



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

FoodUPV
INSTITUTO DE INGENIERIA DE ALIMENTOS

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos
(FoodUPV)

Evaluación del efecto antifúngico de compuestos fenólicos
para su aplicación a melocotón y nectarina

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos

AUTOR/A: Rojas Carmona, Rodrigo Ignacio

Tutor/a: Cháfer Nácher, María Teresa

Cotutor/a externo: Palou Vall, Lluís

Director/a Experimental: Perez Gago, Bernardita

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

TÍTULO: EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIFÚNGICO DE COMPUESTOS FENÓLICOS PARA SU APLICACIÓN A MELOCOTÓN Y NECTARINA.

Autores: Rodrigo Rojas Carmona¹; Maria Teresa Chafer¹; M. Bernardita Pérez-Gago², Lluís Palou².

Resumen:

Las podredumbres fúngicas causan más del 40% de las pérdidas postcosecha en frutas, y resulta clave encontrar soluciones sanas, seguras y viables para su control como las que representan compuestos naturales como los fenólicos con capacidad antifúngica, que podemos extraer de subproductos de la industria agroalimentaria. En esta investigación, se evaluó la efectividad de diferentes compuestos fenólicos, ácido ferúlico, gálico y tánico, como posibles agentes antifúngicos para el control de las enfermedades en fruta de hueso causadas por *Monillinia fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Penicillium expansum* y *Colletotrichum gloeosporoides*. Para ello, se llevaron a cabo estudios in vitro e in vivo en hongos característicos de frutas de hueso. Los ensayos in vitro revelaron una buena actividad antifúngica in vitro, destacable para los ácidos ferúlico y tánico a concentraciones muy bajas equivalentes a 0,1 mg L⁻¹. En los ensayos in vivo con nectarinas inoculadas, los compuestos fenólicos incorporados en formulaciones de goma arábica como recubrimiento, no fueron suficientemente efectivos para el control de las podredumbres gris y marrón. En futuros trabajos habrá que profundizar en sus formas de aplicación, dado el gran potencial de este tipo de compuestos.

Palabras clave: Antifúngico, fenoles, in vivo, aplicación, nectarinas, frutas de hueso, ácido ferúlico, gálico y tánico.

TITLE: EVALUATION OF THE ANTIFUNGAL EFFECTS OF PHENOLICS COMPOUNDS ON PEACHES AND NECTARINES.

Authors: Rodrigo Rojas Carmona¹; Maria Teresa Chafer¹; M. Bernardita Pérez-Gago², Lluís Palou².

Abstract:

Fungal rots cause more than 40% of postharvest losses in fruits, and it is key to find healthy, safe and viable solutions for their control, like those that represent natural compounds such as phenolics with antifungal capacity, and that we can extract from byproducts of the agri-food industry. In this research, the effectiveness of different phenolic compounds, ferulic, gallic and tannic acid, was

evaluated as possible antifungal agents for the control of stone fruit diseases caused by *Monillinia fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Penicillium expansum* and *Colletotrichum gloesporoides*. For this, in vitro and in vivo studies were carried out on characteristic fungi of stone fruits. The in vitro tests revealed good in vitro antifungal activity, notable for ferulic and tannic acids at very low concentrations equivalent to 0.1 mg L⁻¹. For in vivo trials with inoculated nectarines, the phenolic compounds incorporated into gum arabic formulations as coatings were not sufficiently effective to control brown and gray rots. Future works will have to further investigate their application, given a great potential of this type of compounds.

Key words: Antifungal, phenols, in vivo, application, nectarines, stone fruit, ferulic, gallic and tannic acids

TÍTOL: AVALUACIÓ DE L'EFECTE ANTIFÚNGIC DE COMPOSTOS FENÒLICS PER A LA SEUCA APLICACIÓ A PRÈSSEC I NECTARINA

Autors: Rodrigo Rojas Carmona¹; Maria Teresa Chafer¹; M. Bernardita Pérez-Gago², Lluís Palou².

Resum:

Les podridures fúngiques causen més del 40% de les pèrdues postcollita en fruites, i resulta clau trobar solucions sanes, segures i viables per al seu control com les que representen compostos naturals com els fenòlics amb capacitat antifúngica, i que podem extraure de subproductes de la indústria agroalimentària. En aquesta investigació, es va avaluar l'efectivitat de diferents compostos fenòlics, àcid ferúlic, gàlic i tànic, com a possibles agents antifúngics per al control de les malalties en fruita de pinyol causades per *Monillinia fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Penicillium expansum* i *Colletotrichum gloesporoides*. Amb aquest finalitat, es van dur a terme estudis in vitro i in vivo en fongs característics de fruita de pinyol. Els assajos in vitro van revelar una bona activitat antifúngica in vitro, destacable per als àcids ferúlics i tànic a concentracions molt baixes equivalents a 0,1 mg L⁻¹. Als assajos in vivo en nectarines inoculades, els compostos fenòlics incorporats a formulacions de goma aràbiga com a recobriment, no van ser suficientment efectius per al control de podridures marró i gris. A futurs estudis hi haurà que aprofundir en les seues formes d'aplicació, donat el gran potencial d'aquest tipus de compstos.

Paraules clau: antifúngic, fenols, in vivo, aplicació, nectarines, fruita de pinyol, àcid ferúlic, gàlic i tànic.

1. INTRODUCCIÓN

Las frutas son alimentos imprescindibles para la nutrición debido a su gran aporte en vitaminas, minerales y fibras dietéticas. Sin embargo, estos productos se ven afectados por múltiples mecanismos externos que se traducen en numerosos desafíos para la seguridad alimentaria, sostenibilidad y su viabilidad económica (Sahu y Shrivastava, 2024). Así, las etapas de producción y procesamiento de alimentos vegetales tienen una gran importancia en la postcosecha de estos productos, con pérdidas de estos productos que superan el 20% de la producción a nivel mundial, causadas principalmente por factores fisiológicos y microbiológicos (Blancas-Benitez et al., 2022; Shu et al., 2024). Las frutas son altamente susceptibles a la deshidratación, cambios fisiológicos, lesiones mecánicas y especialmente a enfermedades de postcosecha causadas por hongos patógenos, alterando de forma negativa los parámetros de calidad, reduciendo la capacidad de almacenamiento y causando pérdidas del producto a lo largo de la cadena de suministros (Palou y Pérez-Gago, 2024; Shu et al., 2024). Las pérdidas económicas causadas por agentes microbiológicos causantes de deterioro por podredumbre son elevadas, alcanzando durante la etapa de postcosecha entre un 30% y un 50%, y en algunos casos extremos, la pérdida total de la cosecha. A esto debe sumarse el desperdicio alimentario, que son pérdidas que sufren las frutas tras su cosecha y al entrar en la cadena alimentaria, destacando aquellas que se producen en los hogares de los consumidores (Blancas-Benitez et al., 2022).

Como ya se mencionó, los hongos son los principales causantes de las enfermedades de postcosecha en fruta fresca (Palou y Pérez-Gago, 2024), debido a la exposición de su superficie a un ambiente externo con altos contenidos de inóculo fúngico y a su alto contenido en nutrientes que proporcionan un medio apropiado para su crecimiento (Aaqil et al., 2024). Algunos hongos tienen una amplia gama de huéspedes y atacan productos frescos, mientras que otros son más específicos y solo atacan algunos productos en concreto (Palou y Pérez-Gago, 2024). Además, en las condiciones ambientales ideales se desarrollan tanto en la superficie como en el interior del tejido de las frutas, lo que provoca cambios indeseables caracterizados por degradación celular, aumento de la actividad enzimática y procesos metabólicos que conllevan alteraciones en la apariencia, textura, sabor y valor nutricional (Sahu y Shrivastava, 2024).

Algunas de las frutas más afectada por este tipo de deterioro son las frutas de hueso, que incluyen especies como melocotones, nectarinas, ciruelas, cerezas y albaricoques (Martínez-Blay et al., 2021). La nectarina (*Prunus persica* L.) es una fruta de hueso tropical de la familia *Rosacea* cultivada alrededor del mundo, con una apariencia atractiva y de sabor agradable, además de contener metabolitos secundarios que aumentan su valor nutricional (Aaqil et al., 2024; Zhang et al.,

2019). Según la FAO, a nivel mundial se producen anualmente en regiones templadas en torno a 25 millones de toneladas entre nectarinas y melocotones. Estas son frutas altamente perecederas dada su alta tasa de respiración, rápido proceso de maduración y su carácter climatérico, lo que hace que algunas variedades tengan una vida de postcosecha de 3-4 días a temperatura ambiente (Aaqil et al., 2024; Sowmyashree et al., 2021). Además, su vida útil durante la postcosecha se ve afectada por su alta tasa de deshidratación, que se traduce en pérdida de peso, firmeza y calidad (Aaqil et al., 2024).

