

**APLICACIÓN DE EXTRACTOS DE GRANADA PARA EL
CONTROL DE PODREDUMBRES EN POSCOSECHA DE
FRUTOS CÍTRICOS**

MÁSTER EN GESTIÓN Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

Alumna:

Verónica Taberner Roselló

Director:

Dr. Lluís Palou Vall

Tutora en la UPV

Dra. M^a Teresa Cháfer Nácher

Centro:

Centro de Tecnología Poscosecha- IVIA

Fecha:

Septiembre 2011

APLICACIÓN DE EXTRACTOS DE GRANADA PARA EL CONTROL DE PODREDUMBRES EN POSCOSECHA DE FRUTOS CÍTRICOS

Verónica Taberner Roselló¹, Lluís Palou Vall¹

RESUMEN

Las podredumbres verde y azul, causadas respectivamente por los hongos *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. y *Penicillium italicum* Wehmer son una de las principales causas de pérdidas económicas en poscosecha de cítricos. Para el control de estos patógenos, actualmente se emplean fungicidas químicos de síntesis, como el ortofenil fenol, el imazalil o el tiabendazol. Sin embargo, los riesgos que puede generar sobre la salud humana o el medio ambiente el acúmulo de estas sustancias, han derivado en la necesidad de desarrollar estrategias de control alternativas no contaminantes, entre las que se encuentra la aplicación de extractos vegetales naturales. Se ha demostrado que la granada (*Punica granatum* L.) posee, entre otras propiedades, actividad antioxidante y antimicrobiana, lo que se relaciona con el elevado contenido en polifenoles presentes principalmente en el pericarpio del fruto. En este estudio se evalúa la aplicación de distintos extractos de piel de granada para controlar las podredumbres verde y azul en poscosecha de cítricos. En primer lugar se realizaron ensayos de evaluación primaria de la capacidad de control ("screening" *in vivo*), aplicando extractos y combinaciones sobre cítricos inoculados con *P. digitatum* y se seleccionaron los tratamientos más efectivos (reducción de incidencia superior al 80%), que posteriormente se ensayaron de forma secundaria mediante baños a pequeña escala en fruta inoculada con *P. digitatum* y *P. italicum*. La aplicación mediante baños sobre fruta inoculada de extractos obtenidos con agua, metanol, acetona o sus combinaciones redujo significativamente la incidencia de las enfermedades respecto al control en un 30-68%.

RESUM

Les podridures verda i blava, causades respectivament pels fongs *Penicillium digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc. i *Penicillium italicum* Wehmer són una de les principals causes de pèrdues econòmiques en postcollita de cítrics. Per al control d'aquests patògens, actualment s'empren fungicides químics de síntesi, com l' ortofenilfenol, l' imazalil o el tiabendazol. No obstant això, els riscos que pot generar sobre la salut humana o el medi ambient l'acumulació d'aquestes substàncies, han derivat en la necessitat de desenvolupar estratègies de control alternatives no contaminants,

¹ Institut Valencià d'Investigacions Agràries. Ctra. Montcada-Nàquera, km 4,5. 46113 Montcada (València)

entre les quals hi ha l'aplicació d'extractes vegetals naturals. S'ha demostrat que la magrana (*Punica granatum* L.) té, entre altres propietats, activitat antioxidant i antimicrobiana, el que es relaciona amb l'elevat contingut en polifenols presents principalment al pericarp del fruit. En aquest estudi s'avalua l'aplicació de diferents extractes de pell de magrana per controlar les podridures verda i blava en postcollita de cítrics. En primer lloc es van realitzar assajos d'avaluació primària de la capacitat de control ("screening" *in vivo*), aplicant extractes i combinacions sobre cítrics inoculats amb *P. digitatum* i es van seleccionar els tractaments més efectius (reducció d'incidència superior al 80%), que posteriorment es van assajar de forma secundària mitjançant banys a menuda escala en fruita inoculada amb *P. digitatum* i *P. italicum*. L'aplicació mitjançant banys sobre fruita inoculada d'extractes obtinguts amb aigua, metanol, acetona o les seues combinacions va reduir significativament la incidència de les malalties respecte al control en un 30-68%.

SUMMARY

Green and blue moulds, caused respectively by *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. and *Penicillium italicum* Wehmer are major causes of economic losses after harvest of citrus fruit. To control these pathogens, synthetic chemical fungicides as orthophenyl phenol, imazalil or thiabendazole are currently used. However, the risks to human health or the environment, associated to the accumulation of these substances, have led to an increasing need to develop non-polluting alternative control strategies, such as the application of natural plant extracts. It has been shown that pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit has, among other properties, antioxidant and antimicrobial activities that are related to its high content of polyphenols mainly present in the pericarp. This study evaluates the application of different extracts of pomegranate rind to control citrus postharvest green and blue moulds. First, preliminary evaluation of the control ability ("screening" *in vivo*) was carried out by applying extracts and combinations on citrus inoculated with *P. digitatum*. The most effective treatments (reduction of incidence higher than 80%) were selected and subsequently secondarily tested in small-scale dip trials with fruit inoculated with *P. digitatum* and *P. italicum*. The dip application of extracts obtained with water, methanol, acetone or several combinations significantly reduced the disease incidence with respect to control fruit by 30-68%.

PALABRAS CLAVE: granada, *Punica granatum*, extractos naturales, cítricos, podredumbre, poscosecha, actividad antifúngica, control alternativo, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*

INTRODUCCIÓN

España es el mayor productor de cítricos de la Unión Europea y quinto en el mundo con una producción anual superior a 5 millones de Tm durante la última década. La Comunidad Valenciana es la principal región cítrica a nivel nacional, con una producción y superficie dedicada a este cultivo superior al 60% del total. De acuerdo con la FAO, España es el principal exportador de cítricos para el consumo en fresco en el mundo, destinando más de la mitad de su producción a la exportación.

