados en microbios comercializados con sus respectivos patógenos específicos. [73]

PRODUCTO DE CONTROL BIOLÓGICO	MICROORGANISMO BASE	CULTIVO DIANA	PATÓGENO DIANA
Aspire	<i>Candida oleophila</i>	Cítricos	<i>B. cinerea</i> , <i>Penicillium</i> spp.
Shemer	<i>Metschnikowia fructicola</i>	Uva de mesa, fresa	<i>B. cinerea</i> , <i>Penicillium</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp.
BOTRY-Zen	<i>Ulocladium</i>	Uvas, grosellas negras, kiwis	<i>Botrytis cinerea</i>
Pomavita	<i>Pantoea agglomerans</i>	Manzanas, peras	<i>Erwinia amylovora</i>
BlossomBless	<i>Pantoea agglomerans</i>	Manzanas, peras	<i>Erwinia amylovora</i>
Biosave 100/110	<i>Pseudomonas syringae</i> Van Hall	Manzanas, cítricos	<i>B. cinerea</i> , <i>Penicillium</i> spp., <i>Mucor</i> spp.
Yieldplus	<i>Cryptococcus albidus</i>	Manzanas, peras	<i>B. cinerea</i> , <i>Penicillium</i> spp, <i>Mucor</i> spp.
Nexy	<i>C. oleophila</i>	Frutas pomáceas	<i>B. cinerea</i> , <i>Penicillium</i> spp.
BoniProtect	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Frutas pomáceas	<i>B. cinerea</i> , <i>Penicillium</i> spp., <i>Monilinia</i> spp.

A continuación, se van a enumerar algunos ejemplos de estudios realizados recientemente para el control de las podredumbres más comunes en cítricos mediante métodos biológicos.

Se ha realizado un estudio para evaluar la eficacia del microorganismo *Yarrowia lipolytica* contra la podredumbre verde y azul en mandarinas. Los resultados mostraron que esta levadura es capaz de inhibir el crecimiento de *P. digitatum* y *P. italicum*, ya que disminuye la incidencia y el diámetro de lesión de las mandarinas de acuerdo con la dosis empleada. Las pruebas *in vitro* demostraron que la levadura inhibió la germinación de

esporas y la longitud del tubo germinal de ambos hongos. También se apreció mayor actividad de polifenol oxidasa, peroxidasa, catalasa, fenilalanina amoniaco liasa, y aumentó el contenido de compuestos flavonoides y fenoles totales, que activaron los mecanismos de defensa de las mandarinas. El tratamiento no tuvo efectos secundarios sobre los parámetros de calidad de las mandarinas y, por tanto, esta levadura podría ser una antagonista prometedora para controlar este tipo de podredumbres. [74]

Otro estudio llevado a cabo analiza los mecanismos de acción y biocontrol de *Bacillus spp.* w176 contra el moho verde. Se demostró que podía reducir eficazmente la incidencia de la enfermedad en un 89,3% y el diámetro de la lesión. Además, el efecto de inhibición generado era comparable con el fungicida prochloraz después de tres meses de almacenamiento. [75] Contra *Penicillium digitatum* también se han realizado ensayos con limones empleando la cepa 146 de la levadura *Clavispora lusitaniae* y los resultados mostraron la capacidad de dicha levadura para colonizar las heridas en los limones e inhibir la germinación de las esporas. [76]

Para combatir la podredumbre ácida, se ha realizado un estudio empleando la cepa FL01 de la levadura *Metschnikowia citriensis*. Se llegó a la conclusión de que podría utilizarse como alternativa potencial a fungicidas convencionales para controlar dicha enfermedad, dado que *M. citriensis* podía inhibir el crecimiento micelial y la germinación de esporas de *Geotrichum citriauranti*, inducir la resistencia de la fruta y además colonizar rápidamente las heridas y adherirse fácilmente a la superficie para competir por el espacio y la nutrición. [77]

No obstante, se ha descrito que los microorganismos antagónicos también presentan desventajas para el control de enfermedades postcosecha. Así, se ha observado una alta variabilidad en los resultados de los estudios realizados, una baja actividad curativa y está comprobado que el desarrollo de formulaciones que puedan ser comercializadas es complicado. Para intentar solucionar algunos de estos problemas, se está investigando la posibilidad de usar mezclas de antagonistas [78] o generar antagonistas que han sido manipulados genéticamente o producidos en medios enriquecidos. Al presentar una buena actividad preventiva, se pueden emplear como tratamientos complementarios a otros sistemas alternativos. [42]

Se han encontrado y patentado algunas levaduras, bacterias y hongos filamentosos con capacidad antagónica contra podredumbres de postcosecha, pero, la existencia en el mercado de microorganismos antagónicos es escasa debido a que los fungicidas convencionales son más efectivos, baratos y consistentes. Además, algunos países, como EE. UU., disponen de normativas específicas para el registro de este tipo de productos biológicos, mientras que, en otras zonas productoras como la Unión Europea, no se disponen de dichos reglamentos y el registro se ve obstruido por la necesidad de realizar análisis toxicológicos costosos y de larga duración, no comparables con los exigidos para los fungicidas de síntesis.

3.3 Métodos químicos de bajo riesgo

Los productos químicos alternativos a los fungicidas convencionales empleados deben ser sustancias naturales o sintéticas que presenten efectos toxicológicos conocidos y muy bajos tanto en animales como en personas y que tengan efectos residuales mínimos en el medio ambiente. En este grupo estarían los aditivos alimentarios, los compuestos GRAS (“Generally Recognized as Safe”) y las sustancias naturales extraídas de plantas, microorganismos o animales. También entrarían aquí otro grupo que engloba las sustancias que promueven una actividad inductora de resistencia, en el fruto huésped, hacia las enfermedades postcosecha. Estos productos pueden aplicarse directamente o adicionados a recubrimientos.

3.3.1 Sales: Compuestos GRAS y aditivos alimentarios

Las sales orgánicas e inorgánicas de baja toxicidad pueden pertenecer tanto al grupo de aditivos alimentarios como al de sustancias clasificadas como GRAS. El término “GRAS” es un acrónimo de la frase en inglés “Generally Regarded as Safe”. Por otro lado, según los artículos 201 (s) y 409 de la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos de EE. UU., cualquier sustancia que se agrega intencionadamente a los alimentos es un aditivo alimentario (sustancias con número E). Estas sustancias están sujetas a revisión y aprobación previa de la FDA (“Food and Drugs Administration”), a no ser que la sustancia haya sido previamente reconocida por expertos cualificados como segura en las condiciones de su uso, o que el uso de esta sustancia esté excluido de la definición de aditivo alimentario. [79] El principal interés para el uso de estas sustancias en fruta fresca radica en que no tienen un límite máximo de residuos (LMR), por lo que no están sujetos a esta legislación.

Varios aditivos alimentarios o compuestos GRAS han sido utilizados para el control de descomposición cítrica en términos generales y en particular en la causada por *P. italicum*, *P. digitatum* y *G. citri-aurantii*. En los siguientes párrafos se describen los principales materiales utilizados:

- Las sales de ácido sórbico son conocidas por su actividad antimicótica contra mohos y levaduras y curiosamente, no sólo ejercen una compatibilidad con los fungicidas convencionales como imazalil, fludioxonil o tiabendazol, sino que también aumentan su capacidad contra los hongos *P. digitatum* y *G. citri-aurantii*. [80]

- Se ha estudiado también la eficacia del bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, silicato de sodio, bicarbonato de potasio, carbonato de potasio, sorbato de potasio, cloruro y quelato cálcicos contra la decadencia natural de la postcosecha sobre clementinas y naranjas en diferentes momentos de aplicación: antes de la cosecha, después de la cosecha, y tanto en la precosecha como en la postcosecha. Se concluyó

que el tiempo de aplicación es un factor crucial dado que las sales aplicadas en el campo antes de la cosecha tienen más tiempo disponible para interactuar con el patógeno y alterar así el inóculo.^[81] Otras investigaciones también han demostrado la eficacia del carbonato de sodio o bicarbonato de sodio como agente de control antifúngico en la postcosecha de *P. digitatum* en naranjas.^[82]

- Otros estudios han investigado la actividad antifúngica curativa de los tratamientos postcosecha con etilparabeno sódico (Figura 9) contra el moho azul y el moho verde mediante ensayos *in vivo* y se concluyó que esta sal podría considerarse una alternativa de control no contaminante.^[83]

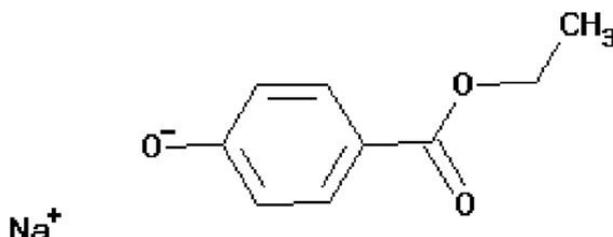


Figura 9. Estructura química del etilparabeno sódico.^[83]

- Una investigación sugirió la utilización de hidrosulfuro de sodio como compuesto innovador para ser utilizado contra *P. italicum* en cítricos y el resultado fue óptimo, reduciendo el crecimiento de dicho hongo en la superficie de la fruta tratada.^[84]

- Se ha evaluado el efecto de dehidroacetato de sodio, un conservante alimentario común y seguro, para el control de *G. citri-aurantii* después de la cosecha a través de ensayos *in vitro* e *in vivo*.^[85]

- Un estudio *in vivo* sobre cítricos demostró que el aditivo alimentario benzoato de sodio, utilizado comúnmente como conservante, era la sal más eficaz para actuar como agente antifúngico contra el moho verde y el moho azul.^[86]

A pesar de los óptimos resultados obtenidos en experimentos a pequeña escala en los laboratorios, el uso de sales presenta algunas limitaciones como actividad y persistencia limitada, eficacia no equiparable a la de los fungicidas convencionales, riesgo de lesión de frutas y falta de efecto preventivo.^[81] Es por esto por lo que se han realizado ensayos para mejorar el rendimiento de las sales, combinándolas con otros sistemas como son los microorganismos antagonistas, el calor, fungicidas químicos a bajas dosis y recubrimientos de ceras. Sin embargo, la combinación implica complicaciones operacionales y costos adicionales de mano de obra, equipo y energía.^[87]

3.3.2 Sustancias inductoras de resistencia

La resistencia inducida se entiende como un aumento de la expresión de los mecanismos naturales de defensa de las plantas contra diferentes patógenos, y esta resistencia inducida puede deberse a factores físicos, biológicos y químicos. Así pues, las sustancias inductoras de resistencia son las que estimulan respuestas protectoras y según su naturaleza química pueden ser proteínas, glicoproteínas, polipéptidos, polisacáridos, compuestos con lípidos, u otras sustancias.^[88] Existen dos tipos principales de resistencia inducida, resistencia sistémica adquirida (SAR) y resistencia sistémica inducida (ISR). La resistencia sistémica adquirida tiene lugar cuando se crea una herida localizada en la planta y la resistencia se estimula al aplicar un tratamiento diseñado en el lugar donde el patógeno ha invadido la planta. Este tratamiento desencadena así una respuesta sistémica en la planta. La resistencia sistémica inducida aparece cuando las raíces de las plantas son colonizadas por rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas, bacterias del suelo que influyen de forma directa e indirecta en el crecimiento de las plantas. Cuando estas bacterias detectan una modificación de la planta, se desencadena una respuesta fisiológica.

Los inductores químicos de resistencia deben poseer un amplio espectro de defensa a bajas concentraciones, no ser tóxicos ni para plantas ni para animales, no tener efectos negativos sobre el crecimiento y el desarrollo de las plantas, proporcionar una protección duradera, ser de bajo coste y no presentar toxicidad directa contra el microorganismo patógeno.^[89]

Aunque la mayoría de las investigaciones se han enfocado a enfermedades precosecha, algunos inductores químicos han mostrado inducción de respuestas de defensa en enfermedades postcosecha en distintos cultivos hortofrutícolas. Ciertos reguladores del crecimiento como el ácido salicílico, el ácido acetil salicílico, el ácido jasmónico, el benzotiadiazol (BTH), el ácido dicloro isonicotínico (INA) y el ácido β -aminobutírico (BABA), entre algunos otros, han sido probados en frutos cítricos como tratamientos postcosecha para inducir o aumentar su resistencia natural a enfermedades postcosecha, especialmente hacia las podredumbres azul y verde. También se han realizado ensayos con silicio en forma de silicato sódico, considerada como una sal GRAS y con otros compuestos como la proteína Harpin aislada de la bacteria patógena *Erwinia amylovora*.^[90]

– Ácido salicílico

El ácido salicílico (AS) forma parte de un amplio grupo de compuestos sintetizados en plantas denominados fenólicos, los cuales poseen en su estructura química un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático y participan en muchas funciones metabólicas en plantas, como son la síntesis de lignina y, en algunos casos, en la biosíntesis de compuestos relacionados con la defensa como las fitoalexinas. Participa en procesos como la germinación de semillas, crecimiento celular, respiración, expresión de genes asociados a senescencia, repuesta a estrés abiótico y de forma esencial en la termogénesis, así como en la resistencia a enfermedades. También, se ha descrito que en algunos casos puede actuar de forma indirecta, alterando la síntesis y/o señalización de otras hormonas que incluyen la vía del ácido jasmónico (AJ), el etileno, y las auxinas.^[91]

En comparación con otros tratamientos, el tratamiento con ácido salicílico puede ser más eficiente en postcosecha de cítricos, ya que está directamente implicado en la acción de defensa.^[92] Un estudio demostró que concentraciones de 8 y 10 mM de AS redujeron significativamente la podredumbre verde en naranjas inoculadas artificialmente.^[88] Del mismo modo, otro grupo de investigación estudió la actividad antifúngica del ácido salicílico contra *P. digitatum* en naranjas empleando tratamientos a diferentes concentraciones, y se obtuvieron buenos resultados contra la descomposición al igual que se manifestó un fuerte impacto en la mejora de los factores de calidad del fruto (sólidos solubles totales, acidez, contenido antioxidante, antocianina, etc.).^[93]

Un trabajo más reciente, ha ofrecido información bastante relevante sobre el tratamiento empleando AS. En él, se ha analizado exhaustivamente los efectos del ácido salicílico sobre la capacidad de almacenamiento de la mandarina Satsuma, aplicando tratamientos de 2mM. Los resultados mostraron que pasados 50 y 120 días, la tasa de pudrición disminuyó en un 57% y 65% respecto a la muestra control respectivamente, lo que sugiere que el tratamiento de AS puede reducir significativamente la tasa de putrefacción de los cítricos postcosecha. El análisis de calidad del fruto reveló que el tratamiento puede mantener la firmeza de la fruta sin afectar a la calidad comercial. Además, el contenido de H₂O₂ y algunos metabolitos relacionados con la defensa, como la ornitina y la treonina, aumentaron significativamente. También se acumularon en los frutos flavonas polioxiladas lipofílicas que pueden inhibir directamente el desarrollo de patógenos.^[94]

– Benzotiadiazol (BTH)

Es un compuesto sintético análogo al ácido salicílico y fue desarrollado como potente activador de SAR (Resistencia Sistémica Adquirida) en plantas. Es capaz de

inducir resistencia a enfermedades fúngicas, víricas y bacterianas en un gran número de especies de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. [95]