Las principales enfermedades postcosecha en nectarinas son las causadas por *Monilinia spp*, especialmente *M. fruticola*, *M. laxa* y *M. fructigena*, causantes de la podredumbre marrón; *Botrytis cinerea* causante de la podredumbre gris; *Rhizopus stolonifer*, causante de podredumbre blanda; *Geotrichum candidum*, causante de la podredumbre ácida; y *Penicillium expansum*, causante de la podredumbre azul (Martínez-Blay et al., 2021). Las especies del género *Monilinia* son parásitos latentes que pueden infectar flores y frutos jóvenes en el campo y muestran síntomas de enfermedad después de la cosecha, además, son patógenos que entran en contacto con el tejido susceptible a infección a través de una herida en la piel de la fruta madura (Karaca et al., 2014).

Las formas más efectivas para el control de enfermedades en nectarinas, en especial para el control de podredumbre marrón y gris, es mediante la aplicación de fungicidas químicos de síntesis en los procesos de pre y postcosecha, así como mejorar las prácticas de saneamiento y manejo de estas frutas incluyendo el almacenamiento a bajas temperaturas (Martínez-Blay et al., 2021). Si bien la aplicación de bajas temperaturas es una práctica común y eficaz para retardar la maduración y crecimientos de hongos, el problema de contaminación y crecimiento de los mismos se agrava tras la manipulación y comercialización de los frutos (Martínez-Blay et al., 2021). El uso extensivo de fungicidas químicos de síntesis en postcosecha ha generado alertas alimentarias y restricciones legales a su uso debido a problemas asociados a residuos químicos en el producto y el medio ambiente, además de la proliferación de cepas de hongos resistente a estos fungicidas (Asgarian et al., 2023).

Es por esto que, en los últimos años, se han probado tecnologías postcosecha de distinta naturaleza para sustituir los fungicidas químicos de síntesis para el control de enfermedades de postcosecha que reducen la calidad de la fruta (Karaca et al., 2014). En este sentido, se ha intensificado el estudio sobre la aplicación de recubrimientos comestibles con capacidad antifúngica, como alternativa económica y sencilla a algunos métodos convencionales (Asgarian et al., 2023; Choi et al., 2016; Shiekh et al., 2022)

En la actualidad, los recubrimientos comestibles se están formulando mayoritariamente con productos naturales, para su aplicación tanto a productos

frescos como procesados, y constituyen una tecnología respetuosa con el medio ambiente (Palou y Pérez-Gago, 2019). Esta tecnología permite mejorar las propiedades de calidad, seguridad y estabilidad, al proporcionar a la fruta una barrera de protección semipermeable al vapor de agua, oxígeno, dióxido de carbono y otros componentes vinculados con el sabor y aroma de la fruta (Valencia-Chamorro et al., 2011). Además, pueden mantener la integridad de la fruta al proporcionar protección mecánica durante el procesamiento, manipulación y almacenamiento, retrasando el deterioro y mejorando la calidad y extendiendo su vida útil (Blancas-Benitez et al., 2022; Palou y Pérez-Gago, 2019). Este tipo de barrera alimentaria debe cumplir ciertos requisitos que deben presentar con el fin de mejorar o preservar la calidad de los alimentos, entre estas están: (i) ser libre de tóxicos y seguros para la salud, (ii) tener propiedades de barrera contra el agua, humedad, oxígeno, dióxido de carbono y etileno, y (iii) aportar apariencia y propiedades mecánicas para mantener la textura (Blancas-Benitez et al., 2022).

Los materiales con los que son formulados estos recubrimientos pueden tener diferentes propiedades que pueden reducir los riesgos de contaminación sin afectar la calidad del producto (Aaqil et al., 2024; Palou y Pérez-Gago, 2019). Generalmente, las matrices de recubrimientos para frutas y vegetales son los polisacáridos, proteínas o lípidos y la combinación entre ellos (Palou y Pérez-Gago, 2019; Valencia-Chamorro et al., 2011). Los polisacáridos comúnmente estudiados son el almidón, celulosa y derivados, pectinas, carragenatos y algunas gomas (Palou y Pérez-Gago, 2019). Estos muestran buenas propiedades mecánicas y barrera a gases (dióxido de carbono y oxígeno), retrasando los procesos de respiración en frutas; sin embargo, forman barreras débiles contra la humedad dado su carácter hidrofílico (Blancas-Benitez et al., 2022). Las proteínas como caseína, soja, gluten o colágenos tienen buenas propiedades de barrera contra lípidos y gases (Aaqil et al., 2024) y al igual que los polisacáridos, son barreras débiles contra la humedad (Palou y Pérez-Gago, 2019). Por otra parte, los recubrimientos formados por lípidos son buenas barreras contra la humedad, aportando brillo y ayudan a reducir los daños por frío en frutas durante su almacenamiento a bajas temperaturas (Aaqil et al., 2024). Se utilizan mayoritariamente distintos tipos de ceras animales y vegetales como cera de abeja; aceites o grasas de cacahuete, coco, oliva; además de ácidos grasos mono-, di-, o triglicéridos como mantequilla de cacao, fracción grasa de leche, entre otros (Palou y Pérez-Gago, 2019).

Todos estos ingredientes poseen ventajas y desventajas cuando son usados como recubrimientos en frutas, por lo que se formulan combinaciones de estos componentes que contengan polisacáridos o proteínas, para proporcionar una barrera estructural y de gas, y lípidos, para proveer una barrera contra la humedad (Palou y Pérez-Gago, 2019). Aunque tradicionalmente los

recubrimientos comestibles se han utilizado para reducir la pérdida de humedad en productos hortofrutícolas, en la actualidad, las nuevas formulaciones buscan una amplia funcionalidad en su aplicación (Aaqil et al., 2024). Para ello, se han llevado a cabo múltiples trabajos de recubrimientos comestibles con el objetivo de conseguir una actividad antifúngica en frutas y vegetales, incorporando ingredientes con carácter antifúngico a los biopolímeros y lípidos, como una alternativa sostenible a los fungicidas químicos de síntesis convencionales (Palou y Pérez-Gago, 2024; Martins et al., 2024). En este sentido, los agentes antifúngicos que pueden utilizarse como ingredientes funcionales en un recubrimiento comestible para controlar las enfermedades de postcosecha causadas por hongos incluyen los aditivos alimentarios de síntesis de bajo riesgo y generalmente reconocido como seguros (GRAS); compuestos naturales antimicrobianos de origen animal o de plantas; químicos de baja toxicidad para usos específicos como nanopartículas a base de metales; y antagonistas microbianos como agentes biológicos de control tales como bacterias, levaduras u hongos (Palou y Pérez-Gago, 2019).

Dentro de los compuestos naturales estudiados para el control de hongos patógenos, y con resultados prometedores en la inhibición de enfermedades de postcosecha en frutas, se encuentran los compuestos fenólicos, en especial los ácidos fenólicos (Shu et al., 2024). Estos compuestos bioactivos son sintetizados en condiciones de estrés como metabolitos secundarios por plantas y acumulados en diferentes partes de éstas, protegiéndolas del estrés biótico (causados por microorganismos patógenos) y abiótico (causados por factores del entorno) (Cabanillas-Bojórquez et al., 2024). Estos compuestos se caracterizan por tener grupos hidroxilo anclados directamente a un carbón aromático, teniendo diversidad de estructuras y propiedades fisicoquímicas con diferente reactividad a múltiples factores como pH, temperatura, oxígeno, luz, etc. (Aguilar-Veloz et al., 2020). Según su estructura, pueden clasificarse en ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoico, siendo los primeros más abundantes en la piel de las frutas, y como ejemplo el ácido ferúlico (Liu et al., 2023; Shu et al., 2024). Muchos de estos ácidos fenólicos y sus derivados han mostrado alta eficacia contra hongos patógenos de postcosecha (Shu et al., 2024), por lo que se han realizado múltiples estudios de extractos de frutas y sus subproductos con alto contenido en compuestos fenólicos como agentes antifúngicos (Alvarez et al., 2023; Fadda et al., 2021; Kharchoufi et al., 2018; Villalobos et al., 2016). Aunque el modo de acción de los ácidos fenólicos sobre los hongos no está claro, se sabe que ejercen un efecto sobre las células o mecanismo de defensa de los frutos. Algunos estudios sugieren un mecanismo que actúa sobre la membrana, inhibiendo el crecimiento; o modificando la estructura celular y la fluidez de la membrana, causando la pérdida de material citoplasmático (Fadda et al., 2021; Liu et al., 2023).