Los cítricos, tras la recolección, están sujetos a alteraciones fisiológicas y patológicas que limitan su vida útil, entre las que destacan: la respiración, la transpiración, los daños por frío debidos a un mal manejo poscosecha, los ataques por plagas, o las podredumbres causadas por microorganismos. Las enfermedades de poscosecha de los cítricos son debidas principalmente a los hongos *Penicillium digitatum* (Pers:Fr) Sacc. y *Penicillium italicum* Wehmer, causantes de las podredumbres verde y azul, respectivamente. (Eckert y Eaks, 1989). La incidencia de estas podredumbres es elevada, y supone generalmente más del 80% del total de las pérdidas por podridos. Mientras que la primera es más prevalente (55-80% del total de podredumbres respecto un 2-30% de la azul), y si bien ambas se desarrollan más rápidamente a temperaturas ambientales (20-25°C), *P. italicum* crece mejor que *P. digitatum* a temperaturas de refrigeración (Tuset, 1987). Ambos patógenos infectan la fruta únicamente a través de heridas en la piel, donde la humedad y los nutrientes están disponibles y se estimula la germinación de las esporas y la infección (Brown et al., 2000). La fuente principal de contaminación son las esporas o conidios, que por su abundancia, sequedad, pequeño tamaño y peso, alcanzan con facilidad los frutos, tanto en el campo como en el almacén. Una vez sobre éstos, si están maduros y presentan heridas en la cutícula, las esporas germinan, y el tubo germinativo penetra fácilmente al interior de los tejidos. Al inicio de la infección, el área afectada presenta un color más oscuro de lo normal y el tejido adopta una consistencia blanda. En la superficie de la lesión se desarrolla una masa blanquecina de micelio, que rápidamente adquiere una coloración verde oliva en el caso de *P. digitatum*, o azulada en el caso de *P. italicum*, debida a la generación de esporas que en pocos días recubren todo el fruto (Tuset, 1987).

Dichas enfermedades actualmente se controlan mediante la aplicación de compuestos químicos de síntesis, como el imazalil, el ortofenilfenato sódico o el tiabendazol. Sin embargo, el riesgo que puede ocasionar sobre el medio ambiente o la salud humana la acumulación de estos compuestos, así como las restricciones legales en cuanto a límites máximos de residuos (LMR) permitidos y las demandas de un mercado cada vez más exigente ha planteado la necesidad de desarrollar y emplear medidas alternativas no contaminantes para el control de patógenos en poscosecha de cítricos. Se han encontrado resultados satisfactorios en la aplicación de baños con agua caliente solos o

combinados con aditivos alimentarios o sustancias GRAS (Generally Recognised As Safe) (Smilanick et al., 1999, Palou et al., 2002a, b). La incorporación de este tipo de sustancias de baja toxicidad en recubrimientos comestibles ha reportado resultados satisfactorios en el control de las podredumbres verde y azul (Valencia-Chamorro et al., 2008). Otros métodos de control alternativo consisten en los tratamientos de curado (Plaza et al., 2003), la aplicación de choques gaseosos, la aplicación de atmósferas controladas o modificadas, o bien la aplicación de extractos naturales, ya sean solos o incorporados en recubrimientos (Palou et al., 2008). Las hierbas y especias se han añadido desde tiempos inmemorables en los alimentos, no sólo por sus propiedades organolépticas, sino también por su acción antimicrobiana (Shan et al., 2009). Yahyazadeh et al. (2008) demostraron la fuerte acción inhibitoria que ejercían sobre el crecimiento *in vitro* de *P. digitatum* los aceites esenciales de clavo (*Eugenia caryophyllata*, rico en eugenol y β -cariofileno), o tomillo (*Thymus vulgaris*, compuesto por timol, p -cimeno y terpineno). Paralelamente, extractos metanólicos, etanólicos o acuosos de piel de granada controlaron el crecimiento de *P. digitatum* tanto *in vitro*, en un ensayo de difusión en agar, como *in vivo* sobre limones inoculados artificialmente con dicho hongo (Tayel et al., 2009).

Existen numerosos estudios que demuestran la actividad antimicrobiana de la piel de granada. Extractos metanólicos de esta parte del fruto inhibieron potentemente el crecimiento de *Lysteria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Yersinia enterocolitica*, tanto *in vitro* como *in situ* en alimentos, y dicha actividad se atribuyó a la presencia de fenoles (Al-Zoreky et al., 2009). Además, el extracto polifenólico purificado de piel de granada inhibió el virus de la gripe, presentando sinergismo al combinarse con el compuesto antivírico oseltamavir, efecto que se relacionó con la punicalagina presente en el extracto (Haidari et al., 2009). Este componente también mostró una notoria acción inhibitoria contra *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*, y su combinación con el antifúngico fluconazol mostró una interacción de sinergismo (Endo et al., 2010). Tayel y El-Tras (2009) demostraron que extractos de piel de granada obtenidos con metanol, agua o etanol fueron efectivos contra el crecimiento de *C. albicans*.

La granada, *Punica granatum* L., es un fruto no climatérico originario de medio Oriente empleado y valorado desde muy antiguas civilizaciones. Este fruto posee múltiples propiedades beneficiosas sobre la salud humana, como la prevención de ciertos tipos de cáncer o enfermedades coronarias o cerebrovasculares (Malik et al., 2005), atribuidos principalmente a su riqueza en compuestos con actividad antioxidante; también posee acción antiparasitaria y se ha empleado en el tratamiento de la diabetes (Julie, 2008).

La granada contiene una compleja combinación de polifenoles, incluyendo antocianinas y taninos hidrolizables. Las antocianinas son mono- y di-glicósidos de cianidina, pelargonidina y delphinidina. Los taninos hidrolizables se clasifican en galotaninos, elagitaninos, y los galagil-ésteres específicos de la granada: punicalagina y punicalina (Martin et al., 2008) (Figura 1).