El BTH ha mostrado resultados prometedores para controlar enfermedades de campo como la sarna (*Elsinoe fawcettii*), la mancha negra (*Alternaria alternata*) o la melanosis en cítricos (*Diaporthe citri*). [96]

Un estudio más reciente, empleó tratamientos con BTH a concentraciones de 0,9 mM, y estas aplicaciones no mostraron una actividad preventiva contra los mohos verde y azul en naranjas “Lanelate”. [90] Este resultado obtenido concuerda con otro estudio realizado en manzanas infectadas con *Penicillium expansum*, donde el BTH tampoco mostró ninguna inducción de resistencia a la enfermedad. [97]

– Ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA)

Este ácido induce genes de expresión de resistencia sistemática adquirida, tanto antes de la inoculación del patógeno como después del ataque del patógeno. [95]

Se ha realizado un experimento donde la incidencia de moho verde y azul se redujo significativamente en 25% y 17% y 60 y 53%, respectivamente, mediante tratamientos de INA a 0,03 y 0,3 mM. [90]

– Ácido β -aminobutírico (BABA)

El BABA es un aminoácido no proteico que se ha llegado a considerar un tratamiento alternativo prometedor debido a su inducción de respuestas de defensa en tejidos de distintas plantas, su carácter natural [98] y su actividad contra hongos, bacterias, virus y nematodos. [99]

Un estudio sobre la naranja dulce almacenada a 5 °C mostró una reducción de la incidencia, así como de los diámetros de lesión de la podredumbre azul. [100] En otro ensayo posterior realizado en naranjas tipo Valencia, los tratamientos de BABA no redujeron la incidencia o gravedad del hongo verde, pero sí que redujeron significativamente la incidencia del hongo azul al aplicar concentraciones de 0,3 y 3 mM y las reducciones fueron del 39% y del 26% respectivamente, en comparación con frutas control tratadas con agua. [90]

– Silicio

El silicio es un elemento que desempeña un papel en el refuerzo de las paredes celulares de las plantas. Atendiendo a diversas investigaciones sobre el mecanismo de acción del silicio, se ha deducido que puede tener un efecto directo sobre el patógeno o un efecto indirecto sobre la fruta hospedadora, formando barreras físicas y mecánicas a nivel de la pared celular o bien generando una inducción bioquímica de defensas

acumulando, por ejemplo, lignina, compuestos fenólicos o proteínas relacionadas con la patogénesis.^[101]

Algunos estudios han demostrado la eficacia de este inductor para reducir significativamente tanto la incidencia de la podredumbre verde como azul en frutos cítricos, concretamente mandarinas y naranjas.^[81] Liu et. al. (2010) observaron que el silicato de sodio era capaz de dañar la membrana plasmática de las esporas de *P. digitatum*, así como inhibir la germinación de esporas e impedir el crecimiento micelial y del tubo germinativo.^[102] Con una concentración de silicato sódico de 1000 mM se reduce significativamente la incidencia en naranjas del moho verde y moho azul en un 89% y 71% respectivamente, aunque este tratamiento produce fitotoxicidad en el fruto.^[90]

– Proteína Harpin

Se trata de una proteína no tóxica y natural, aislada de la bacteria *Erwinia amylovora*, agente causal del fuego bacteriano en manzanas, peras y otras rosáceas. Es un elicitor de respuesta bacteriana hipersensible, termostable y rica en glicerina.^[103] Tratamientos postcosecha con Harpin a diferentes concentraciones en manzanas indujeron resistencia al moho azul.^[104] Otro estudio realizó ensayos postcosecha con Harpin en naranjas para combatir la mancha negra causada por *Guignardia citricarpa* (*Figura 10*).^[105]



Figura 10. Enfermedad de la mancha negra en cítricos.

En general, debido a que la resistencia a patógenos en los tejidos vegetales de los frutos puede inducirse más fácilmente cuando éstos se encuentran en plena actividad metabólica, la aplicación de estas sustancias durante las etapas de desarrollo del fruto en el campo puede ser una propuesta prometedora. Sin embargo, hasta estos momentos los resultados obtenidos no son lo suficientemente buenos como para tener un impacto comercial ni justificar su coste.

3.3.3 Sustancias naturales

3.3.3.1 Extractos vegetales

Los extractos vegetales son considerados fungicidas potenciales, tanto de forma individual como en combinación con otras medidas de control, debido a que poseen una baja toxicidad ambiental, un modo de acción sistémico, baja fitotoxicidad y actividad antifúngica. Los extractos vegetales que proceden sobre todo de las plantas medicinales y aromáticas se han aplicado como métodos preventivos en cítricos contra el desarrollo de podredumbres postcosecha, mostrando resultados alentadores, tanto en los ensayos *in vitro* como *in vivo*.

El extracto natural “ideal” que actúa como agente antimicótico debe cumplir una serie de características y tiene unos modos de acción requeridos. Por un lado, el compuesto debe ser eficaz a corto plazo, los parámetros del fruto no deben verse afectados de forma negativa, la dosis efectiva utilizada debe ser lo más baja posible, la eficacia del producto natural aplicado no debe verse influenciada por condiciones fisiológicas del fruto o ambientales, el extracto no debe de ser tóxico para la salud humana, ha de presentar baja actividad residual y su acción debe de ser específica frente a un determinado patógeno. Por otro lado, respecto a los modos de acción, el producto ha de estimular respuestas defensivas en el fruto, inhibir la biosíntesis del ácido nucleico, modificar la estructura celular patógena, inhibir la respiración celular, iniciar síndromes de estrés oxidativo, inhibir el metabolismo de producción de energía, inactivar las enzimas esenciales, reaccionar con las proteínas de la membrana celular y alterar la función del material genético. ^[106]

Diversos estudios sugieren la capacidad de extractos de diferentes plantas para controlar la podredumbre cítrica causada por *P. italicum* y *P. digitatum* debido a su contenido en metabolitos secundarios como flavonoides, quinonas, taninos, terpenos, alcaloides, saponinas, esteroides, fenilpropanoides, acetaldehído, benzaldehído, alcohol bencílico, etanol, salicilato de metilo, benzoato de etilo, formato etílico, hexanal, (E)-2-hexanal, lipoxigenasas, jasmonatos, glucosinolatos o isotiocianatos. ^[107,108]

Un estudio evaluó, tanto *in vitro* como *in vivo* en naranjas y limones, siete extractos de plantas y sus fracciones líquidas frente a cuatro cultivos aislados de *Penicillium italicum*. Estos compuestos fueron extraídos de semillas de alholva (*Trigonella foenumgraecum* L.), semillas de harmal (*Peganum harmala* L.), dientes de ajo (*Allium sativum* L.), corteza de canela (*Cinnamomum cassia* L.), hojas fleabanas pegajosas (*Inula viscosa* L.) y hojas de sombra y frutos (*Solanum*). ^[109]

Muchos estudios han atribuido la actividad antifúngica de extractos de plantas a la presencia de polifenoles. En otro trabajo, se informó que compuestos fenólicos como la quercetina, escopoletina y escoparona ejercieron actividad antifúngica hacia *P. digitatum* en naranjas. ^[110]

El extracto de la cáscara de granada (*Figura 11*), debido a su actividad antioxidante y su capacidad antimicrobiana correlacionada con una alta concentración de fenoles, ha sido considerado como una alternativa sostenible a los fungicidas químicos. Diversas investigaciones han llegado a la conclusión de que los extractos fenólicos de la cáscara de granada inhiben la germinación de los conidios de *P. digitatum* y *P. italicum*, retrasan la decadencia general tanto en los pomelos como en los limones inoculados y los tratamientos no generan fitotoxicidad. [107,111]



Figura 11. Extracto de cáscara de granada.

3.3.3.2 Aceites esenciales

Los aceites esenciales (EOs) son un grupo de sustancias naturales que tienen extensos antecedentes de uso en alimentos debido a sus propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, insecticidas, antioxidantes y medicinales. [112] Presentan un carácter lipofílico y pueden ser identificados en varios componentes de las hojas, cortezas, tallos, raíces, flores y frutas de las plantas. Los EOs, normalmente, son mezclas altamente complejas de cientos de compuestos aromáticos individuales y suelen prepararse mediante técnicas de extracción de fragancias, como la destilación, el prensado en frío o la extracción. [113]

La actividad biológica de los aceites esenciales está directamente relacionada con la presencia de componentes volátiles bioactivos. La composición de los EOs puede depender de la parte de la planta que se utiliza [114] y de otros muchos parámetros, como los métodos de secado o los procesos de extracción, que afectan a su rendimiento y composición química. [115] Químicamente, consisten en compuestos terpenicos (mono-, sesqui- y diterpenos), alcoholes, ésteres, epóxidos, ácidos, aldehídos, aminas, cetonas y sulfuros. [116]

Los efectos antimicrobianos de los aceites esenciales se han analizado con una amplia gama de microorganismos y en diferentes productos a lo largo de los años, pero

su mecanismo de acción todavía no se entiende por completo. Además, al estar formados por varios componentes, su actividad antimicrobiana no puede ser explicada basándose únicamente en la acción de uno de los componentes. ^[117] Varios estudios, han propuesto que la acción antimicrobiana de los EOs puede deberse a su capacidad de penetrar a través de las membranas de los microorganismos e inhibir así las propiedades funcionales bacterianas. ^[117,118] Los mecanismos de acción pueden estar relacionados con la capacidad de los compuestos fenólicos para alterar la permeabilidad de las células microbianas, dañar las membranas citoplasmáticas, interferir con el sistema de generación de energía celular e interrumpir la fuerza motriz de los protones, lo cual puede provocar la muerte celular. ^[117,119]

Generalmente, se ha creído que los EOs deberían ser más eficaces contra bacterias Gram-positivas debido a la interacción directa que existe entre la membrana celular y los componentes hidrofóbicos de los aceites esenciales ^[120,121] y así pues, las Gram-negativas debían ser más resistentes a los EOs por poseer una pared de células hidrofílicas que ayudan a prevenir la penetración de los compuestos hidrofóbicos. Un estudio realizado en 1987 concluyó que las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas eran igualmente sensibles a los aceites esenciales cítricos y sus componentes ^[122] pero, sin embargo, otra investigación empleando carvacrol y timol, mostró una diferente forma de actuar contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Estos aceites esenciales lograron la desintegración de la membrana externa de las Gram-negativas, liberando así lipopolisacáridos y aumentando la permeabilidad de la membrana citoplasmática. ^[123]

La alta biodegradabilidad y la naturaleza volátil que presentan los EOs los hace eficaces como agentes antifúngicos postcosecha para el tratamiento de cítricos generando bajos niveles de residuos. ^[112] Este hecho ha sido demostrado, como se puede observar en la *Tabla 9*, con diversas especies cítricas como la mandarina Satsuma, la naranja y el limón.

En el trabajo de Boubaker et al. (2016), se investigaron las actividades antifúngicas de aceites esenciales de cuatro especies de *Thymus* (*Figura 12*), extraídos por hidrodestilación de las partes aéreas, contra las enfermedades postcosecha causadas por *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* y *Geotrichum citri-aurantii*. Los diferentes aceites esenciales mostraron ser eficaces, aunque cada uno en diferente medida. ^[124]

Otro trabajo, también evaluó en *Citrus sinensis* el efecto del extracto de *Thymus capitatus* sobre el hongo fitopatógeno *P. italicum*. La inhibición del crecimiento micelial fue del 100% y este hecho se correlacionó con la composición rica en carvacrol, de más del 69% de este EO. ^[125]

Un estudio, para combatir la podredumbre amarga, realizó ensayos con diferentes aceites esenciales (*Thymus vulgaris*, *Citrus aurantium var. amara*,

Cymbopogon citratus, *Cymbopogon martinii*, *Origanum vulgare*, *Geranium graveolens roseum Bourbon*). De todos ellos, *C. citratus* resultó ser la opción más rentable contra *G. citri-aurantii*. Posteriormente, dado que estudios comerciales anteriores habían indicado las propiedades del aceite esencial de *Mentha spicata* contra *Penicillium digitatum*, se decidió elaborar un producto de protección multiobjetivo con ambos aceites esenciales. Con esta mezcla de EOs, se controlaban totalmente los dos patógenos, además de *P. italicum*. [126]



Figura 12. Planta silvestre de *Thymus vulgaris* o tomillo.

Varios aceites esenciales derivados de la hierba de limón, eucalipto y clavo han sido probados en la superficie de mandarinas para inhibir el crecimiento fúngico de mohos verdes y azules. Aunque todos ellos fueron capaces de inhibir la germinación y el crecimiento de conidios de ambos mohos, el EO de hierba de limón resultó ejercer el efecto más beneficioso. [127]

El control, tanto *in vitro* como *in vivo* de *Phyllosticta citricarpa*, causante de la mancha negra en cítricos, se ha evaluado en naranjas de Valencia y limones utilizando 14 aceites esenciales. Los EOs destacables fueron los de *Chenopodium ambrosioides* (76% de compuestos monoterpénicos) y *Conyza bonaerensis* (17% de monoterpenos y 10% de sesquiterpenos), que inhibieron completamente el crecimiento fúngico. [128]

Se ha examinado y evaluado el efecto de aceites esenciales de *Mentha arvensis*, *Ocimum canum* y *Zingiber officinale* en la postcosecha de cítricos. Todos ellos presentaron aptitud para controlar las infecciones del moho azul tanto en naranjas como en limones, extendiendo así su vida comercial. [129]

Otro trabajo, quiso destacar la importancia de los aceites esenciales contra *P. italicum* y *P. digitatum* dependiendo de la zona de la naranja agria (*Citrus aurantium L.*) de donde era extraído (piel, hoja o flor). Dependiendo de la zona de extracción, los

compuestos dominantes de los EO cambian: en la flor predomina el linalool, en la piel el limoneno y en las hojas el acetato de linalilo. Los resultados de los ensayos *in vivo* demostraron la capacidad de los EOs derivados tanto de las hojas como de flores para reducir el crecimiento de ambos patógenos, pero, por el contrario, el EO de la piel fue ineficaz. [130]

Tabla 9. Recopilatorio de estudios con aceites esenciales contra *P. italicum*, *P. digitacum*. [106]

FRUTA	ACEITE ESENCIAL	PATÓGENO DIANA
Naranjas, limones	Mentha arvensis, Ocimum canum, zingiber officinale	<i>P. italicum</i>
Naranjas	Cinnamomum zeylanicum	<i>P. italicum</i> , <i>P. digitacum</i>
Mandarinas Satsuma	Octanal	<i>P. digitatum</i>
Naranjas	Citrus aurantium	<i>P. italicum</i> , <i>P. digitacum</i>
Mandarinas Satsuma	Aceite de clavo	<i>P. digitatum</i>
Naranja cv. Thompson, Naranja cv. Valencia	Thymus vulgaris, Eugenia caryophyllata Thunb	<i>P. italicum</i> , <i>P. digitacum</i>
Naranja cv. Salustiana, Naranja cv. Valencia	Thymus vulgaris, Cinnamomum zeylanicum Breyn	<i>P. italicum</i> , <i>P. digitacum</i>
Naranja cv. Tomago	Mentha spicata, Lippia scaberrima	<i>P. digitatum</i>
Naranja cv. Navel Powell	Bergamota, tomillo, árbol del té	<i>P. italicum</i>
Lemon cv. fino	Carvacrol, Timol	<i>P. italicum</i> , <i>P. digitacum</i>
Naranjas	Thymus capitatus	<i>P. italicum</i>

Se han encontrado combinaciones de diferentes aceites esenciales con efectos sinérgicos para combatir el hongo *Penicillium chrysogenum*: aceite de orégano y aceite de canela, aceite de té con aceite de tomillo y aceite de menta, aceite de menta y aceite de tomillo. [131] Siguiendo este enfoque, recientemente se ha investigado la combinación de cinamaldehído y citronella para el control de *P. digitatum*. Se observó que la mezcla de ambos aceites exhibió una acción sinérgica en comparación con los compuestos individuales en el crecimiento micelial de dicho hongo y en la germinación de esporas, con una concentración inhibitoria y fungicida mínima (MIC, MFC) de 0.4 mL/L⁻¹. Además, también se pudo ver que la combinación de ambos EOs aceleraba el daño de la pared y membranas celulares del fitopatógeno. [132]

Después de evaluar la actividad antifúngica global de los aceites esenciales contra *P. digitatum* y *P. italicum*, se puede sugerir que los EOs son candidatos prometedores hacia la búsqueda de soluciones alternativas al fungicida químico convencional. Los EOS se consideran sustancias GRAS y su aplicación comercial puede minimizar los riesgos para la salud causados por el amplio uso de otros compuestos químicos por la industria de los cítricos. No obstante, se debe tener un control estricto de estos EOs debido a los posibles problemas que pueden aparecer relacionados con la fitotoxicidad u olores desagradables. [42]

3.3.4 Recubrimientos comestibles antifúngicos

En la postcosecha de cítricos, los recubrimientos comestibles (RCs) con compuestos antifúngicos surgen con la finalidad de reemplazar a las ceras convencionales formuladas con fungicidas sintéticos como el imazalil o el tiabendazol. En los últimos años esta línea de investigación ha adquirido un gran interés, dado que este tipo de tratamientos pueden ofrecer una doble o triple funcionalidad. Por un lado, puede ejercer una función patológica de reducción de podredumbres y por otro lado una función fisiológica que regula el intercambio de gases entre el fruto y el entorno retrasando la senescencia. Además, también tiene una función estética por aportar firmeza y brillo.