El objetivo de estudio ha sido evaluar la actividad antifúngica in vitro e in vivo de compuestos fenólicos frente a hongos patógenos de postcosecha característicos de frutas de hueso. Para ello, se evaluó en primer lugar la actividad de los compuestos fenólicos ácido ferúlico, tánico y gálico, a diferentes concentraciones desde 0,1 hasta 2,4 mg L⁻¹, frente a los principales patógenos de frutas de hueso en condiciones in vitro (*A. alternata*, *B. cinerea*, *C. gloesporoides*, *M. fructicola* y *P. expansum*). Posteriormente, se estudió la actividad curativa de los compuestos fenólicos más efectivos incorporados a unas formulaciones de recubrimiento comestible en el control de la podredumbre marrón y gris en nectarinas inoculadas con *M. fructicola* y *B. cinerea*, que son su principal causa de podredumbre.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Colección y preparación de inóculos

Tanto para los ensayos in vitro como in vivo, se utilizaron cepas de *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Monilinia fructicola* y *Penicillium expansum* aisladas de frutos infectados y mantenidas en la colección de cultivos de hongos patógenos del Centro de Tecnología Postcosecha del IVIA. Previo a los ensayos, los hongos se incubaron en agar patata dextrosa (PDA) (Scharalab S.L., Barcelona, España) en placas Petri a 25 °C. Las esporas fueron obtenidas después de 10 días de incubación según la metodología descrita por Soto-Muñoz et al. (2023). Las esporas de estos cultivos fueron resuspendidas en agua destilada estéril. Las suspensiones de esporas fueron filtradas con gasa estéril y ajustadas una concentración de 1 x 10⁴ esporas mL⁻¹ para los ensayos in vitro. En las experiencias in vivo las suspensiones de esporas se ajustaron a 1 x 10⁴ esporas mL⁻¹ para *B. cinerea* y 1 x 10³ esporas mL⁻¹ para *M. fructicola*. Los ajustes se realizaron mediante la estimación previa de la concentración inicial con cámara de recuento (Thoma o Rosenthal) como se observa en la Figura 1.

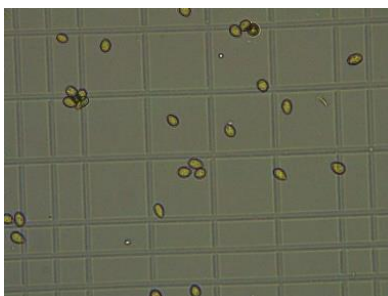


Figura 1. Esporas de *B. cinerea* en cámara de recuento Thoma de recuento.

2.2. Actividad antifúngica in vitro de compuestos fenólicos

En estas experiencias, los compuestos fenólicos seleccionados para evaluar su actividad antifúngica fueron ácido gálico (Gal) y ácido ferúlico (Fer) disueltos

en etanol y dos soluciones de ácido tánico (Tan), una disuelta en agua y otra en etanol (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Se prepararon diferentes concentraciones de estos compuestos fenólicos (2,4; 1,8; 1,2; 0,6 y 0,1 mg L⁻¹).

La concentración mínima inhibitoria de los distintos compuestos fenólicos para inhibir el crecimiento micelial de los hongos se determinó mediante el método descrito por Yang et al. (2023), utilizando placas de 96 pocillos estériles con algunas modificaciones en su metodología. Cada placa permitió la distribución espacial del compuesto fenólico con distintas concentraciones en cada columna. Las placas contaron con una sección del 'tratamiento' con el inóculo (compuesto fenólico con inóculo) y una sección del 'blanco' (compuesto fenólico sin inóculo) con 8 réplicas para la sección tratamiento y la sección blanco respectivamente por cada concentración de compuesto. Además, se preparó otra placa 'control' (sin compuesto fenólico con inóculo). Cada pocillo contuvo 150 µL de PDB (caldo dextrosa patata), 30 µL del respectivo inóculo (en el caso del blanco se utilizó 30 µL de agua) y 20 µL del respectivo compuesto a diferentes concentraciones. Tras la inoculación, las placas multipocillo fueron incubadas a 25 °C por periodos de 72 h y 96 h antes de cada medición. Para cada compuesto se midió la absorbancia a 600 nm en los periodos de 72 y 96 horas usando un lector multiplica (Thermo Scientific Multiskan Spectrum, Vantaa, Finland). Los valores de densidad óptica obtenidos se expresaron como porcentaje de reducción (ecuación 1) causado por efecto del tratamiento, es decir % de inhibición del crecimiento micelial de patógeno respecto al control sin compuesto fenólico.

$$\text{Reducción de DO tratamientos (\%)} = 100 * \frac{DO_{\text{control}} - DO_{\text{tratamiento}}}{DO_{\text{control}}} \quad (1)$$

Donde: DO_{control} es la densidad óptica del 'control' menos el promedio de las densidades ópticas del 'blanco'; DO_{tratamiento} es la densidad óptica del 'tratamiento' menos el promedio de las densidades ópticas del 'blanco'. Estos valores se transformaron en arcoseno para mejorar la homogeneidad de las varianzas en el análisis de ANOVA.

2.3. Formulación de recubrimientos comestibles antifúngicos

Para estos ensayos, se seleccionó un recubrimiento a base de goma arábica (Nexira, Barcelona, España) previamente optimizado y aplicado por Asgarian et al. (2023) con aceites esenciales en ciruelas. Esta formulación consta de goma arábica como biopolímero y cera de abeja (Guinama, Valencia, España) como fase lipídica. Además, glicerol y sucroester (Panreac Química SA., Barcelona, España) como plastificante y emulsificante respectivamente. A esta formulación se le incorporaron los compuestos fenólicos evaluados en los ensayos in vitro a la concentración seleccionada de 1,2 mg L⁻¹.

Para preparar las emulsiones, la goma arábica (3% w/w) fue dispersada en agua caliente a 40 °C. Luego, 0,25% de sucroester fue añadido como emulsificante, manteniéndolo en agitación hasta la completa solubilización. Finalmente, fueron añadidos 0,5% de cera de abeja y 1% de glicerol. La mezcla fue calentada a 90 °C para fundir el lípido y se homogeneizó con un homogeneizador de cizalla (Ultra-Turrax model T25, IKEA-Werke, Steufen, Alemania) por 1 minuto a 17.000 rpm seguido de 22.000 rpm por 3 min. La emulsión preparada fue puesta en un baño de hielo hasta que su temperatura alcanzó los 25 °C.

Por último, se es añadido cada compuesto fenólico (1,2% w/w), previamente disueltos en etanol (et) o agua (w) y la emulsión se homogeneizó por 2 min a 16.000 rpm a temperatura ambiente (25 °C), obteniendo cuatro formulaciones diferentes.

Se evaluó la estabilidad de las emulsiones preparadas (con y sin compuestos fenólicos) a temperatura ambiente controlada, introduciéndolas en tubos volumétricos de 100 mL y visualizando la existencia de separación de fases a 24 h. Además, estas emulsiones fueron caracterizadas midiendo viscosidad (Visco Star Plus R, Fungilab, S.A., Barcelona, España) y el pH.

2.4. Evaluación de actividad curativa in vivo

2.4.1. Fruta

Se emplearon nectarinas “Carmina” procedentes de la Cooperativa Agrícola Ntra. Sra. Del Oreto Coop. V (L’Alcidia, Valencia), directas de campo y sin tratamiento postcosecha. Estas fueron seleccionadas para asegurar frutos sanos y sin heridas, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0,5%, enjugando con agua de red y secándolas a temperatura ambiente.

2.4.2. Incidencia, severidad y esporulación

Para los ensayos curativos in vivo, dos lotes de frutas fueron inoculadas en la zona ecuatorial con *M. fructicola* (MF; 10^3 esporas mL⁻¹) y *B. cinerea* (BC; 10^4 esporas mL⁻¹), utilizando un punzón de acero inoxidable previamente sumergido en la suspensión de esporas. Las frutas inoculadas se incubaron a 20 °C por 24h.

Para cada hongo, se distribuyeron 120 frutas aleatoriamente en alvéolos de plástico sobre cajas de plástico, que correspondían a 4 réplicas de 5 frutos cada una por tratamiento. Se llevaron a cabo 6 tratamientos: uno fue control recubierto con agua y a los otros 5 se aplicaron los recubrimientos (1 recubrimiento sin compuesto fenólico y 4 con compuestos fenólicos).

Tras 24 h de incubación a 20° C, las frutas fueron recubiertas manualmente añadiendo 0,4 mL de las emulsiones que se esparcieron uniformemente con guantes de latex para simular la aplicación de rodillos en las líneas de confección

de fruta de las centrales de fruta. Después del secado a temperatura ambiente, las cajas fueron protegidas con bolsas de plástico para evitar contaminación cruzada por factores ambientales. Además, en el interior de estas se añadieron toallas de papel mojadas para asegurar una alta humedad relativa en el interior.

Las frutas tratadas fueron incubadas a 20 °C y 70-80% de HR en cámaras de conservación de la planta piloto de IVIA. La incidencia de la enfermedad (% de fruta infectada), severidad (diámetro de la lesión, mm) y la esporulación (% de frutas con presencia de esporas) del hongo patógeno se evaluaron después de 4 y 7 días después de la inoculación.