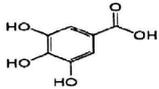
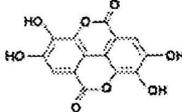
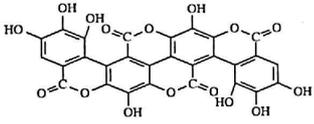
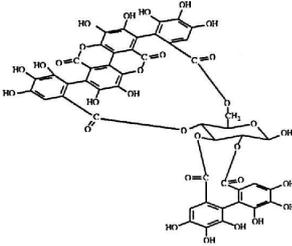
Molecule	Description of Composition	Chemical Structure
Galic acid	benzene ring with 1 carboxyl group in position 1 and 3 hydroxyl groups in positions 3, 4 and 5	
Ellagic acid	gallic acid + gallic acid	
Gallagic acid	ellagic acid + ellagic acid	
Punicalagin (monomeric hydrolyzable polyphenol)	gallagic acid + ellagic acid + glucose	

FIGURA 1. Estructuras moleculares constituyentes de los polifenoles de granada. (Martin et al., 2008).

Otros componentes encontrados en piel de granada con actividad antibacteriana y antifúngica, aparte de los anteriores son: castalagina, granatina, catequina, galocatequina, kemferol o quercetina (Jayaprakasha et al., 2006).

La granada se considera un alimento funcional, y su producción y consumo ha aumentado notablemente en los últimos años debido a sus propiedades beneficiosas y a la creciente demanda en los consumidores de productos nutraceuticos. España, en concreto la provincia de Alicante, es el principal productor y exportador de granadas en la Unión Europea. En la producción industrial de compuestos derivados de la granada (preparados de IV gama, zumos, gelatinas, licores, cosméticos...) se generan subproductos como la piel de las mismas, que se podrían revalorizar y emplear, teniendo en cuenta las aplicaciones potenciales de sus extractos.

El objetivo de este trabajo es la evaluación de la aplicación de extractos de piel de granada para controlar las podredumbres verde y azul en poscosecha de naranjas y mandarinas. Esta aplicación se contempla como un tratamiento alternativo a los químicos convencionales para el control de enfermedades en la post-recolección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración de los extractos de piel de granada

OBTENCIÓN DE POLVO DE PIEL DE GRANADA

Granadas de la variedad “Mollar de Elche” procedentes de cultivos de la zona de Elche fueron transportadas a nuestro laboratorio, donde se almacenaron a 5°C y 90% humedad relativa (HR) hasta ser empleadas. Los frutos se mezclaron al azar, eliminando aquellos que presentaban heridas o lesiones, se lavaron con agua destilada, se secaron con papel y se pelaron manualmente. Las pieles se introdujeron en estufa de convección a 55°C durante 26-28 h, hasta peso constante y posteriormente se molturaron con un molinillo de café hasta obtener un polvo fino, el cual se guardó en envases herméticos al abrigo de la luz hasta ser usado en las extracciones.

OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE PIEL DE GRANADA

Procedimiento general: 25 g de polvo de piel de granada se extrajeron dos veces con 100 ml del disolvente correspondiente en un agitador orbital (Jeio Tech Shaker SK-300) a 200 rpm a temperatura ambiente durante 1 h en la primera extracción y 1,5 h en la segunda. Después de cada extracción, el extracto se filtró a vacío con un embudo Büchner y filtro Whatman 41. Se mezclaron los filtrados y se secaron a vacío con un rotavapor (Büchi R-200/205). Los disolventes empleados fueron: metanol, etanol, acetona, diclorometano, acetato de etilo, agua, o las mezclas hidroalcohólicas etanol/agua y metanol/agua, en proporción 50:50%(V/V) y 20:80% (V/V). En el caso de agua o mezclas hidroalcohólicas, con el fin de adaptarse a las necesidades prácticas, previamente al filtrado los extractos se centrifugaron (Eppendorf 5810 R) 20 min a 12000 rpm y 4°C y en la etapa de eliminación del disolvente, éste se redujo un 90% en el rotavapor, completando el secado en un desecador a vacío hasta alcanzar peso constante.

Una vez obtenidos los residuos secos, éstos se redisolviéron en agua o dimetilsulfóxido (DMSO) al 50, 70 ó 100% hasta obtener una concentración en residuo seco del 4% (p/V) y se almacenaron a -80°C hasta ser empleados en los ensayos. Se empleó el DMSO por su carácter anfipático, lo que permite solubilizar estructuras químicas de diferente polaridad.

Procedimiento modificado: Cuando se utilizó como disolvente agua o mezclas hidroalcohólicas, también se empleó este método de extracción, que fue igual al general en las primeras etapas. En cambio, los filtrados resultantes de las extracciones no pasaron por el rotavapor para eliminar el disolvente, sino que se congelaron directamente a -80°C. Para determinar la concentración en residuo seco de dichos extractos, antes de congelarlos se tomaron alícuotas de 1 ml en cápsulas de porcelana, las cuales se introdujeron en estufa durante 24 h hasta alcanzar peso constante, que se determinó en una balanza de precisión y se calculó un promedio de la cantidad de residuo seco

Procedimiento de extracción acuosa por ebullición: Pieles secas, no molturadas, se hirvieron 30 min con agua destilada en la proporción de 10 g de corteza por 150 ml de agua. El agua de cocción se enfrió y se centrifugó a 12000 rpm y 4°C durante 30 min. El sobrenadante se filtró con un filtro Whatman nº1, se autoclavó a 121°C durante 30 min y posteriormente se congeló a -20°C. Los extractos resultantes por este método se aplicaron en los ensayos sin sufrir ninguna modificación posterior en la formulación.

La nomenclatura de los distintos extractos obtenidos se presenta en la Tabla 1.

TABLA 1. Nomenclatura de los extractos de piel de granada obtenidos, en función del método de extracción.