Cómo se ha visto en el apartado de “Ceras y recubrimientos comestibles”, los principales componentes que forman los RCs son los hidrocoloides (polisacáridos o proteínas de diversos orígenes) y los lípidos (resinas, ácidos grasos, acilgliceroles, etc.) y además también se añaden plastificantes (sacarosa, glicerol, sorbitol, propilenglicol, etc.) y emulsificantes (lecitina, polisorbato, monoestearato, etc.) para mejorar las propiedades mecánicas y facilitar la dispersión entre la fase acuosa y la fase lipídica de los recubrimientos compuestos, los que en su matriz combinan lípidos e hidrocoloides. A la matriz formada, se le pueden añadir otros ingredientes para mejorar su comportamiento general (sabor, textura, color). Si estos ingredientes son capaces de retardar o inhibir el crecimiento de los microorganismos patógenos se habla de recubrimientos comestibles antimicrobianos y si estos microorganismos son hongos, se habla de recubrimientos comestibles antifúngicos. [133]

Los compuestos con carácter antifúngico utilizados para la formulación de revestimientos se pueden clasificar según su naturaleza en las tres categorías descritas anteriormente. La primera formada por conservantes alimentarios sintéticos o compuestos GRAS, donde se incluyen tanto sales orgánicas como inorgánicas, por ejemplo, carbonatos, sorbato, parabeno o benzoato, entre otros. En la segunda categoría se encuentran los compuestos naturales como los aceites esenciales, las proteínas y péptidos producidos por plantas, animales o microorganismos y los

extractos naturales de plantas. Por último, están los microorganismos antagonistas de control biológico (bacterias, levaduras e incluso algunos hongos filamentosos).^[134]

3.4 Combinación de métodos de control

Por desgracia, los sistemas alternativos descritos difícilmente logran por sí solos los niveles de efectividad y persistencia de los fungicidas sintéticos tradicionales. Siendo este último punto la debilidad más importante de estos tratamientos, sería necesario compatibilizar dos o más sistemas intentando alcanzar los siguientes objetivos^[135]:

- I. Conseguir un efecto aditivo o sinérgico para que el tratamiento combinado sea más persistente y eficaz que el tratamiento individual.
- II. Alcanzar un efecto complementario de forma que el tratamiento combinado tenga por un lado un efecto curativo permitiendo controlar las infecciones producidas con antelación y por otro lado un efecto preventivo para aquellas infecciones que se produzcan después de la aplicación de este.
- III. Posibilitar el empleo comercial de tratamientos que por sí solos no tienen una adecuada relación entre costes y efectividad, que muestran un riesgo elevado de generación de fitotoxicidad o que manifiestan efectos desfavorables en la calidad del fruto tratado.

Algunos ejemplos de estudios realizados combinando métodos de control son, por ejemplo:

- La investigación del efecto sinérgico de la combinación de ácido cinámico con la levadura antagonista *Cryptococcus laurentii* para el control de *Penicillium italicum*.^[136]
- Combinación de *Candida membranifaciens* con cepillado de agua caliente e irradiación ultravioleta para inhibir la infección por *P. digitatum*.^[137]
- Investigación de los efectos del tratamiento con agua caliente (53 °C, 2 minutos) y *Pichia membranaefaciens* sobre el control de *P. italicum* y *P. digitatum* en agrios.^[138]
- El estudio sobre la combinación de cinamaldehído y citronela, que exhibió una acción sinérgica en comparación con los compuestos individuales en el crecimiento micelial de *P. digitatum*, con una concentración inhibitoria mínima (MIC) y una concentración fungicida mínima (MFC) de 0,40 ml/L.^[139]
- La mezcla de extractos de *Brassica* con termoterapia para el control del moho verde después de la cosecha de naranjas.^[140]

- La investigación de Palou et al. (2007) sobre el efecto de las irradiaciones de rayos X en combinación con soluciones acuosas de carbonato de sodio en mandarinas clementinas para el control de mohos verdes y azules durante el almacenamiento en diferentes condiciones. ^[141]

Sin embargo, sigue siendo necesario la investigación en este campo, buscando especialmente combinaciones de productos naturales que aumenten el tiempo de vida del agente biocida, permitiendo de este modo un uso comercial del mismo.

4. PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOCIDA

El análisis bibliográfico realizado sugiere que usar una combinación de materiales que tengan efecto sinérgico en la actividad antifúngica y en el control de la liberación del agente biocida puede ser una estrategia de trabajo importante. Siguiendo esta idea se ha preparado una combinación de zeolitas y arcillas con aceite esencial de tomillo buscando conseguir que la zeolita/arcilla actúe de soporte del material fungicida (el aceite esencial), el cual irá liberándose poco a poco, ampliando el efecto y la duración del material preparado. Este tipo de materiales, además, no son tóxicos ni generan residuos, pues se preparan a partir de productos naturales.

En este punto se describe el procedimiento seguido para la preparación y caracterización del material biocida indicado.

4.1 Materiales

En este apartado se describen los distintos materiales utilizados para preparar los materiales fungicidas y la forma de incorporar el aceite esencial.

4.1.1 Sólidos

Los sólidos porosos utilizados fueron zeolitas y arcillas, ambos considerados como productos naturales. En concreto se utilizó:

- Zeolita LTA preparada con sílice extraída a partir de la cáscara de arroz. Esta zeolita fue sintetizada en la Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Es identificada por las siglas CACLTA.
- Arcilla natural ($CSNa^+$) modificada a través de un procedimiento de expansión con bromuro de hexadeciltrimetilamonio ($C_{16}TAB$), posterior secado a temperatura ambiente durante 21 horas y finalmente pilareada con tetraetil ortosilicato (TEOS) y calcinada. Esta arcilla se elaboró en colaboración con la Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Es identificada por las siglas CS16-21H-C.

4.1.2 Líquidos

- Agua destilada, H_2O .
- Agua ultra pura, H_2O Milli-Q.
- Isopropanol, C_3H_8O , Acros Organics[®].
- Aceite esencial de tomillo, PLANTIS.

4.1.3 Incorporación del aceite esencial

Los sólidos descritos se funcionalizaron con aceite esencial de tomillo mediante el método de impregnación a volumen de poro.

El aceite esencial de tomillo se añadió en estado puro o bien disuelto con el disolvente isopropanol sobre el sólido poroso a impregnar, de tal manera que todo el soporte quedaba totalmente empapado. Posteriormente, una vez impregnado el soporte, se dejaron secar las muestras a temperatura ambiente durante dos días. Las disoluciones empleadas contienen la cantidad necesaria del aceite esencial para conseguir que el material final posea el porcentaje de aceite deseado, evitando utilizar un exceso de disolución.

El método de impregnación a volumen de poro fue utilizado para preparar diferentes materiales con distintos porcentajes en peso de aceite esencial. En los ensayos de fitotoxicidad se usó la arcilla pilareada (CS16-21H-C), con un contenido teórico de aceite esencial del 40%, 27% y 20% (en peso). Para el estudio *in vivo* se prepararon también por este método la zeolita LTA sintetizada a partir de la sílice extraída de la cáscara de arroz (CACLTA) y la arcilla (CS16-21H-C), ambas estructuras impregnadas al 40% con aceite esencial de tomillo.

4.2 Métodos de caracterización

Las técnicas de caracterización que se emplearon para caracterizar los sólidos fueron las siguientes:

4.2.1 Difracción de Rayos X

La difracción de rayos X (DRX) es uno de los fenómenos físicos que se producen al interaccionar un haz de rayos X, de una determinada longitud de onda, con un sólido cristalino. El fenómeno de difracción puede describirse con la Ley de Bragg, que predice la dirección en la que se da la interferencia constructiva entre los haces de rayos X dispersados coherentemente por un cristal, y establece la relación entre el ángulo de incidencia de la radiación con el espacio interplanar para cada línea de difracción:

$$n\lambda = 2d_{hkl} \cdot \text{sen } \theta \quad (1)$$

donde n es un número entero ($n=1, 2, 3, \dots$), λ es la longitud de onda, d_{hkl} es el espaciado interplanar de los planos cristalinos con índices de Miller (h, k, l), y θ es el ángulo de incidencia del haz de rayos X.

El análisis de las muestras sólidas utilizadas en este TFM se realizó con un difractómetro CUBIX de PANalytical equipado con un detector PANalytical X'Celerator. Se empleó una radiación de rayos X de Cu K α ($\lambda_1 = 1,5406 \text{ \AA}$, $\lambda_2 = 1,5444 \text{ \AA}$, $I_2/I_1 = 0,5$), y un voltaje e intensidad de tubo de 45 kV y 40 mA, respectivamente, para la obtención de los difractogramas.

4.2.2 Análisis textural

El análisis textural es una técnica de caracterización que proporciona información sobre las propiedades texturales del sólido mediante fenómenos de adsorción y desorción, empleando nitrógeno como gas adsorbente. Esta técnica nos permite conocer la superficie de área total y la superficie microporosa.

Este estudio se llevó a cabo en un equipo Micromeritics ASAP 2040, a una temperatura de $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ y empleando una muestra de 200 mg aproximadamente. La muestra se pastilló y se tamizó para conseguir partículas de entre 0,4-0,6 mm. Previamente, a la muestra se le realizó un pre-tratamiento a $200 \text{ }^\circ\text{C}$ aplicando vacío.

La superficie específica se determinó aplicando un modelo de la isoterma Brunauer, Emmett y Teller (BET), la cual considera el llenado de los poros por adsorción en múltiples capas de adsorbato.

5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOCIDA

En este apartado se describe el procedimiento empleado para la evaluación del efecto fungicida de los materiales impregnados con aceite esencial de tomillo frente a los hongos *Penicillium Digitatum* (PD), *Penicillium Italicum* (PI) y *Geotrichum Citri-aurantii* (GC). Asimismo, se describen también diferentes ensayos de fitotoxicidad realizados con anterioridad para determinar la formulación más idónea, es decir, que no genere cambios de color en la piel del cítrico, para su posterior aplicación.

Las cepas de los tres hongos empleados fueron aisladas de frutos cítricos infectados recogidos en almacenes citrícolas de la zona de Valencia y fueron catalogadas de la siguiente forma:

- *Penicillium digitatum* NAV-7, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, UV, Valencia) con el número CECT 21108.
- *Penicillium italicum* MAV-1, depositada como CECT 21109.
- *Geotrichum Citri-aurantii* NAV-1, depositada como CETC 13166.

La actividad biocida de los materiales preparados se evaluó frente a estos hongos preparando distintas formulaciones de recubrimientos que, por lo general, contenían un 2% de polímero de almidón de patata, 1% glicerol, 0,5% lípido, 0,25% GiraLec, 0,25% Moglicet, 2% material fungicida y 94% de agua destilada. Para los ensayos de fitotoxicidad, la cantidad de material fungicida y de agua destilada se modificaron en función del tipo de ensayo realizado.

La preparación de la formulación se inicia elaborando una solución de almidón al 5% en agitación continua. Una vez preparada la solución de almidón, se añade a un matraz Erlenmeyer junto con todos los compuestos que forman la formulación descrita anteriormente, a excepción del material fungicida (arcilla pilareada impregnada con aceite esencial de tomillo). La mezcla preparada se homogeneiza con un equipo ultraturrax, calentando previamente el matraz junto con los diferentes compuestos hasta 92 °C en un horno microondas. Posteriormente, se enfría la mezcla en un baño de hielo en agitación continua hasta una temperatura comprendida entre 20-30 °C. Por último, para terminar la formulación, se añade el material fungicida. Cabe destacar que el material fungicida se incorpora al resto de formulación a última hora, el mismo día que vaya a tener lugar el recubrimiento del fruto. Los frutos sobre los que se evaluó la actividad biocida de las formulaciones preparadas fueron mandarinas de la variedad Orri.

La actividad fungicida de los materiales frente a los hongos PD, PI y GC se evaluó mediante el análisis de diferentes parámetros, conocidos como incidencia, severidad, esporulación y fitotoxicidad.

5.1 Ensayo de fitotoxicidad

Se realizó un estudio de fitotoxicidad (referido a manchas o cambio de coloración en el fruto) para evaluar la concentración máxima de material fungicida que se puede incorporar a los recubrimientos alimentarios sin que produzca alteraciones en cítricos incubados a 20 °C y con HR 70-80%. Para ello se prepararon diferentes formulaciones con distintos porcentajes de material biocida y aceite esencial. Unas contenían como material fungicida arcilla pilareada con aceite esencial y otras únicamente aceite esencial emulsionado sin el material de soporte, para así poder establecer una comparación de los tratamientos en función de la concentración de aceite empleado. El estudio se realizó sobre 10 frutos con cada tratamiento. En total se realizaron 8 tratamientos incluyendo el control, donde los frutos no se recubrieron y se realizó la observación a los 7 días de incubación.