2.5. Análisis estadístico

Los datos fueron a analizados por análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de la mínima diferencia significativa (MSD) con paquete estadístico Statgraphics Cenurion XVII (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA). La concentración mínima inhibitoria, incidencia de enfermedad y esporulación fueron calculadas en porcentaje. Para el caso de la concentración mínima inhibitoria, los resultados se presentan como porcentaje de reducción respecto a un control. Las diferencias significativas entre medias se presentan con un nivel de confianza del 95% ($P < 0,05$).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Actividad antifúngica in vitro de compuestos fenólicos

La Tabla 1 muestra los resultados del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial en la placa multipocillo por efecto de los compuestos fenólicos para los cinco hongos patógenos, que son los principales causantes de deterioro en la fruta de hueso. Esta actividad inhibitoria se ha determinado a diferentes concentraciones de estos compuestos.

Los resultados de la Tabla 1 muestran que todos los compuestos fenólicos inhiben el crecimiento micelial de los hongos y que ésta depende del tipo de hongo, tiempo de incubación, además del compuesto y su concentración. En la Tabla podemos observar que en general, los tratamientos Fer/et y Tan/et fueron los mejores para la mayoría de los hongos evaluados, alcanzando en muchos de los hongos actividades inhibitorias cercanas al 98% a las concentraciones más bajas, incluso transcurridas las 96 h de incubación. Para *B. cinerea*, *M. fructicola* y *P. expansum* se alcanzó una inhibición superior al 90% con Gal/et y Fer/et a las concentraciones de 0,1 mg L⁻¹ y sobre 95% con 0,6 mg L⁻¹. El tratamiento con Tan/et también resultó efectivo para *B. cinerea*, *M. fructicola* y *P. expansum* a las mismas concentraciones, con inhibiciones del 85%, 90% y 99%, respectivamente.

Tabla 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de hongos patógenos a 72 h y 96 h de incubación en placas multipocillo.

		72 h					96 h				
Compuesto fenólico (mg L ⁻¹)		0,1	0,6	1,2	1,8	2,4	0,1	0,6	1,2	1,8	2,4
<i>Alternaria alternata</i>	Tan/w	60,0±3,0 ^{Ba}	57,0±4,4 ^{Ca}	38,3±5,0 ^{Cc*}	47,0±5,0 ^{Bb*}	59,1±6,0 ^{Ba*}	73,0±4,0 ^{Bb}	77,5±2,0 ^{Ca}	69,0±1,4 ^{Cc*}	68,0±1,5 ^{Cc*}	67,0±4,0 ^{Bc*}
	Tan/et	70,0±6,0 ^{Ac}	82,0±7,0 ^{Bc}	94,1±6,0 ^{Bb}	99,3±1,5 ^{Aa}	100,0±1,0 ^{Aa}	83,3±5,0 ^{Ac}	84,4±2,0 ^{Bc}	87,2±6,0 ^{Bc}	95,0±5,0 ^{Bb}	100,0±1,0 ^{Aa}
	Gal/et	56,3±4,0 ^{Ba}	48,0±3,0 ^{Cd}	27,0±3,0 ^{Dd*}	9,0±3,0 ^{Ce*}	33,2±5,0 ^{Cc*}	53,0±5,0 ^{Cb}	57,1±0,7 ^{Da}	47,2±3,0 ^{Dc*}	46,0±3,1 ^{Dc*}	48,0±2,0 ^{Cc*}
	Fer/et	70,4±3,8 ^{Ab}	98,3±5,0 ^{Aa}	100,0±0,0 ^{Aa}	98,3±5,0 ^{Aa}	100,0±0,0 ^{Aa}	78,5±6,0 ^{ABb}	99,0±4,1 ^{Aa}	100,0±0,0 ^{Aa}	98,0±6,0 ^{Aa}	100,0±0,0 ^{Aa}
<i>Botrytis cinárea</i>	Tan/w	12,2±2,0 ^{Cd}	18,2±0,1 ^{Ccd}	24,0±3,3 ^{Bc}	41,0±3,3 ^{Cb}	69,0±6,4 ^{Ca}	54,0±6,0 ^{Bb}	32,3±1,2 ^{Cd}	32,1±4,0 ^{Cd}	45,0±4,0 ^{Cc}	68,1±4,2 ^{Ba}
	Tan/et	85,1±6,0 ^{Bc}	68,0±6,7 ^{Bc}	97,5±4,0 ^{Abc}	99,1±3,0 ^{Aa}	100,0±0,0 ^{Aab}	88,2±4,0 ^{Ad}	94,0±3,1 ^{Ac}	97,2±3,1 ^{Bb}	100,0±0,0 ^{Aab}	100,0±0,0 ^{Aa}
	Gal/et	99,2±1,0 ^{Aa}	99,0±1,2 ^{Aab}	96,1±5,0 ^{Accd}	97,0±3,2 ^{Bbc}	93,5±2,0 ^{Be}	99,3±0,4 ^{Aa}	99,3±0,4 ^{Ba}	99,0±1,0 ^{Bab}	99,0±1,0 ^{Bab}	98,3±1,0 ^{Ab}
	Fer/et	100,0±0,0 ^{Aa}	94,0±6,0 ^{Ab}	95,1±5,0 ^{Ab}	100,0±0,0 ^{Aa}	98,3±5,0 ^{Aa}	99,2±0,3 ^{Ab}	99,4±0,3 ^{Bb}	100,0±0,0 ^{Aa}	100,0±0,0 ^{Aa}	100,0±0,0 ^{Aa}
<i>Colletotrichum gloeosporoides</i>	Tan/w	55,1±6,0 ^{Aa}	49,0±4,4 ^{Ca}	57,0±5,4 ^{Ca*}	34,5±4,0 ^{Bc*}	43,0±3,0 ^{Cb*}	14,0±2,0 ^{Dc}	13,2±3,4 ^{Dc}	33,0±3,3 ^{Bd*}	15,1±4,0 ^{Bc*}	43,0±5,0 ^{Ca*}
	Tan/et	53,4±5,5 ^{Ad}	67,4±6,4 ^{Bc}	89,0±5,4 ^{bB}	99,3±1,0 ^{Aa}	99,5±1,0 ^{Aa}	33,0±2,0 ^{Ac}	51,4±5,2 ^{Bb}	71,0±6,5 ^{Aa}	98,2±4,3 ^{Aa}	100,0±2,0 ^{Ba}
	Gal/et	37,3±4,0 ^{Bd}	44,0±5,3 ^{Cc}	59,5±6,0 ^{Ca*}	30,3±4,0 ^{Bd*}	53,3±2,0 ^{Bb*}	17,2±3,0 ^{Cabc}	22,0±7,0 ^{Cab}	17,1±4,0 ^{Cbc*}	15,1±3,0 ^{Bc*}	25,0±2,0 ^{Da*}
	Fer/et	15,4±2,0 ^{Cb}	100,0±1,0 ^{Aa}	99,1±2,5 ^{Aa}	99,1±2,5 ^{Aa}	100,0±0,1 ^{Aa}	25,0±3,5 ^{Bb}	100,0±1,0 ^{Aa}	99,2±2,0 ^{Aa}	99,4±1,0 ^{Aa}	100,0±0,1 ^{Aa}
<i>Monilia fructicola</i>	Tan/w	38,3±4,0 ^{Cc}	99,5±1,0 ^{Aa}	100,0±0,0 ^{Aa}	96,1±2,0 ^{Bb}	96,0±4,4 ^{Bb}	20,3±1,4 ^{Cc}	99,4±1,0 ^{Aa}	100,0±0,0 ^{Aa}	96,4±2,0 ^{Bb}	96,0±4,1 ^{Bb}
	Tan/et	90,4±4,3 ^{Bb}	97,1±1,3 ^{Aa}	95,0±3,3 ^{Ba}	97,0±3,0 ^{Ba}	97,4±3,0 ^{Ba}	57,0±6,2 ^{Bb}	97,0±4,0 ^{Aa}	97,5±3,2 ^{Ba}	96,0±3,2 ^{Ba}	95,3±4,5 ^{Ba}
	Gal/et	93,0±3,0 ^{Bb}	95,8±2,5 ^{Bb}	96,1±6,0 ^{Bab}	98,0±1,2 ^{Ba}	99,0±1,1 ^{Aba}	100,0±0,0 ^{Aa}	99,2±2,0 ^{Aa}	97,2±6,2 ^{Ba}	94,1±5,0 ^{Ba}	97,0±3,2 ^{Ba}
	Fer/et	99,3±1,0 ^{Abc}	98,1±2,4 ^{Ac}	100,0±0,1 ^{Aab}	100,0±0,0 ^{Aa}	100,0±0,0 ^{Aa}	100,0±0,0 ^{Ab}	100,0±1,8 ^{Ab}	100,0±0,0 ^{Aa}	100,0±0,0 ^{Aa}	100,0±0,0 ^{Aa}
<i>Penicillium expansum</i>	Tan/w	71,0±5,0 ^{Cd}	80,3±4,0 ^{Bc}	88,0±6,0 ^{Bd}	94,0±5,3 ^{Ba}	95,3±2,3 ^{Ca}	81,2±4,1 ^{Bc}	86,1±2,0 ^{Cab}	82,4±6,0 ^{Bbc}	84,5±6,2 ^{Babc}	87,0±5,4 ^{Ba}
	Tan/et	99,5±1,0 ^{Aa}	100,0±0,0 ^{Aa}	100,0±0,0 ^{Aa}	99,0±3,0 ^{Aa}	100,0±0,5 ^{Aa}	98,0±5,2 ^{Ab}	100,0±0,1 ^{Aab}	100,0±0,0 ^{Aa}	100,0±0,5 ^{Aab}	100,0±0,3 ^{Aab}
	Gal/et	100,0±0,0 ^{Aba}	100,0±0,7 ^{Aa}	100,0±1,2 ^{Aab}	99,0±1,6 ^{Aab}	98,1±2,4 ^{Bb}	100,0±0,3 ^{Aabc}	99,4±1,0 ^{Bc}	100,0±0,2 ^{Abc}	100,0±0,1 ^{Aab}	100,0±0,1 ^{Ab}
	Fer/et	99,4±0,5 ^{Bb}	99,1±1,0 ^{Ab}	100,0±1,0 ^{Aab}	100,0±0,0 ^{Aa}	100,0±0,0 ^{Aa}	99,3±1,0 ^{Ab}	100,0±0,4 ^{Aab}	100,0±0,0 ^{Aa}	100,0±0,2 ^{Aa}	100,0±0,0 ^{Aa}