Procedimiento de extracción	Nomenclatura de los extractos obtenidos	Rendimiento medio de extracción (%)
Procedimiento general	Agua	38
	Metanol	47
	Etanol	17
	Acetona	3
	Diclorometano	0,2
	Etil acetato	0,1
	Etanol/H2O (50:50%)	42
	Metanol/H2O (50:50%)	49
Procedimiento modificado	Agua-frío	–
	Etanol/H2O (50:50%)-frío	–
	Etanol/H2O (20:80%)-frío	–
Procedimiento de extracción acuosa por ebullición	Acuoso por ebullición	–

Evaluación primaria de la capacidad de control (“screening” in vivo)

FRUTA

Se realizaron varios ensayos, empleando como material vegetal naranjas (*Citrus sinensis* L. Osbek) cv. Lanelate o mandarinas híbridas cv. Ortanique [*Citrus reticulata* Blanco x (*C. sinensis* x *C. reticulata*)] procedentes de la zona de Valencia, no sometidas a ningún tratamiento

poscosecha. En cada ensayo, el tamaño muestral fue de 4 repeticiones de 5 frutos por tratamiento, y se incluyó un tratamiento control, en el cual la fruta era sometida a las mismas condiciones, pero en lugar de extracto se le aplicaba agua.

INOCULACIÓN

Los frutos sanos previamente seleccionados se mezclaron entre sí aleatoriamente, se lavaron con agua de red y se dejaron secar al aire. Posteriormente se colocaron sobre alveolos plásticos en cajas de cartón, y se inocularon en un punto de la zona ecuatorial efectuando una herida en la piel con un punzón de acero inoxidable de 1 mm de diámetro y 2 mm de profundidad previamente sumergido en una suspensión de 10^4 ó 10^5 esporas/ml de *P. digitatum*. Esta suspensión se preparó a partir de un cultivo de dicho hongo de 7-10 días desarrollado en placas petri con el medio de cultivo patata dextrosa agar (PDA). Con un asa de platino se tomaron conidios de la superficie de la placa, se suspendieron en una mezcla de agua y tween-80 y su concentración se determinó empleando un hematocitómetro.

APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS

La fruta inoculada se incubó a 20°C y 90% HR durante 24 h y tras ese tiempo se depositaron en el punto de inoculación del patógeno 30 µl del tratamiento correspondiente. Los tratamientos se formularon el mismo día de la aplicación, a partir de los extractos originales, que tras descongelarlos se diluyeron en agua o mezclas de agua y DMSO hasta obtener formulaciones con diferentes concentraciones de residuo seco (0,04, 0,08, 0,1, 0,16, 0,4% (p/V)) y de DMSO (1, 3, 5, 7 y 10% (V/V)). Cada tratamiento incluía un extracto o bien una combinación de los mismos, con el fin de evaluar posibles efectos de sinergismo o antagonismo.

La fruta tratada se almacenó durante 6 o 8 días a 20°C y 90% HR.

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE CONTROL

Tras 4 y 7 días desde la inoculación del patógeno, se determinaron la incidencia (porcentaje de frutos podridos), y severidad (diámetro de la podredumbre, teniendo sólo en cuenta los frutos infectados) de la enfermedad. Tres días después del tratamiento se evaluó la presencia de síntomas aparentes de fitotoxicidad (manchas, hundimientos...) en el punto de inoculación y aplicación del extracto.

Evaluación secundaria de la capacidad de control. Tratamientos en baños a pequeña escala.

FRUTA

En estos ensayos con tratamientos previamente seleccionados se emplearon como material vegetal naranjas cv. Valencia late y mandarinas cv. Ortanique no sometidas a ningún tratamiento poscosecha. En cada ensayo se utilizaron 4 repeticiones de 10 frutos.

INOCULACIÓN

Los frutos sanos seleccionados se mezclaron y distribuyeron aleatoriamente, se lavaron con agua y se secaron al aire. Posteriormente se colocaron sobre alveolos plásticos en cajas de cartón, y se inocularon en lados opuestos de la zona ecuatorial con una suspensión de esporas de *P. digitatum* o *P. italicum*, (un hongo por cada lado) con una dosis de inóculo de 10^4 ó 10^5 esporas/ml, dependiendo del ensayo. La fruta inoculada se almacenó a 20°C y 90% HR durante 24 h.

APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS

Tras ese tiempo de incubación se aplicaron los tratamientos, que consistieron en aquellos seleccionados en la evaluación primaria por ser más efectivos en el control de la podredumbre verde. Éstos se formularon el mismo día a partir de los extractos originales, que se descongelaron y se diluyeron en agua o una mezcla de agua y DMSO hasta alcanzar en todos los casos una concentración final de residuo seco al 0,4% (p/V). La Tabla 2 muestra la formulación de los diferentes tratamientos.

TABLA 2. Formulación de los tratamientos aplicados en la evaluación secundaria de la capacidad de control. Los tratamientos T2, T3, T4, T7 y T8 se formularon a partir de un solo extracto, mientras que los tratamientos T5, T6, T9 y T10 se elaboraron a partir de combinaciones de extractos añadidos a partes iguales.

TRATAMIENTO	% Residuo seco (g/100 ml)	%DMSO	pH a 20° C
T1 Control	0	0	6,6
T2 Agua-frío-DMSO	4	7	4,26
T3 Metanol	4	7	3,76
T4 Acetona	4	7	3,34
T5 Agua-frío + Metanol	4	7	4,08
T6 Agua + Acetona	4	7	3,81
T7 Metanol / H2O (50:50% (V/V))	4	0	4,06
T8 Agua-frío-H2O	4	0	4,15
T9 Metanol/H2O (50:50% (V/V)) + Acetona	4	7	3,79
T10 Metanol + Acetona + Agua-frío + Etanol	4	7	3,96

La aplicación se llevó a cabo mediante baños a temperatura ambiente, colocando la fruta en mallas y sumergiéndola en las formulaciones de extractos durante 60 ó 150 s. En cada experimento, los tratamientos control consistieron en bañar la fruta inoculada en agua durante el mismo tiempo que el resto de tratamientos.