5.2 Ensayos para determinar la actividad biocida

El desarrollo del estudio de la actividad fungicida del material preparado se realizó *in vivo* en mandarinas de la variedad Orri. Se estudió el efecto antifúngico de dos tipos de materiales funcionalizados con aceite esencial de tomillo frente a 3 tipos de hongos diferentes (*Penicillium Digitatum*, *Penicillium Italicum*, *Geotrichum Citri-aurantii*). Además, también se realizó un ensayo control en el que los frutos no se recubrieron y un ensayo cuyo recubrimiento contenía únicamente aceite esencial como material biocida (sin soporte). Por tanto, se realizaron 4 ensayos.

En primer lugar, se realizó la inoculación del hongo con un punzón de acero inoxidable, previamente mojado en una suspensión de 10^5 esporas/mL del hongo específico, realizando una herida de aproximadamente 2 mm de profundidad y 1 mm de anchura en el centro de uno de los lados de la mandarina, como se aprecia en la *Figura 13*. PD y PI se inocularon en una misma mandarina y GC de forma independiente. De cada ensayo (4) se realizaron 40 repeticiones y como cada género de hongo (*Penicillium* y *Geotrichum*) se inoculó de forma independiente, se emplearon un total de 320 mandarinas para la realización de todos los ensayos.



Figura 13. Herida en la zona ecuatorial de la mandarina (4 días de incubación).

Pasado un día tras la inoculación de los hongos, se incorporó el recubrimiento a la fruta con una formulación (% en peso) basada en una mezcla de polímeros (2%), glicerol (1%), lípidos (0,5%), GiraLec (0,25%), Moglicet (0,25%), antifúngico (2%) y agua (94%). Este recubrimiento se impregnó mediante la inmersión de la mandarina en la formulación preparada. En el caso del ensayo control, la fruta se mojó únicamente con agua.

Tras inocular y tratar las frutas, las mandarinas infectadas con el género *Penicillium* se incubaron a 20 °C y las infectadas por *Geotrichum* se incubaron a 28 °C y en ambos casos se trabajó con una humedad relativa en cámara aproximada de 90%.

Pasado un período de 7 días, se evaluó la actividad biocida de los materiales desarrollados analizando diferentes parámetros:

- Incidencia: porcentaje de naranjas infectadas.
- Esporulación: porcentaje de naranjas con esporas.
- Severidad: diámetro de crecimiento del hongo.
- Fitotoxicidad: referido a manchas o cambios de coloración.

Dada la cantidad de réplicas y datos que se obtienen es necesario realizar estudios estadísticos para una evaluación adecuada. Para ello, se utilizó el software Statgraphics Centurion XVI.I (Manugistics, Inc., Rockville, MD, USA). Se aplicó el análisis de la varianza ANOVA con un nivel de confianza del 95% y posteriormente se determinaron las diferencias significativas a través de la prueba LSD de Fisher ($P < 0,05$).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado, se analizan los resultados obtenidos al estudiar la acción biocida del aceite esencial impregnado en diferentes materiales frente a los microorganismos causantes de las principales podredumbres en la piel de cítricos. Inicialmente se pensó en preparar distintas combinaciones de soportes y aceites esenciales añadidos en distintas formulaciones, sin embargo, debido a la suspensión de la actividad académica presencial a partir de la pandemia, solo se pudieron preparar y estudiar los materiales descritos en la *Tabla 10*, que se nombran atendiendo el siguiente código: tipo de soporte, cantidad de aceite esencial expresado en porcentaje en peso y aceite esencial empleado (tomillo, TO).

Tabla 10. Materiales y nomenclatura empleada en el estudio.

MATERIALES	NOMENCLATURA
Zeolita LTA	CACLTA- 40%TO
Arcilla pilareada	CS16-21H-C- 40%TO

6.1 Caracterización de los materiales

En este trabajo, se han utilizado zeolitas sintetizadas a partir de sílice extraída de la cáscara de arroz y arcillas pilareadas como soportes de aceites esenciales, los cuales han sido caracterizados mediante diferentes técnicas.

6.1.1 Zeolita LTA

La zeolita LTA sintetizada a partir de la sílice de cáscara de arroz, posee una estructura tridimensional de poros y fue funcionalizada con un 40% de aceite de tomillo para adquirir carácter biocida.

Se realizó un estudio comparativo de difracción de rayos X entre la zeolita LTA comercial (LTacom), la zeolita LTA sintetizada (CACLTA) y los datos suministrados por la International Zeolite Association (LTA-IZA). Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 14*. Los difractogramas de la LTacom y CACLTA son muy similares y ambos materiales muestran picos a $2\theta = 7,2^\circ$; $10,3^\circ$; $12,6^\circ$; $21,8^\circ$; $24,0^\circ$; $27,2^\circ$; $30,0^\circ$ y $34,3^\circ$, que son los picos característicos de la zeolita LTA, tal como indica la IZA. Estos resultados muestran que la zeolita preparada a partir de sílice de arroz tiene la estructura de una zeolita LTA y se ha preparado correctamente.

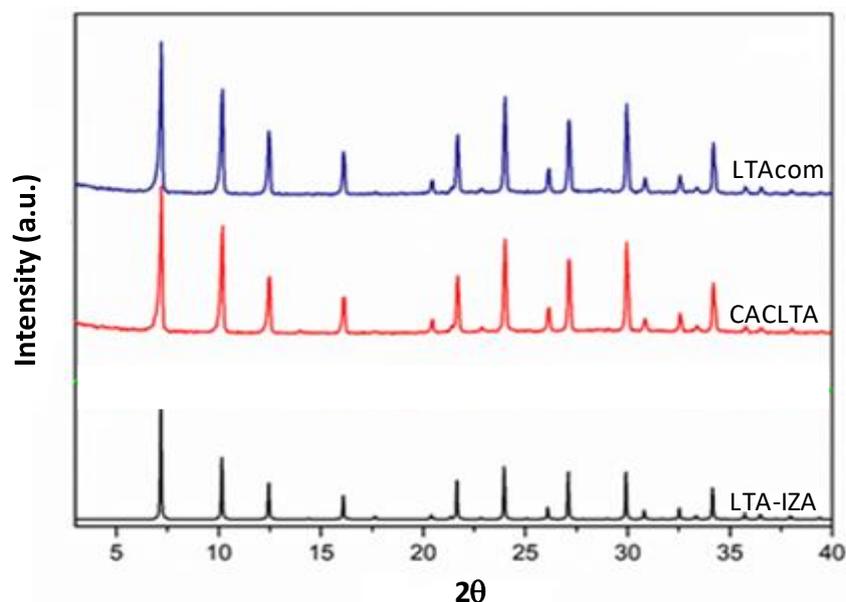


Figura 14. Difractograma de la zeolita LTA comercial (LTacom), de la sintetizada a partir de sílice extraída de cáscara de arroz (CACLTA) y de la LTA proporcionado por la IZA.

También se realizó la caracterización textural de la zeolita mediante el estudio de las isothermas de adsorción. Los valores obtenidos se muestran a continuación en la Tabla 11.

Tabla 11. Propiedades texturales de la zeolita LTA sintetizada por UFRGS a partir de sílice obtenida de la cáscara de arroz.

MATERIAL	S _{BET} (m ² /g)	S _{EXT} (m ² /g)	V _{MICRO} (cm ³ /g)	V _{TP} (cm ³ /g)
CACLTA	3,18	0,507	0,001	0,005

Se puede observar que contrariamente a lo que cabría esperar con este tipo de materiales, la superficie BET presenta un valor muy bajo, esto es debido a que la zeolita LTA presenta una relación Si/Al=1 y tiene sodio como cationes de compensación de carga que ocupan la mayor parte del espacio. Esto dificulta el acceso de la molécula de N₂ a los poros de pequeño tamaño, con lo que el valor obtenido de la superficie específica del material no es representativo. Para poder efectuar una medida correcta empleando la técnica de adsorción de nitrógeno, habría que realizar un intercambio iónico de sodio por calcio, de modo que el nitrógeno pueda acceder a los microporos. Pero, la mejor opción sería la realización de un análisis de adsorción de CO₂ a 0 °C para poder así obtener un resultado de superficie BET cercano a la realidad. Estos ensayos no se han podido realizar, pero acudiendo a bibliografía se ha podido ver que este tipo de zeolitas presenta un área superficial próxima a 500 m²/g^[142].

6.1.2 Arcilla

La arcilla CS16-21H-C fue preparada a partir de arcilla sódica CSNa⁺ tras su expansión con C₁₆TABr y posterior pilarización con TEOS. La funcionalización para dotar a este material de actividad biocida se realizó por impregnación al 40% en peso de aceite esencial de tomillo.

El análisis textural de la arcilla muestra un aumento considerable del área superficial BET tras la expansión y posterior pilarización del material. En consecuencia, también se incrementaron la proporción de mesoporos y microporos como se aprecia en la *Tabla 12*.

Tabla 12. Propiedades texturales de la arcilla sódica precursora (CSNa⁺) y la arcilla sintetizada (C16-21H-C).

MATERIAL	S _{BET} (m ² /g)	S _{EXT} (m ² /g)	V _{MICRO} (cm ³ /g)	V _{TP} (cm ³ /g)
CSNa ⁺	43,8	27,9	0	0,084
C16-21h-C	331,1	290,5	0,016	0,617

Los difractogramas de rayos X de la arcilla pilareada y de la arcilla sódica se muestran en *Figura 15*. En la arcilla pilareada desaparecen los picos a bajos ángulos característicos de los materiales laminados, pasando de ser un material ligeramente cristalino a un material amorfo.

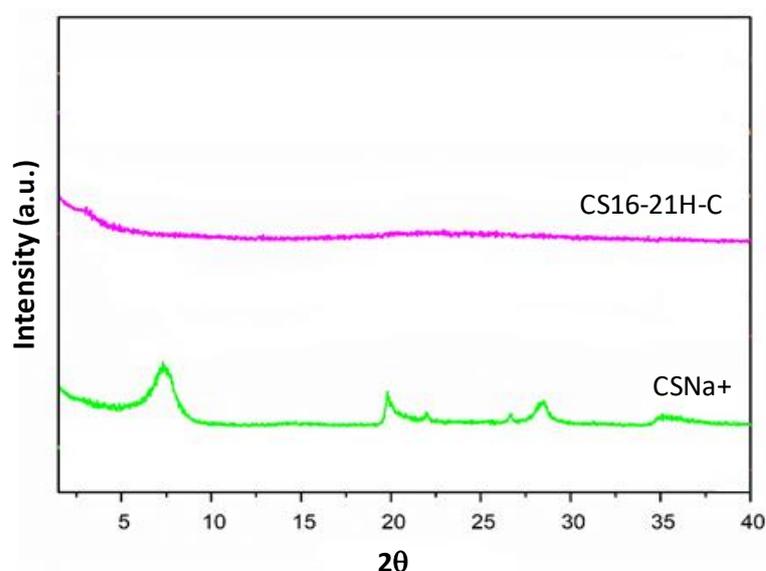


Figura 15. Difractograma de la arcilla inicial CSNa⁺ y de la modificada CS16-21H-C.

Estaba previsto realizar más ensayos de caracterización, como estudios de espectroscopía infrarroja y un análisis termogravimétrico de ambos materiales impregnados con el aceite esencial, pero debido al cierre de la universidad por la pandemia ha sido imposible realizarlos.

6.2 Estudios fungicidas

Se realizaron dos tipos de estudios, uno destinado a establecer la mejor combinación soporte + aceite esencial que no generara fitotoxicidad en los frutos y otro enfocado a evaluar la actividad biocida de los materiales elaborados a partir de la formulación más idónea.

6.2.1 Determinación de la fitotoxicidad

En primer lugar, se realizó un estudio *in vivo* para determinar qué cantidad máxima de aceite esencial de tomillo (TO) se podía incorporar a los recubrimientos sin producir fitotoxicidad en los frutos. Por ello, se prepararon diversas formulaciones en las que se varió la cantidad de aceite esencial. Estas formulaciones se aplicaron a las mandarinas que se mantuvieron en incubación a 20 °C durante 7 días. Tras ello se evaluó la presencia de manchas y cambios de color en el hesperidio de las mandarinas. El ensayo se realizó con formulaciones de material arcilloso con aceite esencial TO y se comparó también con una formulación de aceite esencial puro a distintas concentraciones como se aprecia en la *Tabla 13*.

Tabla 13. Diferentes tratamientos realizados para el estudio de fitotoxicidad.

TRATAMIENTO		MATERIAL FUNGICIDA EN LA FORMULACIÓN (% en peso)	ACEITE ESENCIAL EN LA FORMULACIÓN (% en peso)
C	Control	-	-
T1	CS16-21H-C- 20%TO	2%	0,4%
T2	CS16-21H-C- 40%TO	2%	0,8%
T3	CS16-21H-C- 27%TO	3%	0,8%
T4	CS16-21H-C- 40%TO	3%	1,2%
T5	0,4%TO	0,4%	0,4%
T6	0,8%TO	0,8%	0,8%
T7	1,2%TO	1,2%	1,2%

Los resultados obtenidos demuestran como la utilización de la misma cantidad de aceite esencial aplicada en la formulación de forma directa o impregnada en el material arcilloso proporcionan unos resultados muy similares produciendo alteraciones

en la piel de la mandarina cuando se utiliza una concentración de 1,2% de aceite esencial en la formulación de los recubrimientos (T4 y T7), como se aprecia en la *Figura 16*. Los tratamientos restantes, que poseen una concentración menor a 1,2% de aceite esencial de tomillo en la formulación (T1, T2, T3, T5 y T6), no producen fitotoxicidad en las mandarinas y, por ello, se escogió para los ensayos de inhibición el tratamiento con la cantidad máxima posible de material antifúngico probada que no generara fitotoxicidad, esto es un 2% de material fungicida (arcilla + aceite esencial) en la formulación con una concentración total de 0,8% de aceite esencial de tomillo.

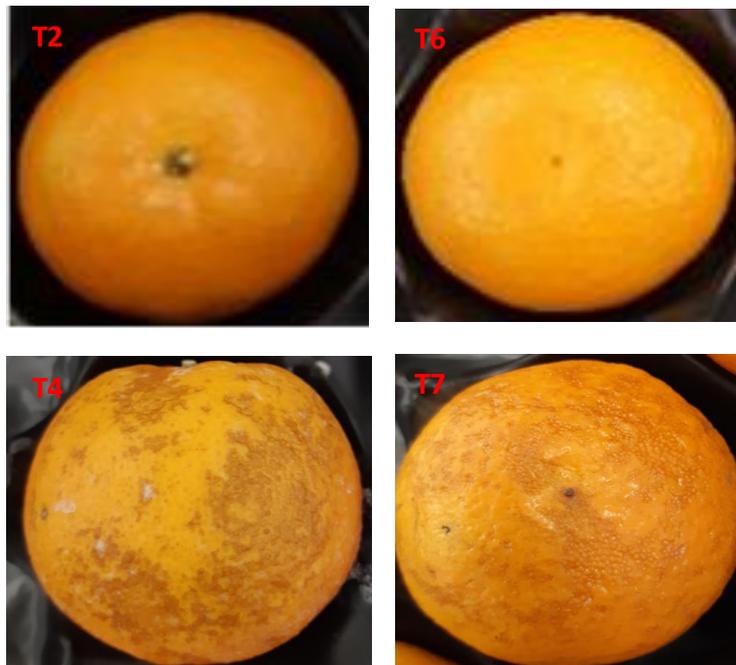


Figura 16. Tratamientos que no presentan fitotoxicidad vs tratamientos que presentan fitotoxicidad pasados 7 días de incubación a 20 ° C tras la aplicación de los respectivos tratamientos.