Se muestran las medias ± desviación estándar.

Tan = ácido tánico; Gal = ácido gálico; Fer = ácido ferúlico; w = agua; et = etanol

Para cada hongo, medias en columnas con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre compuestos fenólicos (test MDS, $p < 0,05$) Para cada compuesto fenólico, medias en filas con diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre concentraciones para cada tiempo de incubación test MDS, $p < 0,05$). (*) Muestras con cambios de color ocurridos durante la evaluación in vitro, lo que pudo afectar la medición del crecimiento micelial en las placas multipocillo.

Por otro lado, los menores valores de inhibición se obtienen contra *B. cinerea* en el tratamiento con Tan/w y *C. gloesporpides* para los compuestos Gal/et y Tan/w, que no llegaron al 70% de inhibición a las concentraciones más altas. En el caso de *A. alternata* y *C. gloesporoides*, el compuesto fenólico más efectivo fue Fer/et que inhibió el crecimiento micelial de estos hongos más del 98% a una concentración de 0.6 mg L^{-1} a las 72 horas de incubación. En estos dos hongos hay que destacar que se observó una coloración marrón con los compuestos Gal/et y Tan/w a las concentraciones mayores, que pueden afectar a la interpretación de los resultados obtenidos de inhibición del crecimiento micelial, por haberse utilizado una metodología basada en mediciones espectrofotométricas. Por ello, las muestras que presentaron cambio de color se observaron mediante microscopía, comparándolas con las muestras de baja concentración de compuesto fenólico, para ver si se observaba crecimiento micelial.

En la Figura 2 se muestra un ejemplo de las muestras de los ensayos in vitro con *A. alternata* en presencia de Gal/et, tanto para los cambios de coloración de las muestras en las placas multipocillo como en las observaciones en microscopía óptica. En las observaciones de microscopía, se vieron estructuras miceliales de los hongos en la muestra con baja concentración de ácidos fenólicos ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$), mientras que a las concentraciones de $0,6$ y $1,8 \text{ mg L}^{-1}$ no se vieron micelios completos. Por tanto, podemos concluir que existe una actividad inhibitoria del crecimiento micelial de los hongos a pesar del cambio de color y de los valores de inhibición bajos que se determinaron por espectrofotometría. Estos cambios de color podrían ser debidos a una oxidación enzimática, tal y como se ha descrito en estudios previos (Lekshmi et al., 2021) con microorganismos que segregan tanasa, una enzima sintetizada por diversos organismos tales como levaduras, bacterias y hongos con actividad oxidativa en presencia de compuestos tánicos. Por tanto, cuando hay cambios de coloración habría que utilizar otros métodos, distintos a los espectrofotométricos, para verificar la actividad antifúngica de los compuestos.

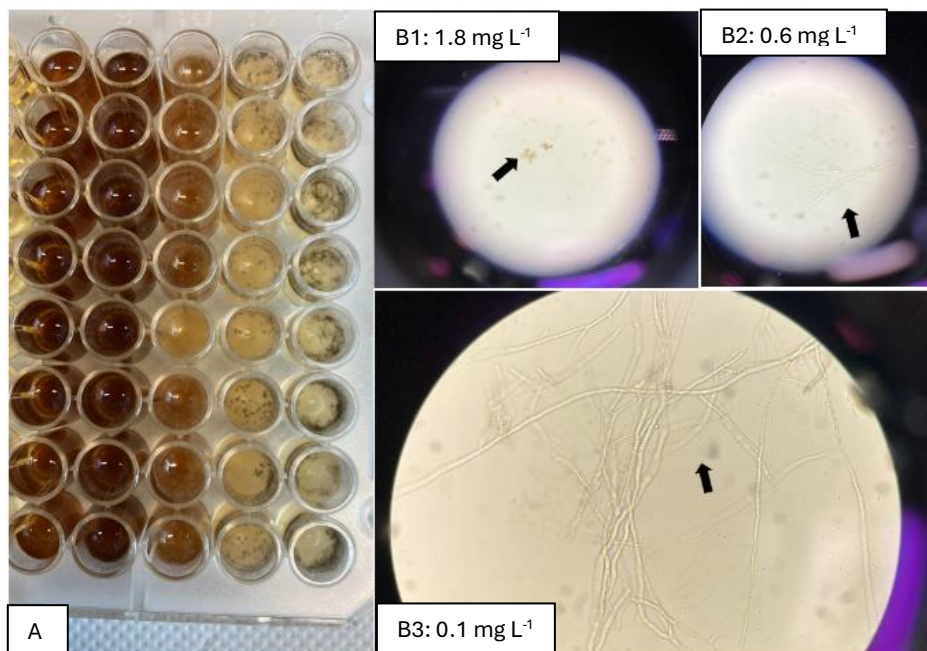


Figura 2. Aspecto de placas multipocillos en los ensayos in vitro de *A. alternata* con Gal/et (A). Estructura micelial de *A. alternata* observada mediante microscopía óptica en muestras tratadas con Gal/et a 1.8 mg L^{-1} (B1), $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ (B2) y $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (B3).

3.2. Caracterización de las formulaciones formadoras de recubrimientos utilizadas en los ensayos in vivo

Para la formulación de estos, se utilizó una formulación de goma arábica previamente optimizada en el grupo postcosecha del IVIA, tal y como se ha descrito en materiales y métodos, a la que se incorporó una concentración de compuestos fenólicos de $1,2 \text{ mg L}^{-1}$. Esta concentración se seleccionó ya que, a pesar de que a concentraciones más bajas se ha observado una capacidad inhibitoria in vitro, estudios previos con antifúngicos naturales han demostrado que son necesarias concentraciones mayores en aplicaciones in vivo (Shu et al., 2024).

En la Tabla 2 se muestran los valores medios obtenidos de pH y viscosidad para las formulaciones de goma arábica, con y sin compuestos fenólicos. Estas formulaciones fueron estables tras 24 horas a los pH y viscosidades determinados, que oscilaron entre 3,1 y 4,7; 2,5 y 3,5 mPa.s respectivamente.

Tabla 2. Caracterización de las formulaciones formadoras de recubrimiento de los ensayos in vivo, obtenidas a base de goma arábica (GA), con y sin incorporar compuestos fenólicos.

Formulación	pH	Viscosidad (mPa.s)
GA	4,73 ± 0,04	2,95 ± 0,07
GA+Tan/w	3,98 ± 0,02	2,95 ± 0,03
GA+Tan/et	4,10 ± 0,07	3,50 ± 0,08
GA+Gal/w	3,12 ± 0,03	2,534 ± 0,102
GA+Fer/et	3,95 ± 0,07	2,897 ± 0,006

3.3. Actividad curativa in vivo de los recubrimientos antifúngicos en nectarinas

Las Figuras 3 y 4 muestran los resultados de incidencia, severidad y esporulación de la podredumbre marrón y gris en muestras recubiertas y sin recubrir (control) en nectarinas inoculadas. Los resultados muestran que en general ninguno de los recubrimientos formulados con compuestos fenólicos controló la incidencia de enfermedades.