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE CONTROL

La fruta tratada se guardó a 20°C y 90% HR, y tras un periodo de incubación de 6 días, en el caso de mandarinas cv. Ortanique, o bien de 6 y 8 días, en el caso de naranjas cv. Valencia late, se evaluaron la incidencia (porcentaje de frutos infectados) y severidad (diámetro de las lesiones) de la enfermedad. También se evaluó la presencia de síntomas aparentes de fitotoxicidad en los frutos 3 días después del tratamiento.

Análisis estadístico

Para cada ensayo se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de la incidencia y la severidad, o bien de la reducción de incidencia y la reducción de severidad de enfermedad respecto al control mediante el paquete informático Statgraphics Plus 4.1 (Manugistics, Inc. Rockville, MD, EE UU). En el análisis de severidad o reducción de la severidad sólo se consideraron las heridas infectadas. Para el análisis de incidencia, los datos se transformaron al arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje de frutos podridos. Cuando aparecieron diferencias estadísticamente significativas, las medias se separaron mediante la prueba de la Mínima Diferencia Significativa (MSD) con un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados de los ensayos primarios

CAPACIDAD DE CONTROL

En la Tabla 3 se muestran los tratamientos aplicados. Algunos extractos se aplicaron a mandarinas cv. Ortanique, otros a naranjas cv. Lanelate, y otros a los dos tipos de fruta. Se muestran los resultados conjuntos de todos los ensayos primarios. Para cada extracto se indican las diferentes formulaciones que se elaboraron en cuanto a %residuo seco y %DMSO, así como el rango del porcentaje de reducción de incidencia que éstos causaron respecto al control. Para cada extracto, los mayores valores de reducción de incidencia se obtuvieron con las formulaciones cuyas concentraciones en residuo seco y DMSO eran respectivamente del 4% (p/V) y del 7 % (V/V). Dentro de los tratamientos con dicha formulación, los extractos más efectivos fueron los obtenidos con: Agua, Agua-frío, Metanol, Acetona, Etanol, Etanol/H₂O (50:50) y Metanol/H₂O (50:50), o con las combinaciones Agua + Acetona, Agua-frío + metanol, o Metanol/H₂O (50:50) + Acetona, que causaron una reducción máxima de incidencia de podredumbre verde respecto al control del 88, 94, 87, 76, 98, 82, 83, 94, 80, y 88%, respectivamente.

Dentro del extracto Agua-frío con una concentración en residuo seco del 4%, el tratamiento que contenía un 7% DMSO (Agua-frío-DMSO) causó una reducción media de incidencia respecto al control del 77%,

mientras que en el tratamiento que no contenía DMSO (Agua-frío-H₂O), este valor fue del 51%. El DMSO es una sustancia de muy baja toxicidad, y está aprobada como agente farmacéutico en más de 125 países. Se ha demostrado que este compuesto incrementa la permeabilidad celular de los microorganismos, aumentando así su susceptibilidad a ciertos antibióticos tanto *in vitro* como *in vivo*, observándose un efecto sinérgico (Ellis et al., 1996). Randhawa (2006) demostró que bajas concentraciones de DMSO las cuales no afectaban al crecimiento de hongos dermatofitos, podrían potenciar el efecto de fármacos antifúngicos. Sin embargo, también se ha observado antagonismo entre el DMSO y algunos aceites esenciales con acción antimicrobiana, como el de canela (Hilli et al., 1997).

Los extractos acuosos obtenidos mediante el procedimiento de ebullición no fueron muy efectivos y redujeron el porcentaje de incidencia respecto al control en un 16-21% a los 6 días de la aplicación de los tratamientos.

Los tratamientos formulados con extractos de etil acetato o diclorometano no controlaron el desarrollo de la enfermedad.

DAÑOS

En ningún caso se observaron daños aparentes en la piel de los frutos tratados.

TABLA 3. Tratamientos aplicados en la evaluación primaria efectuada *in vivo* en mandarinas cv. Ortanique o naranjas cv. Lanelate inoculadas con 24 h de antelación con una suspensión de 10^4 ó 10^5 esporas/ml de *P. digitatum*. Para cada extracto, se muestran las diferentes concentraciones de residuo seco y DMSO en que fueron formulados los tratamientos, así como el rango del % de reducción de incidencia de podredumbre verde que se alcanzó respecto al control, 7 días después de la inoculación del patógeno.

	EXTRACTO	%RESIDUO SECO (g/100 ml)	%DMSO	% REDUCCIÓN INCIDENCIA RESPECTO AL CONTROL
TRATAMIENTOS FORMULADOS CON UN SOLO EXTRACTO	DMSO (*)	0	1, 2, 2,5, 3, 4, 5, 7, 10	0-29
	Metanol	0,04, 0,08, 0,1, 0,16, 0,4	1, 2, 2,5, 4, 7, 10	0-87
	Etanol	0, 0,04, 0,08, 0,1, 0,16, 0,4	1, 2, 2,5, 3, 4, 5, 7, 10	0-98
	Acetona	0,04, 0,08, 0,1, 0,16, 0,4	1, 2, 2,5, 4, 7, 10	0-76
	Diclorometano	0,04, 0,08, 0,4	1, 2, 10	0
	Etil acetato	0,04, 0,08, 0,4	1, 2, 10	0
	Acuoso por ebullición	Desconocido	0	16-21
	Agua	0,04, 0,08,0,1, 0,16, 0,4	0, 1, 2, 2,5, 3, 4, 5, 7, 10	0-88
	Agua-frío	0,4	0, 1, 3, 5, 7	41-94
	Etanol/H2O (50/50 %)	0,4	0, 7	59-82
	Etanol/H2O (50/50%)-frío	0,4	0	27
	Etanol/H2O (20/80%)-frío	0,4	0	33
	Metanol/H2O (50/50%)	0,4	0, 7	20-83
	TRATAMIENTOS FORMULADOS CON COMBINACIONES DE EXTRACTOS	Agua + Agua-frío	0,4	7
Agua + Etanol		0,4	7	65
Agua + Metanol		0,4	7	65
Agua + Acetona		0,4	7	87-94
Agua-frío + Etanol		0,4	7	47
Agua-frío +Metanol		0,4	7	76-80
Agua-frío + Acetona		0,4	7	71
Etanol + Metanol		0,4	7	29
Etanol + Acetona		0,4	7	35
Metanol + Acetona		0,4	7	53
Etanol/H2O (50/50%) + Metanol		0,4	7	67
Etanol/H2O (50/50%) + Acetona		0,4	7	51
Metanol/H2O (50/50%) + Etanol		0,4	7	53
Metanol/H2O (50/50%) + Acetona		0,4	7	40-88
Metanol (30%) + Acetona (30%) + Agua-frío (40%)		0,4	7	33
Metanol (30%)+Acetona (30%)+ Agua-frío (40%) + Etanol (25%)		0,4	7	60