6.2.2 Determinación de la actividad fungicida

Las mandarinas fueron infectadas con los hongos *G. citri-aurantii*, *P. digitatum* y *P. italicum* y se les aplicó, por inmersión, una formulación (F) que contenía el material poroso impregnado con el aceite esencial y se analizó el progreso de la infección tras el tratamiento, tal como se ha descrito en el punto anterior. Se realizaron tres tratamientos y un control, como se puede apreciar en la *Tabla 14*. Los tratamientos se realizaron con la arcilla pilareada (CS16-21H-C) y la zeolita LTA sintetizada a partir de sílice de la cáscara de arroz. Estos materiales se funcionalizaron con un 40% en peso de aceite esencial de tomillo. El material funcionalizado representaba un 2% en peso de la formulación (F), lo que suponía un 0,8% en peso de aceite esencial en la formulación.

Para una mejor comparación se preparó también la formulación con el mismo porcentaje de aceite esencial, pero sin el sólido que lo soporta (T3).

Tabla 14. Diferentes tratamientos realizados in vivo para el estudio de la actividad antifúngica.

TRATAMIENTO		MATERIAL FUNGICIDA EN LA FORMULACIÓN (% en peso)	ACEITE ESENCIAL EN LA FORMULACIÓN (% en peso)
C	Control	-	-
T1	CACLTA- 40%TO	2%	0,8%
T2	CS16-21H-C- 40%TO	2%	0,8%
T3	0,8%TO	0,8%	0,8%

En primer lugar, se comprobó que dichos tratamientos no producían alteraciones en la piel de la mandarina induciendo a fitotoxicidad, concluyendo que, de acuerdo con los estudios previos, un 0,8% de aceite esencial en la formulación es una concentración adecuada. Posteriormente, se estudió el resultado de aplicar estas formulaciones sobre los distintos hongos, analizando la incidencia (cantidad de mandarinas infectadas), la severidad (diámetro de crecimiento del hongo) y la esporulación (cantidad de mandarinas en las que el patógeno ha esporulado). Estos resultados se pueden observar en las Figuras 17, 18 y 19, donde aparecen los resultados obtenidos frente a los hongos PD, PI y GC, respectivamente.

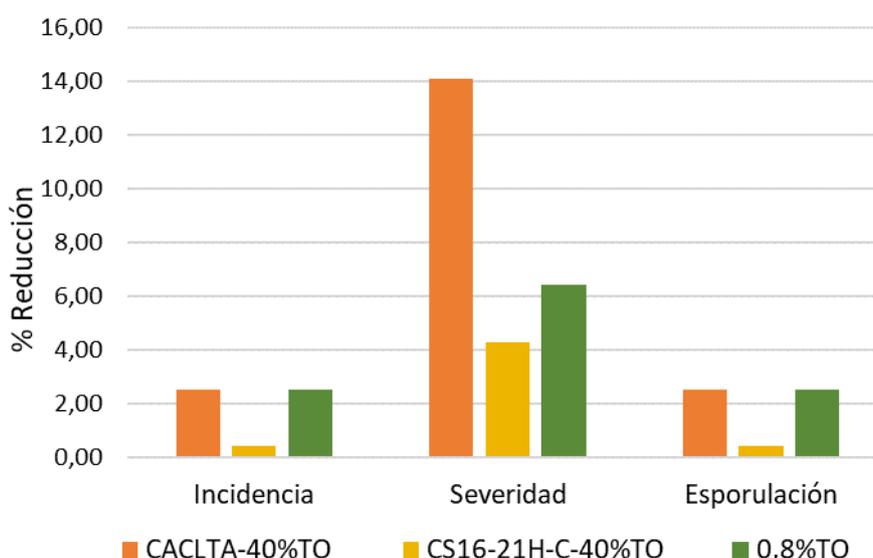


Figura 17. Porcentajes de reducción de la incidencia, severidad y esporulación al aplicar los tratamientos a mandarinas infectadas con PD respecto al ensayo control.

Los resultados mostrados en la *Figura 17*, referentes a la infección causada por *Penicillium digitatum*, indican que el único parámetro que mostró una diferencia significativa al añadir el material fungicida fue la severidad, es decir, el diámetro de crecimiento del hongo, obteniendo los mejores resultados con la zeolita + aceite esencial, mientras que, sin embargo, no existen diferencias apreciables en cuanto a la incidencia y la esporulación de las muestras tratadas con respecto al ensayo control. Así mismo, se observa que los tratamientos con la arcilla CS16-21H-C + aceite esencial y con el aceite esencial sin soporte no muestran diferencias representativas respecto al control en ninguno de los parámetros considerados.

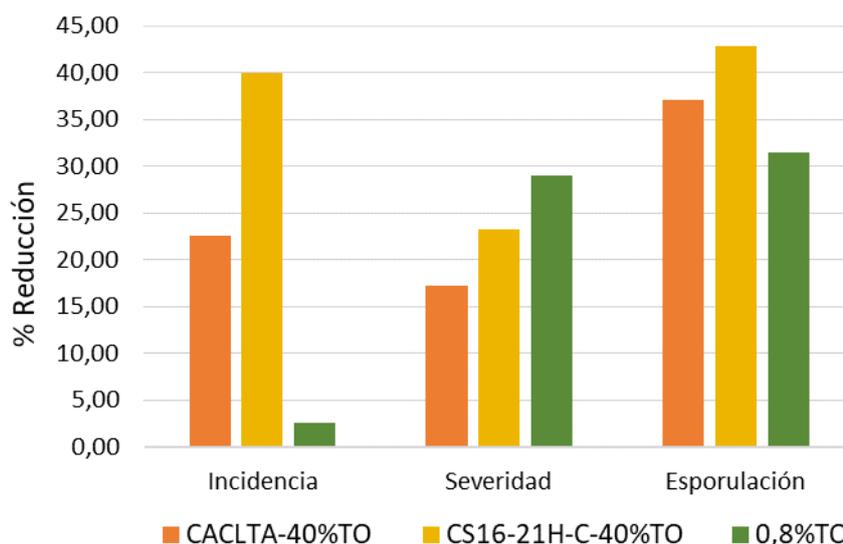


Figura 18. Porcentajes de reducción de la incidencia, severidad y esporulación al aplicar los tratamientos a mandarinas infectadas con PI respecto al ensayo control.

En el caso del tratamiento del hongo *Penicillium italicum* (*Figura 18*), se observan mejoras significativas en todos los parámetros al aplicar los 3 tipos de material biocida. En el caso concreto del tratamiento con la arcilla (CS16-21H-C-40%TO), este presentó una mayor actividad biocida tanto para la incidencia como la esporulación, logrando reducir ambos un 40% y mostrando a su vez un mejor resultado que el tratamiento realizado con zeolita LTA (CACLTA-40%TO) y aceite esencial de tomillo puro. Cabe destacar que el ensayo realizado con el recubrimiento que contenía aceite esencial puro apenas mostró cambios en el porcentaje de mandarinas infectadas (incidencia), pero sí que consiguió una reducción importante de la severidad. No obstante, este resultado no se considera significativo, pues la reducción del porcentaje de incidencia, que es el parámetro más importante, es mínima.

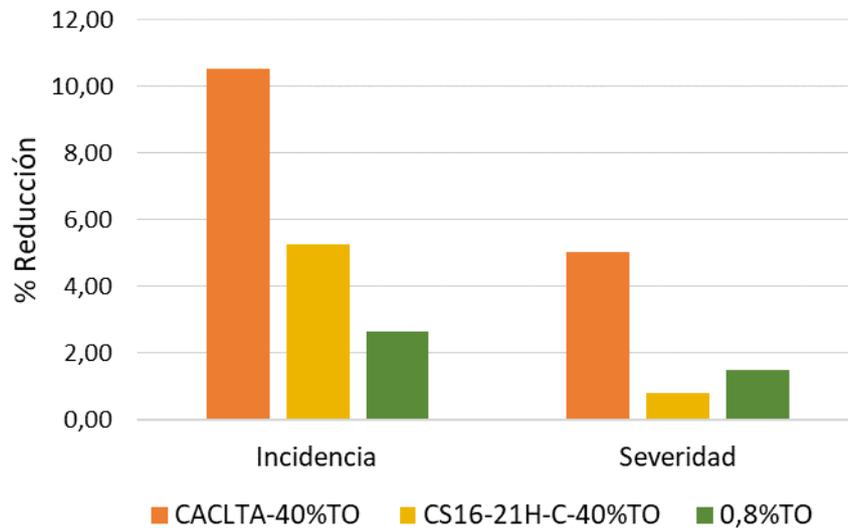


Figura 19. Porcentajes de reducción de la incidencia y severidad al aplicar los tratamientos a mandarinas infectadas con GC respecto al ensayo control.

Por último, se estudió también la infección generada por *Geotrichum citri-aurantii*, después de la aplicación de los recubrimientos mencionados. En este caso, el parámetro de la incidencia es el que mostró un mayor porcentaje de reducción, aunque la misma no superó el 11% como se aprecia en la *Figura 19*, y la zeolita CACLTA presentó un mayor efecto que la arcilla y el aceite puro, tanto para la inhibición del crecimiento fúngico como para la reducción del diámetro de podredumbre. El tratamiento 0,8%TO fue el que menos impacto presentó, casi imperceptible. En este gráfico de barras no aparece el factor de esporulación, dado que GC no se reproduce por esporas y, por tanto, este factor no se puede evaluar.

Las imágenes de las mandarinas tratadas a partir de los materiales funcionalizados, frente a los hongos PD, PI y GC se pueden observar en las *Figura 20, 21 y 22*, respectivamente.

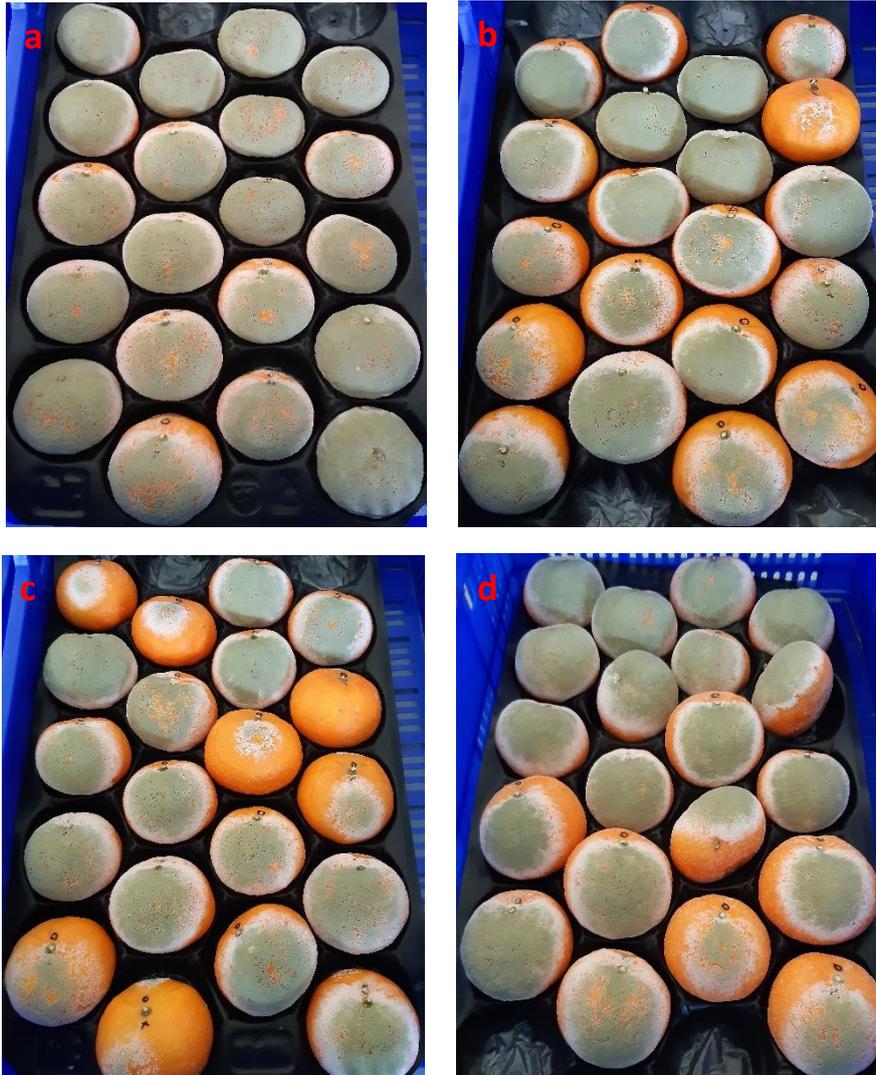


Figura 20. Fotografías de las mandarinas tratadas contra el hongo PD: control (a), CS16-21H-C-40%TO (b), CACLTA-40%TO (c) y 0.8%TO (d).

Aunque los resultados obtenidos contra el hongo PI son interesantes, los resultados finales no son los esperados, pues los sistemas preparados no parecen ser activos frente a los otros hongos, especialmente frente al hongo GC. Sin embargo, este pequeño estudio ha comprobado la existencia de una actividad biocida en los materiales preparados, aunque ésta parece depender de distintos parámetros como las características físico-químicas y estructurales de los materiales sobre los que se ha soportado el aceite esencial. Estas características hacen que aumente o disminuya la actividad antifúngica en función del tipo de hongo sobre el que se actúa.

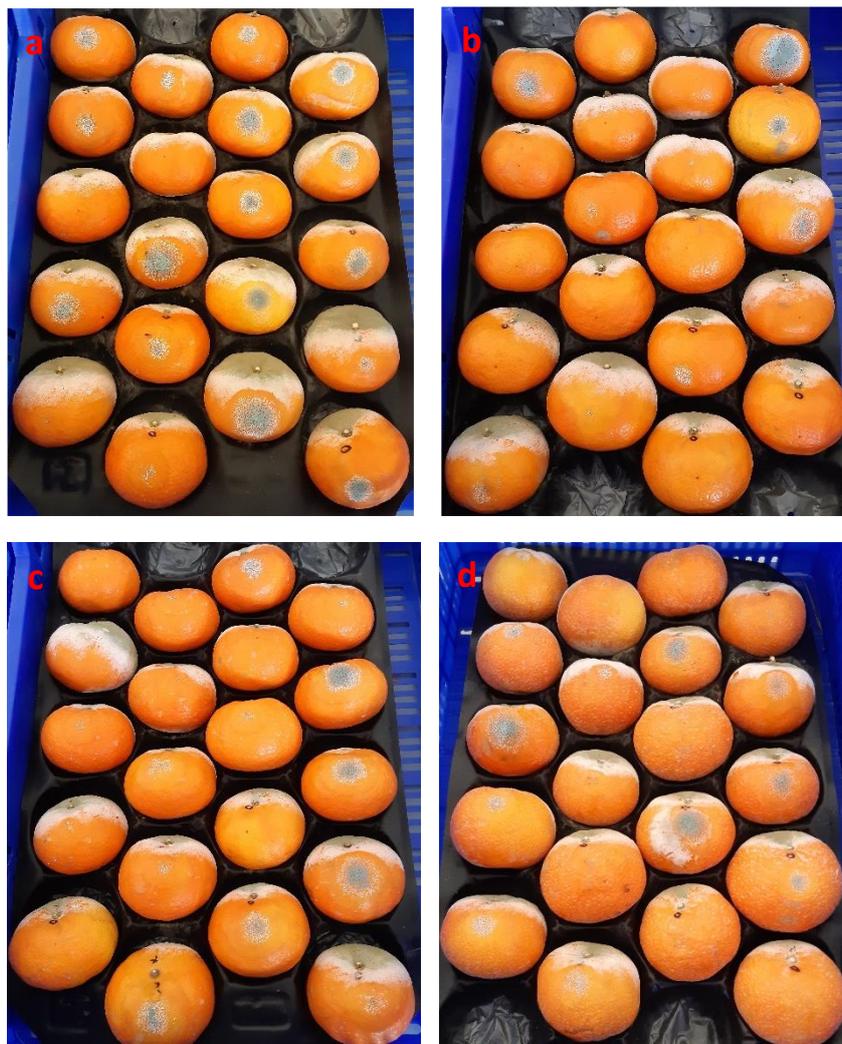


Figura 21. Fotografías de las mandarinas tratadas contra el hongo PI: control (a), CS16-21H-C-40%TO (b), CACLTA-40%TO (c) y 0.8%TO (d).