En los ensayos en nectarinas inoculadas con *B. cinerea* (Figura 3.A), los tratamientos con los recubrimientos formulados con Tan/et y Fer/et mostraron una menor incidencia a los 4 días de incubación, pero ésta no fue diferente significativamente de las muestras control sin recubrir. De la misma forma ocurre con la severidad (Figura 3.B), donde los resultados de las nectarinas tratadas con recubrimientos con compuestos fenólicos fueron similares a las muestras control. Sin embargo, a nivel de esporulación podemos ver algunas diferencias con valores menores en las muestras recubiertas (Figura 3.C).

Del mismo modo, en las muestras inoculadas con *M. fructicola* se observó un comportamiento similar al descrito con *B. cinerea*, no observándose resultados significativamente diferentes en la incidencia y la severidad de la podredumbre (Figura 4.A y B). Para este patógeno, con el recubrimiento con Tan/et se observó una menor esporulación respecto a los demás compuestos tras 4 días de aplicación de los recubrimientos (Figura 4.C).

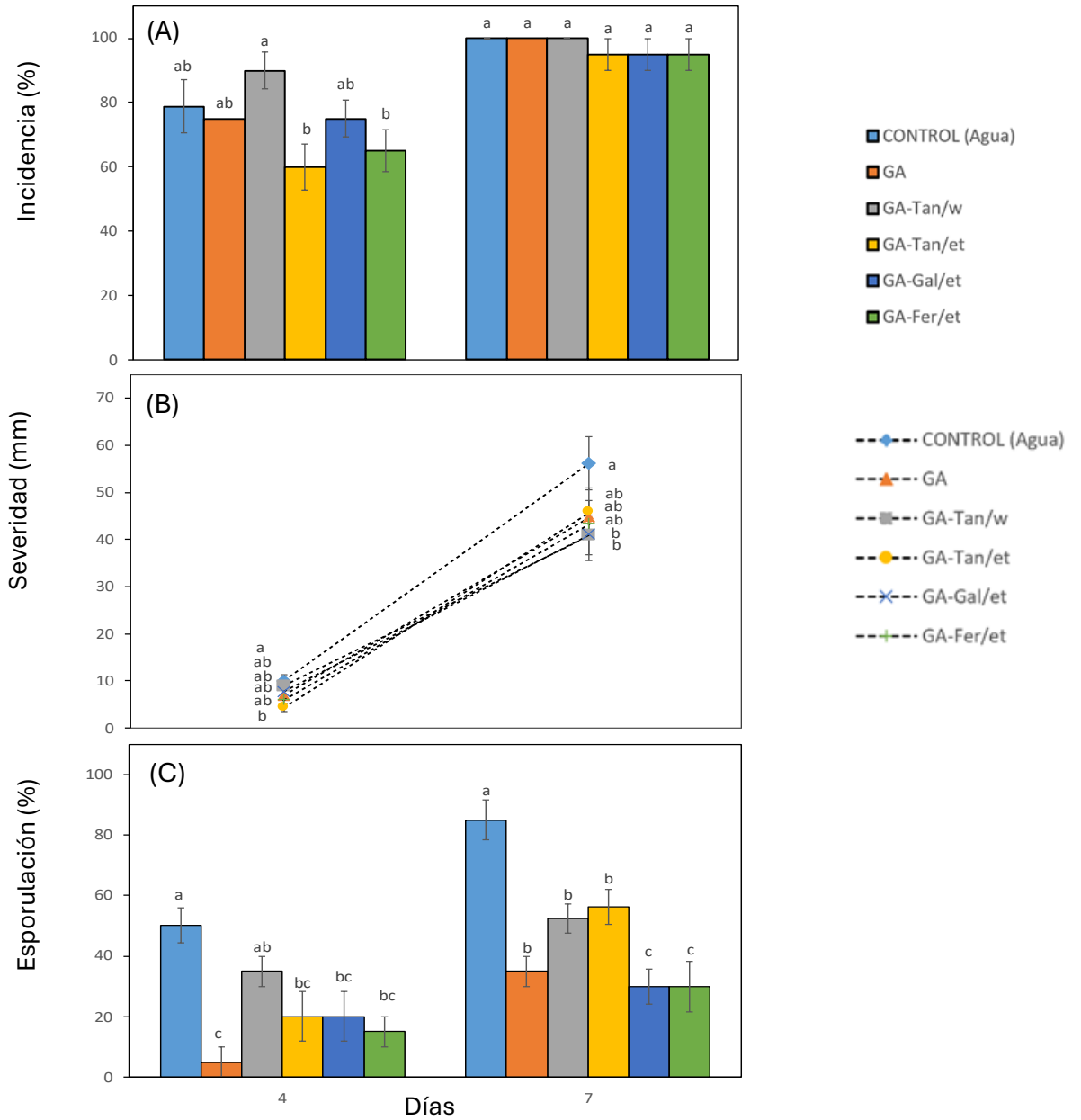


Figura 3. Incidencia (A), severidad (B) y esporulación (C) de la podredumbre gris en nectarinas 'Carmina' inoculadas artificialmente con *Botrytis cinerea*, sin recubrir (control) o recubiertas con recubrimientos comestibles de goma arábiga (GA) que contienen ácido tánico (Tan), ácido gálico (Gal) o ácido ferúlico (Fer) disueltos en agua (w) o etanol (et) tras 4 y 7 días de incubación a 20 °C. Para cada tiempo de almacenamiento, las medias con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según la prueba de la MDS aplicada tras el ANOVA. Las barras muestran el error estándar.

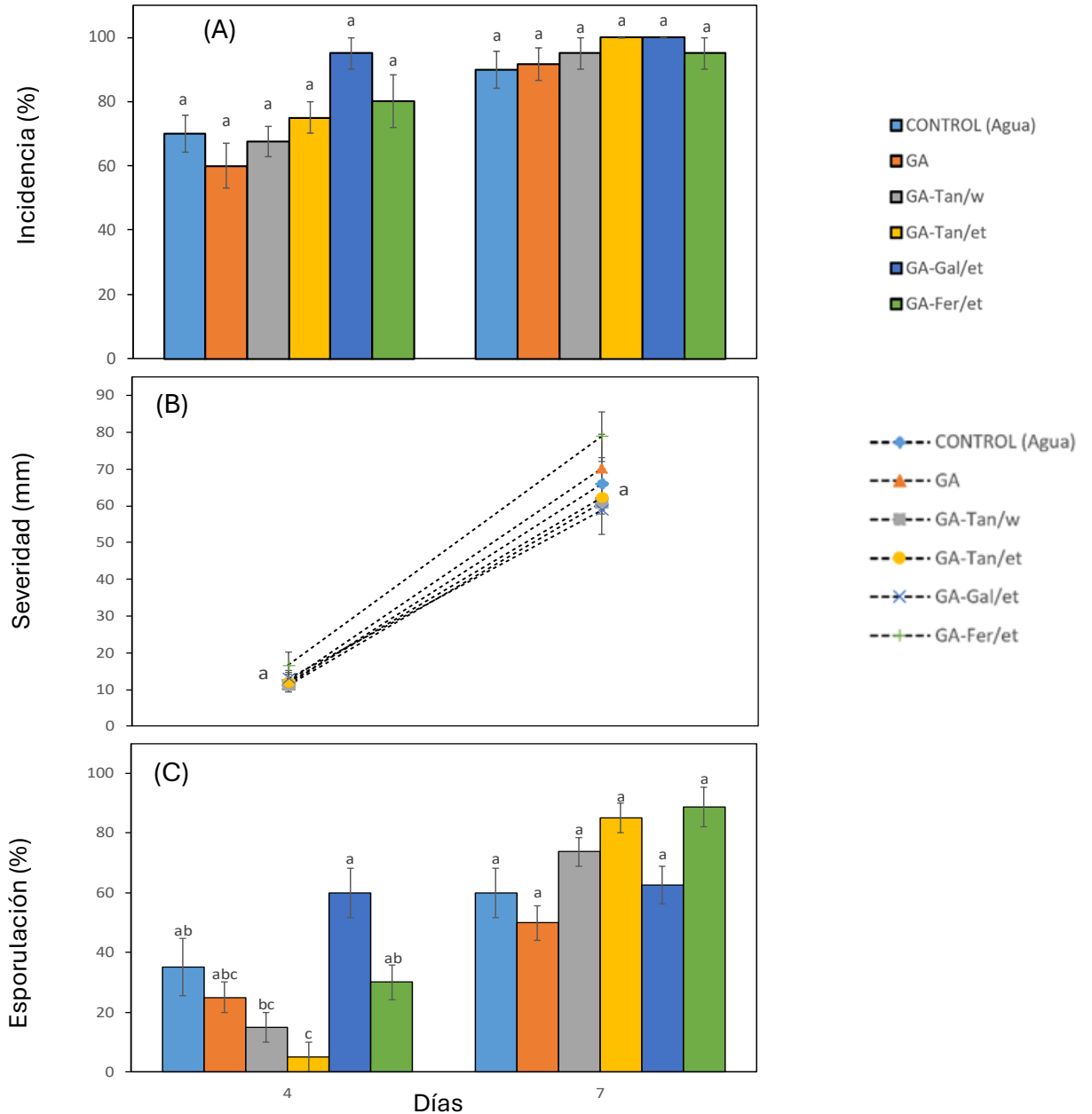


Figura 3. Incidencia (A), severidad (B) y esporulación (C) de la podredumbre marrón en nectarinas 'Carmina' inoculadas artificialmente con *Monilinia fructicola*, sin recubrir (control) o recubiertas con recubrimientos comestibles de goma arábiga (GA) que contienen ácido tánico (Tan), ácido gálico (Gal) o ácido ferúlico (Fer) disueltos en agua (w) o etanol (et) tras 4 y 7 días de incubación a 20 °C. Para cada tiempo de almacenamiento, las medias con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según la prueba de la MDS aplicada tras el ANOVA. Las barras muestran el error estándar.