(*) Los tratamientos DMSO se formularon únicamente con una mezcla de DMSO y agua, sin efectuar ninguna extracción.

Resultados de los tratamientos en baños a pequeña escala

BAÑOS APLICADOS EN MANDARINAS CV. ORTANIQUE

En cuanto a la incidencia de la enfermedad, para un tiempo de inmersión de 60 s no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. En cambio, en los baños aplicados durante 150 s sí se apreciaron diferencias, siendo los más efectivos los extractos de Agua-frío-DMSO (T2), Agua-frío + Metanol (T5) y Agua + Acetona (T6), que redujeron la incidencia respecto al control en un 46, 68 y 41% para *P. digitatum* y un 77, 56 y 39% para *P. italicum*, respectivamente. Los extractos metanol y acetona fueron más efectivos tras combinarlos con los extractos agua-frío y agua, respectivamente, pues los tratamientos formulados con combinaciones de los mismos registraron menores valores de incidencia que aquellos en que se aplicaba un solo extracto (Figura 2).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Tayel et al. (2009), en los cuales la inmersión de limones inoculados 24 h antes en extractos de piel de granada en concentración de 1g / l durante 3 min controló el desarrollo de la podredumbre verde.

En cuanto a la severidad de la enfermedad, para 60 s de inmersión no hubo diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos. Con 150 s de inmersión, para *P. italicum* tampoco se encontraron diferencias, si bien para *P. digitatum* sí se observaron, alcanzando los menores valores de severidad los tratamientos Acetona (T4), Agua frío + Metanol (T5) y Agua + Acetona (T6) con una reducción de severidad respecto al control del 37, 33 y 30%, respectivamente (Figura 3).

No se observaron daños en la piel de los frutos.

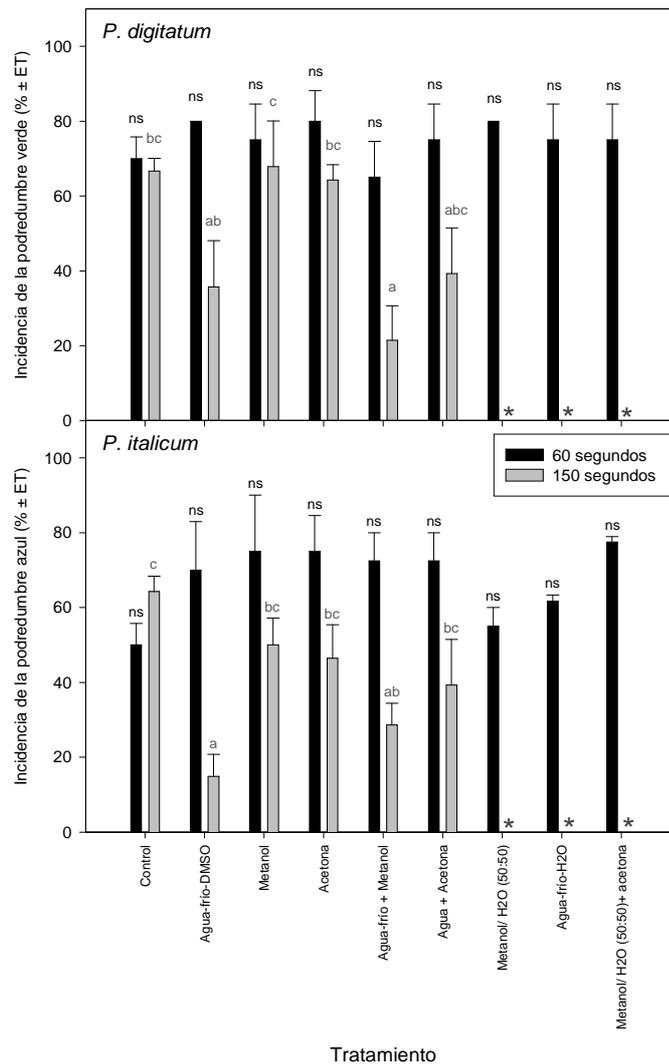


FIGURA 2. Incidencia de la podredumbre verde (gráfica superior) y azul (gráfica inferior) en mandarinas cv. Ortanique inoculadas artificialmente con *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* (10^4 esporas/ml), bañadas 24 h después a 20°C durante 60 ó 150 s en tratamientos formulados con extractos de granada y posteriormente incubadas a 20°C y 90% HR durante 6 días. Para cada tiempo de inmersión, columnas con letras diferentes y “ns” indican diferencias significativas ($p < 0,05$) o no significativas, respectivamente, según un ANOVA aplicado al arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje de frutos podridos. Se presentan las medias no transformadas. (*) Estos tratamientos sólo se evaluaron para un tiempo de inmersión de 60 s.