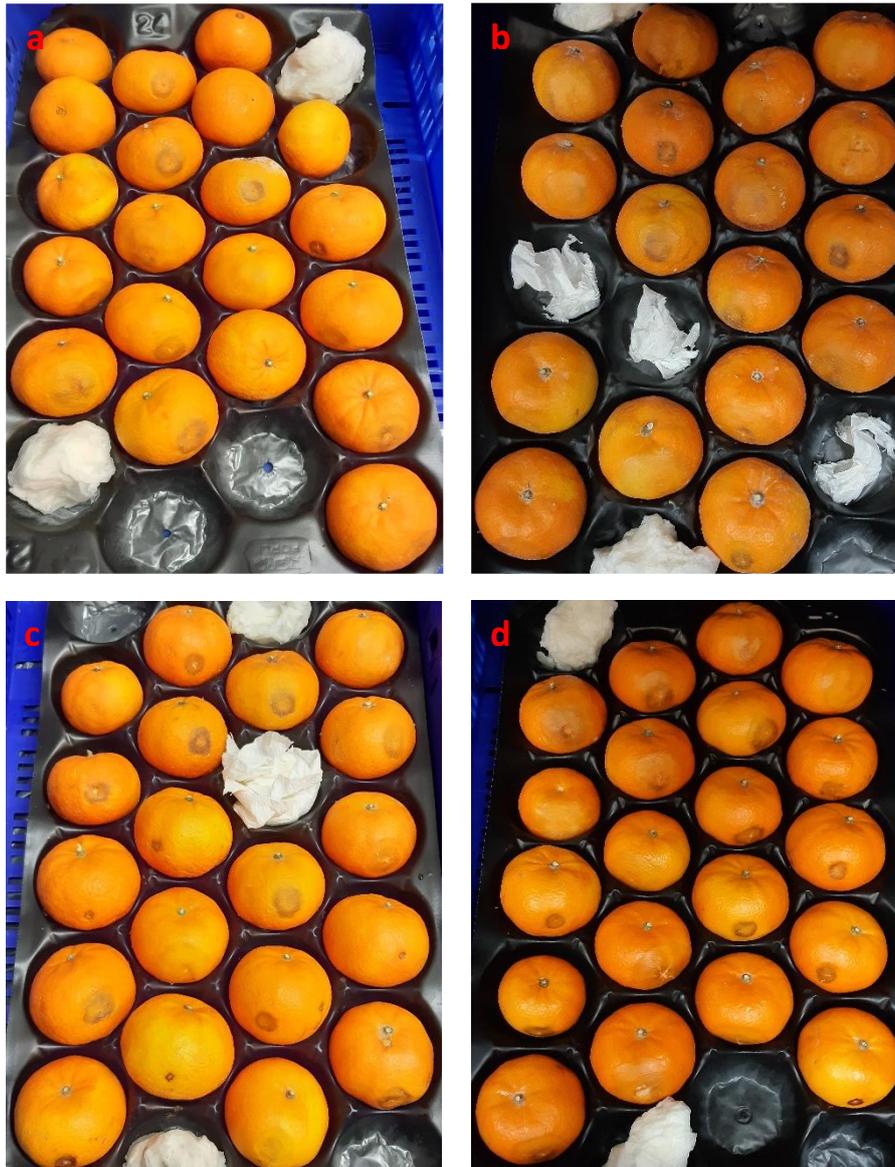


Figura 22. Fotografías de las mandarinas tratadas contra el hongo GC: control (a), CS16-21H-C-40%TO (b), CACLTA-40%TO (c) y 0.8%TO (d).

A continuación, para poder comparar más fácilmente los resultados obtenidos con cada uno de los materiales preparados frente a los tres tipos de hongos estudiados, se han realizado las representaciones mostradas en la Figura 23. En términos generales, se observa cómo todos los tratamientos realizados presentan una mayor eficacia frente el hongo *Penicillium italicum*, seguido de la actividad frente al PD, siendo menos activos frente al GC. Comparando los distintos tratamientos, parece que el tratamiento con zeolita y aceite esencial de tomillo (CACLTA-40%TO) es el que presenta una actividad antifúngica más amplia, actuando frente a todos los hongos. El tratamiento con arcilla

(CS16-21H-C-40%TO), por el contrario, es muy eficaz frente al PI, pero apenas es activo frente a los otros hongos, obteniendo los peores resultados con las formulaciones en las que se añade el aceite esencial TO sin soporte. Esto podría indicar que la zeolita es el mejor soporte, pero sería necesario realizar más ensayos, en los que se:

- Busque otra forma de aplicar los recubrimientos a la fruta en sustitución a la inmersión, intentando conseguir un recubrimiento más homogéneo.
- Modifique la forma de impregnación del aceite esencial sobre los soportes, pues su liberación dependerá de esto y lo mismo es la clave para aumentar la actividad biocida.
- Varíe la formulación de los recubrimientos o las cantidades empleadas de los diferentes componentes, siempre buscando conseguir reducir al máximo la incidencia y sin producir fitotoxicidad en la fruta.
- Analice si otros aceites esenciales tienen un mayor efecto sobre los hongos estudiados, en este sentido se ha descrito el uso de aceite esencial de canela o aceite esencial de hierba de limón o menta, entre otros.
- Disminuya la concentración de aceite esencial en la zeolita, pero se aumente la concentración de material antifúngico en la formulación, buscando así una mayor dispersión del material antifúngico y una liberación más prolongada.
- Realice un estudio cinético de liberación del aceite esencial en los materiales funcionalizados.
- Cambie la variedad de los frutos empleados para los ensayos, ya que pueden influir aspectos como el grosor y los componentes de la piel.
- Varíe las condiciones de almacenamiento durante la realización del estudio, pues estas pueden influir en la rapidez de pudrición.

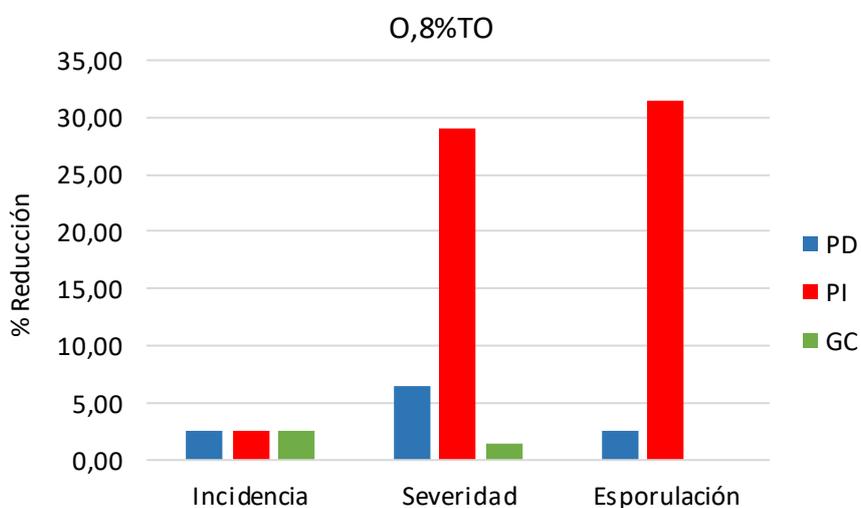
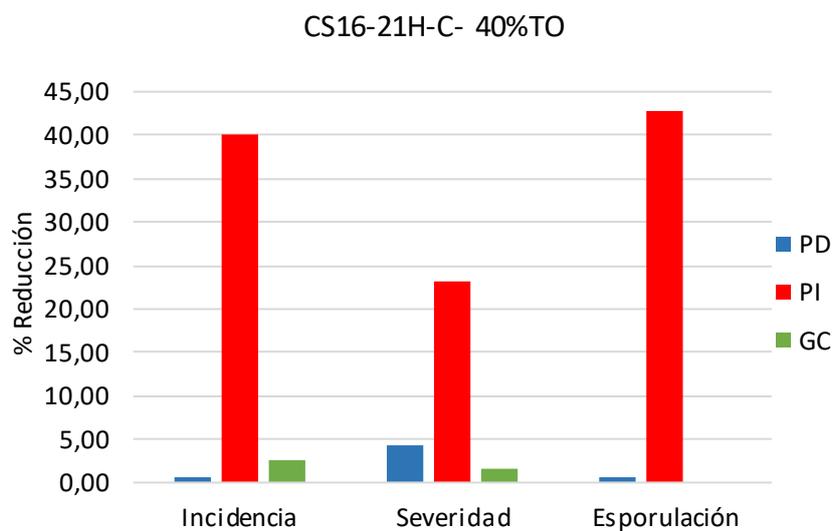
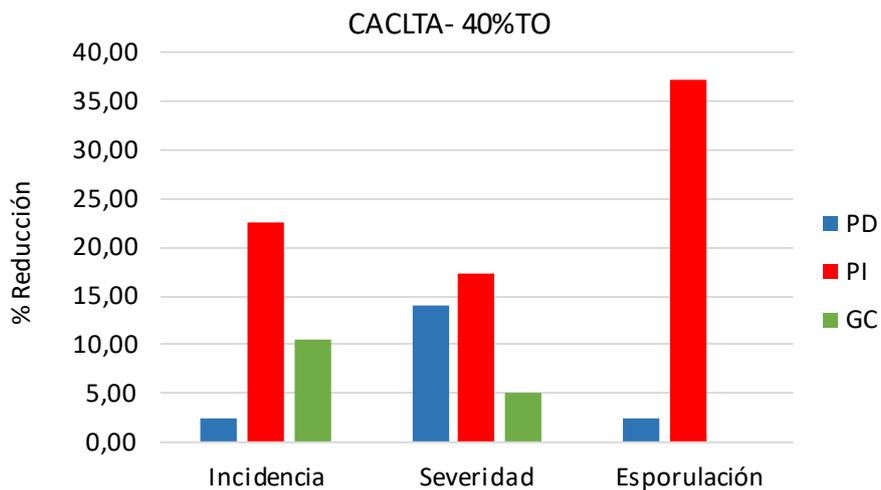


Figura 23. Actividad de cada tratamiento frente a los tres tipos de hongos estudiados.

7. CONCLUSIONES

La realización de un estudio bibliográfico sobre materiales con propiedades antifúngicas para el tratamiento de cítricos ha permitido comprobar que los productos naturales, en concreto los aceites esenciales, son una alternativa real a los fungicidas comúnmente empleados en la postcosecha de cítricos debido a sus propiedades antibacterianas y antifúngicas, directamente relacionadas con la presencia de componentes volátiles de carácter bioactivo en su composición. En base a esto, se han sintetizado nuevos materiales con propiedades biocidas, mediante la funcionalización de zeolitas y arcillas con aceite esencial de tomillo. Los materiales desarrollados actúan como soportes del aceite esencial, permitiendo una liberación controlada en el tiempo del aceite esencial. A partir de estos materiales, se han elaborado diferentes formulaciones, las cuales se han incorporado como recubrimientos en la piel de cítricos para estudiar *in vivo* la actividad biocida de los mismos contra los hongos fitopatógenos más comunes en estos frutos.

Las formulaciones empleadas logran reducir la incidencia, la severidad y la esporulación frente al crecimiento del hongo *Penicillium italicum*. Teniendo en cuenta que el parámetro de la incidencia es el más importante para poder evaluar la actividad biocida, se ha concluido que la formulación con arcilla natural y aceite esencial de tomillo es la que presenta un mejor resultado. Sin embargo, la efectividad frente a *Penicillium digitatum* y *Geotrichum citri-aurantii* de esta formulación es mucho menor que la conseguida con la que contenía zeolita. En este sentido, el material zeolita + aceite esencial de tomillo es el que en conjunto tiene una mejor actividad biocida frente a los 3 hongos estudiados, lo que indicaría que la zeolita es el mejor soporte para liberar el aceite esencial. Asimismo, los resultados obtenidos han mostrado que la actividad biocida depende de las características del soporte sobre el que se coloca el aceite esencial y del tipo de hongo sobre el que se actúa. Además, se observa que el soporte de aceite esencial sobre arcilla o zeolita parece aumentar su actividad biocida. Sin embargo, sería necesario realizar más ensayos para poder conseguir un mayor poder de inhibición y permitir obtener un sustituto a los fungicidas habituales empleados para el tratamiento de postcosecha de cítricos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Real Academia Española (RAE). Diccionario del español jurídico, Madrid, 2020.
- [2] Sheldon, R.A. (2007). *The E Factor: fifteen years on*. Green Chem., 9, 1273-1283.
- [3] Kletz, T.A. (1978). *What you don't have, can't leak*. Chemistry and Industry, 287-292.
- [4] Anastas, P. T., & Warner, J. C. (1998). *Green Chemistry Theory and Practice*. Nueva York, Oxford University Press.
- [5] Brundtland, G.H. (1987). *Our common future*. Oxford University Press.
- [6] <https://www.agenda2030.gob.es/objetivos>.
- [7] Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- [8] Fonfría, M. A. (2000). Citricultura. Vol. Ediciones Mundi-Prensa. Mundi-Prensa.
- [9] Amat, S. R. (1988) *Defectos y alteraciones de los frutos cítricos en su comercialización*. Comité de Gestión para la Exportación de Frutos Cítricos.
- [10] Cuquerella, J.; Salvador, A. & Monterde, A. (2004). *Parámetros de recolección de mandarinas y naranjas. Influencia sobre algunos tratamientos postcosecha*. Todo Citrus, 27, 7-13.
- [11] Teruel Bastida, C. (2015). *Procesado de cítricos en una central hortofrutícola de la vega baja del segura*. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- [12] Baldwin, E. A.; Hagebmaier, R. & Bai, J. (2011). *Edible coatings and films to improve food quality*. 2nd Edition. CRC press. Boca Raton, Florida.
- [13] Diario Oficial de la Unión Europea. Reglamento (UE) n° 1129/2011 DE LA COMISIÓN de 11 de noviembre de 2011 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) n° 1333/2008.
- [14] Park, H.J. (1999). *Development of advanced edible coating of fruits*. Trends in Food Science & Techno, 10, 250-260.
- [15] Warriner, K.; Huber, A.; Namvas, A.; Fan, W. & Dinfield, K. (2009). *Recent advance in microbial safety of fresh fruits and vegetables*. Adv. Food and Nutri. Res., 57, 155-208.
- [16] Baldwin, E.A.; Nesperos-Carriedo, M.O. & Baker, R.A. (1995). *Use of edible coating to preserve quality of lightly and slightly processed product*. Criti. Rev. Food Sc. Nutri., 35, 509-552.
- [17] Kester, J. & Fennema, O. (1986). *Edible films and coatings: A review*. Food Technology, 40, 47-59.
- [18] Phan, T.D.; Debeaufort, F.; Luv, D. & Voilley, A. (2008). *Moisture barrier wetting and mechanical properties of shellac/agar or shellac/cassava starch bilayer and bio membrane for food application*. Journal of Membrane Science, 325, 277-283.
- [19] Tadeo, N. (2008). *Food quality and safety in export fresh fruit horticultural products: Implying in the labor process of agribusiness related to sweat citrus fruit in Entre Rios*

province. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación. Mundo Agrario, vol. 8, nº 16, ISSN 1515-5994.