En resumen, los resultados de este estudio muestran la utilidad de una técnica ágil y sencilla para evaluar la actividad antifúngica in vitro de diferentes compuestos fenólicos en estado puro, además de innovar en cuanto a sus posibles formas de aplicación al incorporarlos a recubrimientos comestibles para el control de enfermedades de postcosecha en frutas de hueso (Asgarian et al., 2023; Palou y Pérez-Gago, 2019). Estudios con formulaciones con aceites esenciales para el control de *A. alternata* (Sapper et al., 2019) mostraron un comportamiento similar, ya que estos tuvieron una actividad inhibitoria in vitro, pero aplicados incorporados a recubrimientos comestibles en manzanas y caqui, no ejercieron el mismo nivel de actividad antifúngica in vivo. El trabajo de Asgarian et al. (2023) con una formulación de goma arábica y aceites esenciales muestra un comportamiento similar in vivo, no reduciendo significativamente la incidencia de la enfermedad en ciruelas.

Los resultados in vitro demostraron que todos los compuestos fenólicos evaluados tienen una capacidad inhibitoria del crecimiento micelial, sin embargo, esto depende del tipo de hongo, compuesto, concentración y tiempo de interacción. Así, es posible encontrar inhibiciones del crecimiento micelial superiores al 95% en las concentraciones más bajas con Gal/et y Fer/et contra *B. cinerea*, *M. fructicola* y *P. expansum*. Resultados similares fueron obtenidos por Hernández et al. (2021) con ácido ferúlico y otros compuestos fenólicos en estado puro a diferentes concentraciones frente a hongos patógenos de postcosecha, donde se alcanzaron inhibiciones del 85% para *B. cinerea* y *M. fructicola* para concentraciones menores a 291 mg L⁻¹ (1,5 mM). Además, Hernández et al. (2021) comprobaron que estos dos hongos son más sensibles a los ácidos fenólicos que *A. alternata*, comportamiento similar a los resultados obtenidos en nuestro trabajo. Otros estudios in vitro con extractos de fenoles purificados muestran actividades inhibitorias de hasta el 100% a concentraciones mayores a 1,25 g L⁻¹ para algunas bacterias como *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*; sobre el 50% a 1,5 g L⁻¹ en levaduras como *Cryptococcus spp.* y *Rhodotorula spp.*; y no superior al 30% a concentraciones similares para hongos como *B. cinerea*, *Penicillium glabrum* y *Cladosporium uredinicola* (Villalobos et al., 2016).

Por otro lado, los resultados de las aplicaciones in vivo no mostraron suficiente efectividad como tratamiento curativo. Los compuestos con mayor inhibición en los ensayos in vitro, como Fer/et, Gal/et y Tan/et, no redujeron la incidencia y la severidad de la enfermedad en los hongos evaluados in vivo, a pesar de usar concentraciones mayores a las más efectivas in vitro. Resultados similares se observan en recubrimientos formulados a base de goma arábica y aceites esenciales aplicados en ciruelas, donde no se ve reducida la incidencia ni severidad en la fruta

almacenadas a temperaturas de refrigeración y ambiente para el control de *M. fructicola* (Asgarian et al., 2023).

Por el contrario, con otro tipo de frutas se han descrito resultados diferentes de efectividad. Así, estudios previos con diferentes compuestos antifúngicos como sales GRAS y aceites esenciales aplicados en recubrimientos han demostrado tener actividad antifúngica in vivo e in vitro en estudios en naranjas y mandarinas contra *Geotrichum citri-aurantii* (Soto-Muñoz et al., 2020) y *C. gloesporoides* (Martínez-Blay et al., 2020). De la misma forma, se ha demostrado actividad antifúngica en ingredientes ricos en polifenoles, como aceites esenciales y extractos de granada, contra *P. digitatum* aplicados en recubrimientos en naranjas (Kharchoufi et al., 2018) y extractos de hierba de limón y aceites esenciales como geraniol para la inhibición de *M. fructicola* en recubrimientos base de pectina en naranjas artificialmente inoculadas (Quintanilla et al., 2023)

Además, y aunque se consideró una concentración de compuestos antifúngicos mayor in vivo que in vitro para asegurar la efectividad (Shu et al., 2024), parecen existir interacciones entre el huésped, el patógeno y el ambiente durante el desarrollo de la enfermedad que son determinantes en la capacidad de control de la misma al aplicar los agentes antifúngicos en los ensayos in vivo (Alvarez et al., 2023). Por otra parte, y dado que nuestros agentes antifúngicos son compuestos puros, es posible que interacciones fisicoquímicas de los componentes de la fruta y el recubrimiento disminuyan la efectividad de estos compuestos fenólicos. Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que la actividad antimicrobiana de estos compuestos está relacionada con su estructura química, teniendo mayor potencial antimicrobiano en sus formas esterificadas, encontradas en las paredes celulares de las células vegetales (Shu et al., 2024).

La diferencia en la actividad antifúngica de los compuestos naturales puros puede radicar en el método de acción de estos. En sales GRAS, se ha estudiado que se podría lograr la inhibición de la germinación de esporas y crecimiento micelial debido a las modificaciones de pH de la solución salina, además pueden modificar la turgencia celular con contracción y colapso de las hifas, alterando funciones enzimáticas (Soto-Muñoz et al., 2020). Por otra parte, en los aceites esenciales la efectividad puede estar relacionada a su composición que incluye una gran diversidad de compuestos fenólicos que pueden tener un efecto sinérgico o acumulativo entre ellos (Shu et al., 2024; Villalobos et al., 2016), induciendo mecanismos de resistencia frente a hongos patógenos en frutas (Kharchoufi et al., 2018).

Además, es posible que las interacciones fisicoquímicas de los componentes de los recubrimientos disminuyan la efectividad de estos compuestos fenólicos. Asgarian et al. (2023) encontraron que podría haber una interacción entre los componentes como la cera de abeja, sucroester y glicerol en la formulación con los aceites esenciales utilizados, disminuyendo la eficiencia y disponibilidad de los componentes antifúngicos.

Por último, y ya mencionado, remarcar que la actividad antimicrobiana de estos compuestos fenólicos puede depender de su estructura química, en especial de su grupo hidroxilo libre, por lo que tienen mayor potencial antimicrobiano en sus formas esterificadas (Shu et al., 2024). De manera que este radical hidroxilo libre en los compuestos puros podría haber interactuado con los componentes de la formulación del recubrimiento, tal y como han descrito Asgarian et al. (2023) en la misma formulación.

4. CONCLUSIONES

Este trabajo demuestra que los compuestos fenólicos evaluados, ácidos ferúlico, tánico y gálico, poseen un potencial como agentes antimicrobianos para todos los patógenos de los ensayos in vitro (*A. alternata*, *B. cinerea*, *C. gloesporoides*, *M. fructicola* y *P. expansum*). De los ácidos fenólicos evaluados, destacar que Fer/et y Tan/et son los que mayor actividad inhibitoria in vitro mostraron incluso a concentraciones bajas de 0,1 mg L⁻¹. Sin embargo, al incorporar los compuestos fenolicos a formulaciones de goma arabiga y aplicarlas en forma de recubrimientos sobre la superficie de nectarinas infectadas, no mostraron actividad antifúngica curativa frente a *M. fructicola* y *B. cinerea*, lo que sugiere que las interacciones fisicoquímicas entre estos compuestos y los ingredientes de los recubrimientos, así como la interacción de éstos con el tipo de fruto son determinantes en su eficacia como antifúngico. Los resultados obtenidos sirven de base para que en futuras investigaciones se amplíen estas formas de aplicación dado el alto potencial e innovación que representarían para un control más saludable y respetuoso de enfermedades de postcosecha en el sector hortofrutícola.