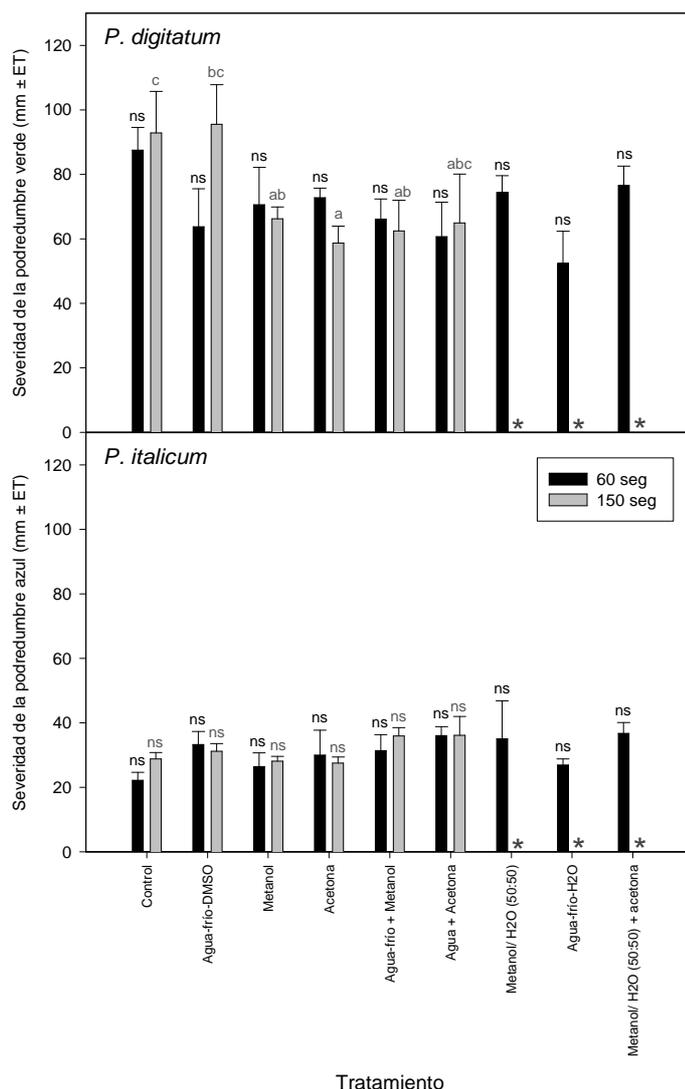


FIGURA 3. Severidad de la podredumbre verde (gráfica superior) y azul (gráfica inferior) en mandarinas cv. Ortanique inoculadas artificialmente con *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* (10^4 esporas/ml), bañadas 24 h después a 20°C durante 60 ó 150 s en soluciones acuosas de extractos de granada, y posteriormente incubadas a 20°C y 90% HR durante 6 días. Para cada tiempo de inmersión, columnas con letras diferentes y “ns” indican diferencias significativas ($p < 0,05$) o no significativas, respectivamente, según la prueba de la mínima diferencia significativa. Sólo se consideraron los frutos infectados.

(*) Estos tratamientos sólo se evaluaron para un tiempo de inmersión de 60 segundos.

BAÑOS APLICADOS EN NARANJAS CV. VALENCIA LATE

Reducción de la incidencia respecto al control.

Tras 8 días de incubación no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, al igual que tras 6 días de incubación en el caso de *P. digitatum*. Para *P. italicum*, en cambio, sí se apreciaron diferencias a este tiempo, siendo los tratamientos Metanol

(T3) y Agua-frío + Metanol (T5) los que mayor reducción de incidencia respecto al control provocaron (45 y 30%, respectivamente) (Figura 4).

Estos resultados son comparables a los obtenidos por Tayel et al. (2009) en la evaluación de la actividad antifúngica de extractos de piel de granada en ensayos de difusión en agar, donde el extracto metanólico fue el más efectivo para controlar el crecimiento de *P. digitatum*.

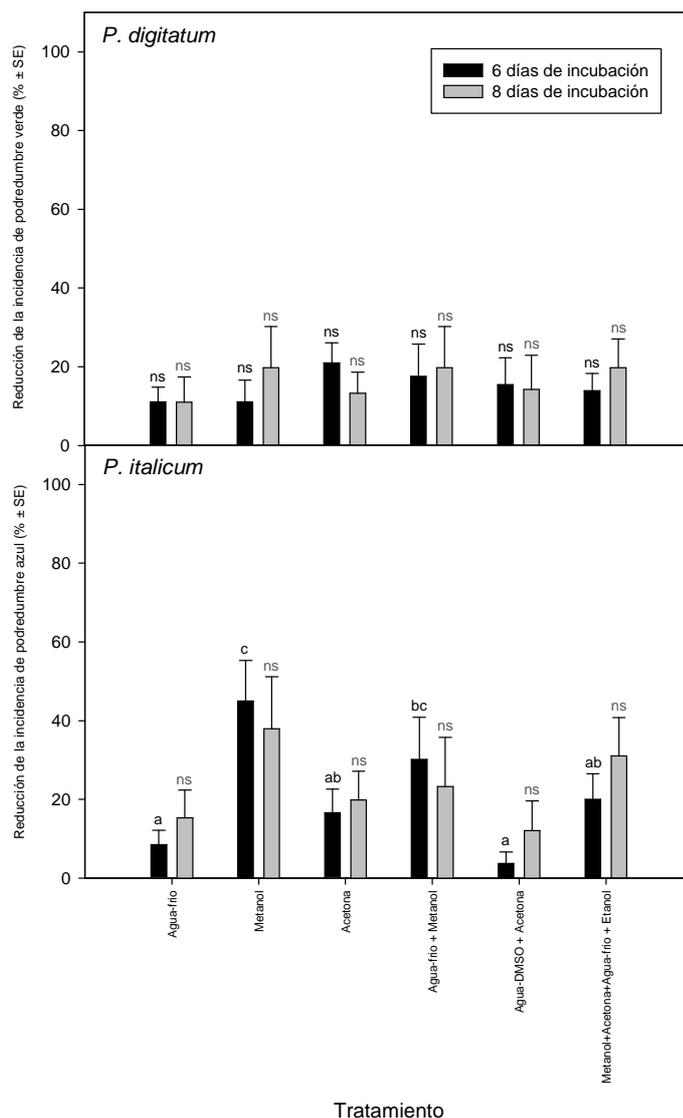


FIGURA 4. Porcentaje de reducción de la incidencia de la podredumbre verde (gráfica superior) y azul (gráfica inferior) respecto al control en naranjas cv. Valencia late inoculadas artificialmente con *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* (10^5 esporas/ml), bañadas 24 h después a 20°C durante 150 s en tratamientos formulados con extractos de granada, y posteriormente incubadas a 20°C y 90% HR durante 6 y 8 días. Para cada tiempo de inmersión, columnas con letras diferentes y “ns” indican diferencias significativas ($p < 0,05$) o no significativas, respectivamente, según la prueba de la mínima diferencia significativa.