[20] Rivera, G. (1999). *Conceptos introductorios a la Fitopatología*. Universidad Nacional San José, Costa Rica, 308.

[21] Palou, L. (2014). *Penicillium digitatum, Penicillium italicum in citrus fruit (Green Mold, Blue Mold)*. Chapter 2. Academic Press. Postharvest Decay, Control Strategies. London, UK, 45-102.

[22] Smilanick, J.L.; Brown, G.E. & Eckert, J.W. (2006). *Postharvest citrus diseases and their control. Fresh Citrus Fruit*. 2nd edition. Florida Science, Longboat Key Florida, EE. UU., 339-396.

[23] Pitt, J. I. & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage*. 3rd edition. Springer Science plus Business Media. New York.

[24] Pérez, M. F.; Contreras, L.; Garnica, N. M.; Fernández-Zenoff, M. V.; Farías, M.E.; Sepulveda, M.; Ramallo, J. & Dib, J. R. (2016). *Native Killer Yeasts as Biocontrol Agents of Postharvest Fungal Diseases in Lemons*. Tulane University Health Sciences Center. UNITED STATES. Plos One.

[25] Droby, S.; Eick, A.; Macarasin, D.; Cohen, L.; Rafael, G.; Stange, R.; McColum, G.; Dudai, N.; Nasser, A.; Wisniewsky, M. & Shapira, R. (2008). *Role of citrus volatiles in host recognition, germination and growth of Penicillium digitatum and P. italicum*. Postharvest Biol Technol, 49, 386-396.

[26] Eckert, J. W. & Eaks, I. L. (1989). *Postharvest disorders and diseases of citrus fruits*. University of California Press, Berkeley, CA, USA. The Citrus Industry, 179-260.

[27] Nakamura, M.; Suprpta, D.N.; Iwai, H. & Arai A.K. (2001). *Comparison of endopolygalacturonase activities of citrus and non-citrus races of Geotrichum candidum, and cloning and expression of the corresponding genes*. Mol. Plant Pathol., 2, 265274.

[28] AINIA, INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LA ALIMENTACIÓN, 2017.

[29] Sarrocco, S. & Vannacci, G. (2018). *Preharvest application of beneficial fungi as a strategy to prevent postharvest mycotoxin contamination: A review*. Crop Protection, 110, 160-170.

[30] Tuset, J.J.; García, J. & Hinarejos, C. (1987). *Podredumbres de los frutos cítricos*. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Generalitat Valenciana, España, 33-125.

[31] Schirra, M.; D'Aquino, S.; Cabras, P. & Angioni, A. (2011). *Control of postharvest diseases of fruit by heat and fungicides: efficacy, residue levels, and residue persistence. A review*. Journal. Agric. Food Chem, 59, 16, 8531-8542.

[32] *Tecnología Poscosecha. Cítricos y cultivos emergentes en la Comunidad Valenciana*. Julio 2019, SPE3, s.l., Valencia, España. Patología poscosecha de los frutos cítricos por Lluís Palou, 263-281.

[33] Conselleria d'Agricultura Medi Ambient, Canvi Climàtic i Desenvolupament Rural. Sanitat vegetal. Generalitat Valenciana. Butlletí d'avisos nº 9 de junio de 2019.

- [34] Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Dirección general de sanidad de la producción agraria. Lista comunitaria de sustancias activas aprobadas, excluidas y en evaluación comunitaria, sustancias de bajo riesgo, sustancias candidatas a la sustitución y lista de sustancias básicas, 03 de abril de 2020.
- [35] Conselleria d'Agricultura Medi Ambient, Canvi Climàtic i Desenvolupament Rural. Sanitat vegetal. Generalitat Valenciana. Butlletí d'avisos nº 9 de junio de 2019. <http://www.agroambient.gva.es/boletin-de-avisos>.
- [36] Boubaker, H.; Saadi, B.; Boudyach, E. H. & Benaoumar, A. A. (2009). *Sensitivity of Penicillium digitatum and P. italicum to imazalil and thiabendazole in Morocco*. Plant Pathology Journal, 8, 152-158.
- [37] Palou, L. 2011. *Control integrado no contaminante de enfermedades de poscosecha (CINCEP): nuevo paradigma para el sector español de los cítricos*. Levante Agrícola, 406, 173-183.
- [38] Viñas, I.; Teixidó, N.; Abadias, M.; Torres, R. & Usall, J. (2005). *Resistencias a fungicidas en poscosecha de frutos. Situación actual y perspectivas*. Phytoma España, 173, 29-36.
- [39] Liu, X.; Wang, L.P.; Li, Y.C.; Li, Y.C., Yu, T. & Zheng, X. D. (2009) *Antifungal activity of thyme oil against Geotrichum citri-aurantii in vitro and in vivo*. Journal of Applied Microbiology, 107, 1450-1456.
- [40] Droby, S.; Cohen, L.; Daus, A.; Weiss, B.; Horev, B.; Chalutz, E. & Shachnai, A. (1998). *Commercial testing of Aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus*. Biological control, 12, 97-101.
- [41] McKay, A. H.; Förster, H. & Adaskaveg, J. E. (2012). *Efficacy and application strategies for propiconazole as a new postharvest fungicide for managing sour rot and green mold of citrus fruit*. Plant disease, 96, 235-242.
- [42] Palou, L.; Smilanick, J. L. & Droby, S. (2008). *Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue molds*. Stewart Postharvest Review, 4, 1-16
- [43] Palou, L. (2009). *Control of citrus postharvest diseases by physical means*. Tree and Forestry Science and Biotechnology, 3, 127-142.
- [44] Palou, L. (2005a). *Sistemas alternativos a los fungicidas sintéticos para el control de enfermedades de poscosecha de cítricos*. Palma del Rio, Córdoba.
- [45] Sui, Y.; Wisniewski, M.; Droby, S.; Norelli, J. & Liu, J. (2016). *Recent advances and current status of the use of heat treatments in postharvest disease management systems: is it time to turn up the heat?* Trends Food Sci. Technol., 51, 34-40.
- [46] Schirra, M.; D'hallewin, G.; Ben-Yehoshua, S. & Fallik, E. (2000). *Host-pathogen interactions modulated by heat treatment*. Postharvest Biol. Technol., 18, 151-157.
- [47] Ferguson, I.B.; Ben-Yehoshua, S.; Mitcham, E.J.; McDonald, R.E. & Lurie, S. (2000). *Postharvest heat treatments: introduction and workshop summary*. Postharvest Biol Technol., 21, 1-6.

- [48] Pavoncello, D.; Lurie, S.; Droby, S. & Porat, R. (2001). *A hot treatment induces resistance to *Penicillium digitatum* and promotes the accumulation of heat shock and pathogenesis-related proteins in grapefruit flavedo*. *Physiologia Plantarum*, 111, 17-22.
- [49] Palou, L. 2005b. *Métodos de control físicos ensayados en postcosecha contra las podredumbres verde y azul de los cítricos*. *Levante Agrícola*, 377, 341-350.
- [50] Palou, L.; Usall, J.; Muñoz, J. A.; Smilanick, J. L. & Viñas, I. (2002). *Hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate for the control of postharvest green and blue molds of clementine mandarins*. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 93-96.
- [51] Palou, L. y Plaza, P. (2005c). *Tratamientos con calor para el control de enfermedades de postcosecha de cítricos*. *Todo Citrus*, 31, 21-36.
- [52] Jeong, R. D.; Chu, E. H.; Lee, G. W.; Cho, C. & Park, H. J. (2016). *Inhibitory effect of gamma irradiation and its application for control of postharvest green mold decay of Satsuma mandarins*. *International Journal of Food Microbiology*, 234, 1-8.
- [53] Wang, C.; Gao, Y.; Tao, Y.; Wu, X. & Zhibo, C. (2017). *Influence of γ -irradiation on the reactive-oxygen metabolism of blueberry fruit during cold storage*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 41(Supplement C), 397-403.
- [54] Alonso, M. y Palou, L. (2007). *Effect of X-ray irradiation on fruit quality of clementine mandarin cv. 'Clemenules'*. *Radiation Physics and Chemistry* 76, 1631-1635.
- [55] Reddy, S. V. R.; Sharma, R. R. & Gundewadi, G. (2018). *Use of Irradiation for Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables*. Division of Post Harvest Technology, ICAR-Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, India. Chapter 6. 121-136.
- [56] Rojas-Argudo, C.; Palou, L.; Bermejo, A.; Cano, A.; del Río, M. A. & González- Mas, M. C. (2012). *Effect of X-ray irradiation on nutritional and antifungal bioactive compounds of 'Clemenules' clementine mandarins*. *Postharvest Biology and Technology*, 68, 47-53.
- [57] Nam, H.; Ramakrishnan, S. R. & Kwon, J. (2019). *Effects of electron-beam irradiation on the quality characteristics of mandarin oranges (*Citrus unshiu* (Swingle) Marcov) during storage*. *Food Chemistry*, 286, 338-345.
- [58] Ruiz, V. E.; Cerioni, L.; Zampini, I. C.; Cuello, S.; Isla, M. I., Hilal, M. & Rapisarda, V. A. (2017). *UV-B radiation on lemons enhances antifungal activity of flavedo extracts against *Penicillium digitatum**. *LWT- Food Science and Technology*, 85, Part A, 96-103.
- [59] Gündüz, G. T., & Pazir, F. (2013). *Inactivation of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* under in vitro and in vivo conditions by using UV-C light*. *Journal of Food Protection*, 76, 1761-1766.
- [60] Yamaga, I., Kuniga, T., Aoki, S., Kato, M., & Kobayashi, Y. (2016). *Effect of ultraviolet-b irradiation on disease development caused by *Penicillium italicum* in satsuma Mandarin fruit*. *Horticulture Journal*, 85, 86-91.
- [61] McDonald, K. F.; Curry, R. D.; Clevenger, T. E.; Unklesbay, K.; Eisenstark, A.; Golden, J. & Morgan, R. D. (2000). *A comparison of pulsed and continuous ultraviolet light sources*

- for the decontamination of surfaces. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 28, 1581-1587.
- [62] Yamaga, I.; Takahashi, T.; Ishii, K.; Kato, M. & Kobayashi, Y. (2015). *Suppression of blue mold symptom development in satsuma Mandarin fruits treated by low-intensity blue led irradiation*. *Food Science and Technology Research*, 21, 347-351.
- [63] Ballester, A. R. & Lafuente, M. T. (2017). *LED Blue Light-induced changes in phenolics and ethylene in citrus fruit: Implication in elicited resistance against *Penicillium digitatum* infection*. *Food Chemistry*, 218, 575-583.
- [64] Spalding, D.H. & Reeder, W.F. (1976). *Low pressure (hypobaric) storage of limes*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 101, 367-370.
- [65] Palou, L.; Smilanick, J.L.; Crisosto, S.H. & Mansour, M. (2001). *Effect of gaseous ozone exposure on the development of green and blue molds on cold stored citrus fruit*. *Plant Dis.*, 85, 632-638.
- [66] Palou, L.; Smilanick, J. L. & Margosan, D. A. (2007). *Ozone applications for sanitation and control of postharvest diseases of fresh fruits and vegetables*. *Postharvest Technologies to Control Fungal Diseases in Fruits and Vegetables*. Transworld Research Network, 39-70.
- [67] Droby, S., Wisniewski, M., Teixidó, N., Spadaro, D., Jijakli, M.H., (2016). *The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products*. *Postharvest Biol. Technol.*, 122, 22-29.
- [68] Ippolito, A.; El Ghaouth, A.; Wilson, C.L. & Wisniewski, M. (2011). *Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses*. *Postharvest Biol. Technol.*, 19, 265-272.
- [69] Qin, G. & Tian, S. (2005). *Enhancement of biocontrol activity of *Cryptococcus laurentii* by silicon and the possible mechanisms involved*. *Phytopathology*, 95, 69-75.
- [70] Apaliya, M.T.; Zhang, H.; Yang, Q.; Zheng, X.; Zhao, L.; Kwaw, E. & Mahunu, G.K. (2017). *Hanseniaspora uvarum enhanced with trehalose induced defense-related enzyme activities and relative genes expression levels against *Aspergillus tubingensis* in table grapes*. *Postharvest Biol. Technol.*, 132, 162-170.
- [71] Bélanger, R.R.; Labbé, C.; Lefebvre, F. & Teichmann, B. (2012). *Mode of action of biocontrol agents: All that glitters is not gold*. *Can. J. Plant Pathol.*, 34, 469-478.
- [72] Tuset, J.J. (1999). *Perspectivas del control de las podredumbres en la postcosecha de cítricos*. *Levante Agrícola. Especial Postcosecha*, 348, 272-280.
- [73] Zhang, H.; Mahunu, G.K.; Castoria R.; Yang, Q. & Apaliya, M.T (2018). *Recent developments in the enhancement of some postharvest biocontrol agents with unconventional chemicals compounds*. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 180–187.
- [74] Zhu, H.; Zhao, L.; Zhang, X.; Foku, J.M.; Li, J.; Hu, W. & Zhang, H. (2019). *Efficacy of *Yarrowia lipolytica* in the biocontrol of green mold and blue mold in *Citrus reticulata* and the mechanisms involved*. *Biological Control*, 139, 104096.