5. REFERENCIAS

- Aaqil, M., Peng, C., Kamal, A., Nawaz, T., & Gong, J. (2024). Recent Approaches to the Formulation, Uses, and Impact of Edible Coatings on Fresh Peach Fruit. In *Foods* (Vol. 13, Issue 2). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/foods13020267>
- Aguilar-Veloz, L. M., Calderón-Santoyo, M., Vázquez González, Y., & Ragazzo-Sánchez, J. A. (2020). Application of essential oils and polyphenols as natural antimicrobial agents in postharvest treatments: Advances and challenges. In *Food Science and Nutrition* (Vol. 8, Issue 6, pp. 2555–2568). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1437>
- Alvarez, M. V., Palou, L., Taberner, V., Fernández-Catalán, A., Martínez-Blay, V., Argente-Sanchis, M., & Pérez-Gago, M. B. (2023). Essential oils and natural plant extracts as antifungal ingredients of pectin-based edible composite coatings to control green mold and maintain postharvest quality of “Valencia” oranges. *Acta Horticulturae*, 1363, 229–236. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2023.1363.34>
- Asgarian, Z. S., Palou, L., Souza, R. F. L. de, Quintanilla, P. G., Taberner, V., Karimi, R., & Pérez-Gago, M. B. (2023). Hydroxypropyl Methylcellulose and Gum Arabic Composite Edible Coatings Amended with Geraniol to Control Postharvest Brown Rot and Maintain Quality of Cold-Stored Plums. *Foods*, 12(15). <https://doi.org/10.3390/foods12152978>
- Blancas-Benitez, F. J., Montaña-Leyva, B., Aguirre-Güitrón, L., Moreno-Hernández, C. L., Fonseca-Cantabrana, Á., Romero-Islas, L. del C., & González-Estrada, R. R. (2022). Impact of edible coatings on quality of fruits: A review. In *Food Control* (Vol. 139). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109063>
- Cabanillas-Bojórquez, L., Elizalde-Romero, C. A., & Editors, A.-S. (2024). *Plant's fungal diseases and phenolics response*. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-99-3334-1_13
- Choi, W. S., Singh, S., & Lee, Y. S. (2016). Characterization of edible film containing essential oils in hydroxypropyl methylcellulose and its effect on quality attributes of “Formosa” plum (*Prunus salicina* L.). *LWT*, 70, 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.036>
- Fadda, A., Sarais, G., Lai, C., Sale, L., & Mulas, M. (2021). Control of postharvest diseases caused by *Penicillium* spp. with myrtle leaf phenolic extracts: in vitro and in vivo study on mandarin fruit during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(10), 4229–4240. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11062>
- FAOSTAT Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics. Available online: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> (accessed on 1 June 2024)
- Hernández, A., Ruiz-Moyano, S., Galván, A. I., Merchán, A. V., Pérez Nevado, F., Aranda, E., Serradilla, M. J., Córdoba, M. de G., & Martín, A. (2021). Anti-fungal activity of phenolic sweet orange peel extract for controlling fungi responsible for post-harvest fruit decay. *Fungal Biology*, 125(2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.05.005>
- Karaca, H., Pérez-Gago, M. B., Taberner, V., & Palou, L. (2014). Evaluating food additives as antifungal agents against *Monilinia fructicola* in vitro and in hydroxypropyl methylcellulose-

- lipid composite edible coatings for plums. *International Journal of Food Microbiology*, 179, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.027>
- Kharchoufi, S., Parafati, L., Licciardello, F., Muratore, G., Hamdi, M., Cirvilleri, G., & Restuccia, C. (2018). Edible coatings incorporating pomegranate peel extract and biocontrol yeast to reduce *Penicillium digitatum* postharvest decay of oranges. *Food Microbiology*, 74, 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.011>
- Lekshmi, R., Arif Nisha, S., Thirumalai Vasan, P., & Kaleeswaran, B. (2021). A comprehensive review on tannase: Microbes associated production of tannase exploiting tannin rich agro-industrial wastes with special reference to its potential environmental and industrial applications. *Environmental Research*, 201. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111625>
- Liu, X., Wei, L., Miao, C., Zhang, Q., Yan, J., Li, S., Chen, H., & Qin, W. (2023). Application of Exogenous Phenolic Compounds in Improving Postharvest Fruits Quality: Classification, Potential Biochemical Mechanisms and Synergistic Treatment. In *Food Reviews International*. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/87559129.2023.2233599>
- Martínez-Blay, V., Pérez-Gago, M. B., de la Fuente, B., Carbó, R., & Palou, L. (2020). Edible coatings formulated with antifungal GRAS salts to control citrus anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and preserve postharvest fruit quality. *Coatings*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/COATINGS10080730>
- Martínez-Blay, V., Taberner, V., Pérez-Gago, M. B., & Palou, L. (2021). Postharvest treatments with sulfur-containing food additives to control major fungal pathogens of stone fruits. *Foods*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/foods10092115>
- Palou, L., & Pérez-Gago, M. B. (2019). *Antifungal edible coatings for postharvest preservation of fresh fruit*. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1325.20>
- Palou, L., & Pérez-Gago, M. B. (2024). *Antifungal activity of edible films and coatings for packing of fresh horticultural produce*. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3613-8_15,
- Quintanilla, P., Settler-Ramírez, L., Alvarez, M. V., Taberner, V., Palou, L. & Pérez-Gago, M. B. (2023). Antifungal activity of natural extracts and essential oils against *Monilinia fructicola* in vitro and as ingredients of pectin-based edible coatings for postharvest preservation of cold-stored nectarines. 12th International Congress of Plant Pathology, Lyon, pp. 878-879. <https://hdl.handle.net/20.500.11939/8708>
- Sahu, M., & Shrivastava, A. (2024). Exploring Microbial Spoilage in Fruits: Causes, Detection Methods, and Preventive Measures. *International Journal of Innovative Research in Technology and Science* www.ijirts.org, 12, 470. www.ijirts.org
- Sapper, M., Palou, L., Pérez-Gago, M. B., & Chiralt, A. (2019). Antifungal Starch-Gellan Edible coatings with thyme essential oil for the postharvest preservation of apple and persimmon. *Coatings*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/COATINGS9050333>
- Shiekh, K. A., Ngwungam, K., & Tongdeesoontorn, W. (2022). Polysaccharide-Based Active Coatings Incorporated with Bioactive Compounds for Reducing Postharvest Losses of Fresh Fruits. In *Coatings* (Vol. 12, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/coatings12010008>

- Shu, C., Sun, X., Cao, J., Droby, S., & Jiang, W. (2024). Antifungal efficiency and mechanisms of ethyl ferulate against postharvest pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 417. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110710>
- Soto-Muñoz, L., Pérez-Gago, M. B., Martínez-Blay, V., & Palou, L. (2023). Postharvest Application of Potato Starch Edible Coatings with Sodium Benzoate to Reduce Sour Rot and Preserve Mandarin Fruit Quality. *Coatings*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/coatings13020296>
- Soto-Muñoz, L., Taberner, V., de la Fuente, B., Jerbi, N., & Palou, L. (2020). Curative activity of postharvest GRAS salt treatments to control citrus sour rot caused by *Geotrichum citri-aurantii*. *International Journal of Food Microbiology*, 335. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108860>
- Sowmyashree, A., Sharma, R. R., Rudra, S. G., Grover, M., Singh, D., & Kumar, R. (2021). Edible coatings and plant extract influence decay and biochemical attributes of nectarines. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 91(2), 240–243. <https://doi.org/10.56093/ijas.v91i2.111598>
- Valencia-Chamorro, S. A., Palou, L., Delrío, M. A., & Pérez-Gago, M. B. (2011). Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(9), 872–900. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.485705>
- Villalobos, M. del C., Serradilla, M. J., Martín, A., Ordiales, E., Ruiz-Moyano, S., & Córdoba, M. de G. (2016). Antioxidant and antimicrobial activity of natural phenolic extract from defatted soybean flour by-product for stone fruit postharvest application. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(6), 2116–2124. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7327>
- Yang, X., Wang, Y., Jiang, H., Song, R., Liu, Y., Guo, H., & Meng, D. (2023). Antimicrobial peptide CB-M exhibits direct antifungal activity against *Botrytis cinerea* and induces disease resistance to gray mold in cherry tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 196. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.112184>
- Zhang, W., Zhao, H., Zhang, J., Sheng, Z., Cao, J., & Jiang, W. (2019). Different molecular weights chitosan coatings delay the senescence of postharvest nectarine fruit in relation to changes of redox state and respiratory pathway metabolism. *Food Chemistry*, 289, 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.047>