- [75] Tian, Z.; Chen, C.; Chen, K.; Liu, P.; Fan, Q.; Zhao, J. & Long, C. (2020). *Biocontrol and the mechanisms of Bacillus sp. w176 against postharvest green mold in citrus*. *Postharvest Biology and Technology*, 159, 111022.
- [76] Pérez, M. F.; Díaz, M. A.; Perevra, M. M.; Córdoba, J. M.; Isas, A.S.; Sepúlveda, M.; Ramallo, J. & Dib, J. R. (2019). *Biocontrol features of Clavispora lusitaniae against Penicillium digitatum on lemons*. *Postharvest Biology and Technology*, 155, 57-64.
- [77] Wanga, S.; Ruana, C.; Yia, L.; Denga, L.; Yaoa, S. & Zenga, K. (2020). *Biocontrol ability and action mechanism of Metschnikowia citriensis against Geotrichum citri-aurantii causing sour rot of postharvest citrus fruit*. *Food Microbiology*, 87, 103375.
- [78] Panebianco, S.; Vitale, A.; Polizzi, G.; Scala, F. & Cirvilleri, G. (2015). *Enhanced control of postharvest citrus fruit decay by means of the combined use of compatible biocontrol agents*. *Biological Control*, 84, 19-27.
- [79] U.S. Food and Drug Administration, visto el 21/04/2020. Disponible en <https://www.fda.gov>.
- [80] Smilanick, J. L.; Mansour, M. F.; Gabler, F. M. & Sorenson, D. (2008). *Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides*. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 226-238.
- [81] Youssef, K.; Ligorio, A.; Sanzani, S. M.; Nigro, F. & Ippolito, A. (2012b). *Control of storage diseases of citrus by pre- and postharvest application of salts*. *Postharvest Biology and Technology*, 72, 57-63.
- [82] Youssef, K.; Sanzani, S. M.; Ligorio, A.; Ippolito, A. & Terry, L. A. (2014). *Sodium carbonate and bicarbonate treatments induce resistance to postharvest green mould on citrus fruit*. *Postharvest Biology and Technology*, 87, 61-69.
- [83] Moscoso-Ramírez, P. A.; Montesinos-Herrero, C. & Palou, L. (2013). *Control of citrus postharvest penicillium molds with sodium Ethylparaben*. *Crop Protection* 46, 44-51.
- [84] Fu, L. H.; Hu, K. D.; Hu, L. Y.; Li, Y. H.; Hu, L. B.; Yan, H.; Liu, Y. S. & Zhang, H. (2014). *An antifungal role of hydrogen sulfide on the postharvest pathogens Aspergillus niger and Penicillium italicum*. *PLOS ONE*, 9, 104206.
- [85] Duan, X.; OuYang, Q.; Jing, G. & Tao, N. (2016). *Effect of sodium dehydroacetate on the development of sour rot on Satsuma mandarin*. *Food Control*, 65, 8-13.
- [86] Montesinos-Herrero, C.; Moscoso-Ramírez, P. A. & Palou, L. (2016). *Evaluation of sodium benzoate and other food additives for the control of citrus postharvest green and blue molds*. *Postharvest Biology and Technology*, 115, 72-80.
- [87] Youssef, K.; Ligorio, A.; Nigro, F. & Ippolito, A. (2012a). *Activity of salts incorporated in wax in controlling postharvest diseases of citrus fruit*. *Postharvest Biology and Technology*, 65, 39-43.
- [88] Iqbal, Z.; Singh, Z.; Khangura, R. & Ahmad, S. (2012). *Management of citrus blue and green moulds through application of organic elicitors*. *Australas. Plant Pathol.*, 41, 69-77.

- [89] Kuc, J. (2001). *Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application*. Eur. J. Plant. Pathol., 107, 7-12.
- [90] Moscoso-Ramírez, P. A. & Palou, L. (2013). *Evaluation of postharvest treatments with chemical resistance inducers to control green and blue molds on orange fruit*. Postharvest Biology and Technology, 85, 132-135.
- [91] Sánchez, G. R.; Mercado, E. C.; Peña, E. B.; de la Cruz, H. R. & Pineda, E. G. (2010). *El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México. Biológicas, 12, 90-95.
- [92] Huang, R. H.; Liu, J. H.; Lu, Y. M. & Xia, R. X. (2008). *Effect of salicylic acid on the antioxidant system in the pulp of 'Cara cara' navel orange (Citrus sinensis L. Osbeck) at different storage temperatures*. Postharvest Biology and Technology, 47, 168-175.
- [93] Aminifard, M. H.; Mohammadi, S. & Fatemi, H. (2013). *Inhibition of green mould in blood orange (Citrus sinensis var, Moro) with salicylic acid treatment*. Arch. Phytopathol. Plant Prot., 46, 695-703.
- [94] Zhu, F.; Chen, J.; Xiao, X.; Zhang, M.; Yun, Z.; Zeng, Y.; Xu, J.; Cheng, Y. & Deng, X. (2016). *Salicylic acid treatment reduces the rot of postharvest citrus fruit by inducing the accumulation of H₂O₂, primary metabolites and lipophilic polymethoxylated flavones*. Food Chemistry, 207, 68-74.
- [95] Gozzo, F. (2003). *Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach*. J. Agric. Food Chem., 51, 4487-4503.
- [96] Agostini, J.P.; Bushong, P.M. & Timmer, L.W. (2003). *Greenhouse evaluation of products that induce host resistance for control of scab, malanose, and alternaria brown spot of citrus*. Plant Dis., 87, 69-74.
- [97] Quaglia, M.; Ederli, L.; Pasqualini, S. & Zizzerini, A. (2011). *Biological control agents and chemical inducers of resistance for postharvest control of Penicillium expansum Link on apple fruit*. Postharvest Biol. Technol., 59, 307-315.
- [98] Jakab, G.; Cottier, V.; Toquin, V.; Rigoli, G.; Zimmerli, L.; Mettraux, J.P. & Mauch-Mani, B. (2001). *β -aminobutyric acid-induced resistance in plants*. Eur. J. Plant Pathol., 107, 29-37.
- [99] Cohen, Y.R. (2002). *β -aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens*. Plant Dis., 86, 448-457.
- [100] Tavallali, V.; Karimi, S.; Mohammadi, S. & Hojati, S. (2008). *Effects of β -aminobutyric acid on the induction of resistance to Penicillium italicum*. World Appl. Sci. J., 5, 345-351.
- [101] Currie, H. A. & Perry, C. C. (2007). *Silica in Plants: Biological, Biochemical and Chemical Studies*. Annals of Botany, 100, 1383-1389.
- [102] Liu, J.; Zong, Y.; Qin, G.; Li, B. & Tian, S. (2010). *Plasma membrane damage contributes to antifungal activity of silicon against Penicillium digitatum*. Current Microbiology, 61, 274-279.

- [103] Wei, Z. M.; Laby, R. J.; Zumoff, C. H.; Bauer, D. W.; He, S.Y.; Collmer, A. & Beer, S. V. (1992). *Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen Erwinia amylovora*. Science, 257, 85-88.
- [104] de Capdeville, G.; Beer, S. V.; Wilson, C. L. & Aist, J. R. (2008). *Some cellular correlates of harpin-induced resistance to blue mold of apples*. Tropical Plant Pathol., 33, 103-113.
- [105] Lucon, C. M. M.; Guzzo, S. D.; de Jesus, C. O.; Pascholati, S. F. & de Goes, A. (2010). *Postharvest harpin or Bacillus thuringiensis treatments suppress citrus black spot in "Valencia" oranges*. Crop Protection, 29, 766-772.
- [106] Papoutsisa, K.; Mathioudakisc, M. M.; Hasperuéd, J. H. & Ziogase, V. (2019). *Non-chemical treatments for preventing the postharvest fungal rotting of citrus caused by Penicillium digitatum (green mold) and Penicillium italicum (blue mold)*. Trends in Food Science & Technology, 86, 479-491.
- [107] Li Destri Nicosia, M. G.; Pangallo, S.; Raphael, G.; Romeo, F. V.; Strano, M. C.; Rapisarda, P.; Droby, S. & Schena, L. (2016). *Control of postharvest fungal rots on citrus fruit and sweet cherries using a pomegranate peel extract*. Postharvest Biology and Technology, 114, 54-61.
- [108] Tripathi, P., & Dubey, N. K. (2004). *Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables*. Postharvest Biology and Technology, 32, 235-245.
- [109] Kanan, G. & Al-Najar, R. (2009). *In Vitro and in vivo activity of selected plant crude extracts and fractions against Penicillium Italicum*. Journal of Plant Protection Research, 49, 341-352.
- [110] Sanzani, S. M.; Schena, L. & Ippolito, A. (2014). *Effectiveness of phenolic compounds against citrus green mould*. Molecules, 19, 12500-12508.
- [111] Pangallo, S.; Li Destri Nicosia, M. G.; Raphael, G.; Levin, E.; Ballistreri, G.; Cacciola, S. O.; Rapisarda, P.; Droby, S. & Schena, L. (2017). *Elicitation of resistance responses in grapefruit and lemon fruits treated with a pomegranate peel extract*. Plant Pathology, 66, 633-640.
- [112] Talibi, I.; Boubaker, H.; Boudyach, E. H. & Ait Ben Aoumar, A. (2014). *Alternative methods for the control of postharvest citrus diseases*. Journal of Applied Microbiology, 117, 1-17.
- [113] Faleiro, M. L. (2011). *The mode of antibacterial action of essential oils*. Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances, 2, 1143-1156.
- [114] Novak, J.; Draxler, L.; Gohler, I. & Franz, C. M. (2005). *Essential oil composition of Vitex agnus-castus-comparison of accessions and different plant organs*. Flavor and Fragrance Journal, 20, 186-192.
- [115] Fathi, E. & Sefidkon, F. (2012). *Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of Eucalyptus sargentii*. Journal of Agricultural Science and Technology, 14, 1035-1042.

- [116] Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D. & Idaomar, M. (2008). *Biological effects of essential oils e a review*. Food and Chemical Toxicology, 46, 446-475.
- [117] Bajpai, V. K.; Baek, K.H. & Kang, S. C. (2012). *Control of Salmonella in foods by using essential oils: a review*. Food Research International, 45, 722-734.
- [118] Fisher, K. & Phillips, C. A. (2008). *Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?* Trends in Food Science & Technology, 19, 156-164.
- [119] Friedly, E. C.; Crandall, P. G.; Ricke, S. C.; Roman, M.; O'Bryan, C. & Chalova, V. I. (2009). *In vitro antilisterial effects of citrus oil fractions in combination with organic acids*. Journal of Food Science, 74, M67-M72.
- [120] Soković, M.; Glamočlija, J.; Marin, P. D.; Brkić, D. & van Griensven, L. J. L. D. (2010). *Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model*. Molecules, 15, 7532-7546.
- [121] Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., Bruyne, T., Hermans, N., et al. (2002). *Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo*. Journal of ethnopharmacology, 79, 213-220.
- [122] Deans, S. G. & Ritchie, G. (1987). *Antimicrobial properties of plant essential oils*. International Journal of Food Microbiology, 5, 165-180.
- [123] Dorman, H. J. D. & Deans, S. G. (2000). *Antimicrobial agents from plants, antibacterial activity of plant volatile oils*. Journal of Applied Microbiology, 88, 308-316.
- [124] Boubaker, H.; Karim, H.; El Hamdaoui, A.; Msanda, F.; Leach, D.; Bombarda, I.; et al. (2016). *Chemical characterization and antifungal activities of four Thymus species essential oils against postharvest fungal pathogens of citrus*. Industrial Crops and Products, 86 (Supplement C), 95-101.
- [125] Tabti, L.; Dib, M. E. A.; Djabou, N.; Benyelles, N. G.; Paolini, J.; Costa, J. et al. (2014). *Control of fungal pathogens of Citrus sinensis L by essential oil and hydrosol of Thymus capitatus L*. Journal of Applied Botany and Food Quality, 87, 279-285.
- [126] Regnier, T.; Combrinck, S.; Veldmana, W. & Du Plooy, W. (2014). *Application of essential oils as multi-target fungicides for the control of Geotrichum citri-aurantii and other postharvest pathogens of citrus*. Industrial Crops and Products, 61, 151-159.
- [127] Jhalegar, M. J.; Sharma, R. R. & Singh, D. (2015). *In vitro and in vivo activity of essential oils against major postharvest pathogens of Kinnow (Citrus nobilis x C. deliciosa) Mandarin*. Journal of Food Science & Technology, 52, 2229-2237.
- [128] Lombardo, P.; Guimaraens, A.; Franco, J.; Dellacassa, E. Faggiani, E. P. (2016). *Effectiveness of essential oils for postharvest control of Phyllosticta citricarpa (citrus black spot) on citrus fruit*. Postharvest Biology and Technology, 121, 1-8.
- [129] Tripathi, P. & Dubey, N. K. (2004). *Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables*. Postharvest Biology and Technology, 32, 235-245.

- [130] Trabelsi, D.; Hamdane, A. M.; Said, M. B. & Abdrabba, M. (2016). *Chemical composition and antifungal activity of essential oils from flowers, leaves and peels of Tunisian Citrus aurantium against Penicillium digitatum and Penicillium italicum*. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 19, 1660-1674.
- [131] Hossain, F.; Follett, P.; Vu Dang, K.; Harich, M.; Salmieri, S. & Lacroix, M. (2016). *Evidence for synergistic activity of plant-derived essential oils against fungal pathogens of food*. Food Microbiol., 53, 24-30.
- [132] OuYang, Q.; Okwong, R. O.; Chen, Y. & Tao, N. (2020). *Synergistic activity of cinnamaldehyde and citronellal against green mold in citrus fruit*. Postharvest Biology and Technology, 162, 111095.
- [133] Palou, L.; Valencia-Chamorro, S. A. & Pérez-Gago, M. B. (2015). *Antifungal edible coatings for fresh citrus fruit. A review*. Coatings, 5, 962-986.
- [134] 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 Biol. Technol., 122, 41-52.
- [135] Wisniewski, M.; Droby, S.; Norelli, J.; Liu, J. & Schena, L. (2016). *Alternative management technologies for postharvest disease control: the journey from simplicity to complexity*. Postharvest Biol. Technol., 122, 3-10.
- [136] Lia, J.; Lia, H.; Jic, S.; Chena, T.; Tiana, S. & Qina, G. (2019). *Enhancement of biocontrol efficacy of Cryptococcus laurentii by cinnamic acid against Penicillium italicum in citrus fruit*. Postharvest Biology and Technology, 149, 42-49.
- [137] Terao, D.; Nechet, K.D.; Ponte, M.S.; Maia, A.D.N.; Anjos, V.D.D. & Halfeld-Vieira, B.D. (2017). *Physical postharvest treatments combined with antagonistic yeast on the control of orange green mold*. Sci. Hortic., 224, 317-323.
- [138] Zhou, Y.; Deng, L. & Zeng, K. (2014). *Enhancement of biocontrol efficacy of Pichia membranaefaciens by hot water treatment in postharvest diseases of citrus fruit*. Crop Protection, 63, 89-96.
- [139] Shao, X.; Cao, B.; Xu, F.; Xie, S.; Yu, D. & Wang, H. (2015). *Effect of postharvest application of chitosan combined with clove oil against citrus green mold*. Postharvest Biology and Technology, 99, 37-43.
- [140] Koltza, E. A.; Santosa, I.; Dallemole-Giaretta, R.; Leitea, C. D. & Steilmanna, P. (2020). *Combining Brassica sachets and extracts with thermotherapy against postharvest green mold of Orange*. Scientia Horticulturae, 268, 109389.
- [141] Palou, L.; Marcilla, A.; Rojas-Argudo, C.; Alonso, M.; Jacas, J. A. & del Río, M. A. (2007). *Effects of X-ray irradiation and sodium carbonate treatments on postharvest Penicillium decay and quality attributes of clementine mandarins*. Postharvest Biology and Technology, 46, 252-261.
- [142] Cerrillo Olmo, J. L. (2019). *Desarrollo de nuevos materiales basados en metales nobles y seminobles para catálisis medioambiental y aplicaciones biocidas*. Instituto de Tecnología Química. Universidad Politécnica de Valencia.