Reducción de la severidad respecto al control

No se encontraron diferencias entre tratamientos para ninguno de los patógenos (Figura 5).

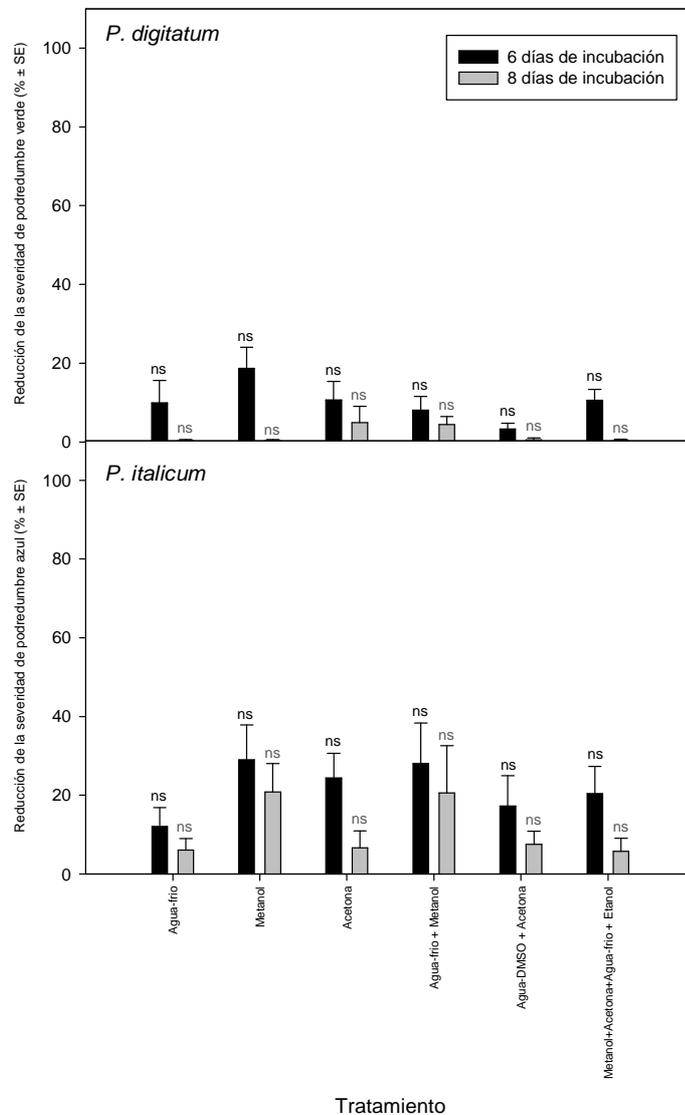


FIGURA 5. . Porcentaje de reducción de la severidad de la podredumbre verde (gráfica superior) y azul (gráfica inferior) respecto al control en naranjas cv. Valencia late inoculadas artificialmente con *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* (10^5 esporas/ml), bañadas 24 h después a 20°C durante 150 s en tratamientos formulados con extractos de granada, y posteriormente incubadas a 20°C y 90% HR durante 6 y 8 días. Para cada tiempo de inmersión, columnas con letras diferentes y “ns” indican diferencias significativas ($p < 0,05$) o no significativas, respectivamente, según la prueba de la mínima diferencia significativa. Sólo se tuvieron en cuenta los frutos infectados.

CONCLUSIONES

En los ensayos previos de evaluación de la capacidad de control se seleccionaron como más efectivos los tratamientos con una composición del 4% residuo seco y 7% DMSO y que contenían los extractos: Agua, Agua-frío, Metanol, Acetona, Etanol/H₂O (50:50) y Metanol/H₂O (50:50), o con las combinaciones Agua + Acetona, Agua-frío + metanol, o Metanol/H₂O (50:50) + Acetona, que causaron una reducción máxima de incidencia de podredumbre verde respecto al control del 76-94%

En los ensayos realizados en mandarinas cv. Ortanique en la evaluación secundaria de la capacidad de control, los baños efectuados con los extractos de granada seleccionados con tiempos de inmersión de 60 s no controlaron las enfermedades. Los tiempos de inmersión de 150 s fueron más efectivos y los tratamientos formulados con los extractos Agua-frío, Agua-frío + Metanol y Agua + Acetona redujeron significativamente la incidencia de las enfermedades respecto al control en un 40-68%. Sin embargo, esta reducción fue inferior a la obtenida en los ensayos primarios, lo cual podría deberse a un tiempo menor de contacto entre el extracto y el patógeno inoculado en la herida de la piel.

En los ensayos efectuados en naranjas cv. Valencia late los tratamientos Metanol y Agua-frío + Metanol causaron una reducción de la incidencia de enfermedad respecto al control del 45 y 30% respectivamente, tras 6 días de incubación.

EL DMSO potenció el efecto de los extractos.

AGRADECIMIENTOS

La autora agradece la concesión de una beca de especialización para licenciados en el año 2009, cofinanciada por el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias y el Fondo Social Europeo.

REFERENCIAS

- Al-Zoreky, N.S. 2009. Antimicrobial Activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruit Peels. *International Journal of Food Microbiology*, **134**:244-248.
- Brown, G. E.; Davis, M.; Chambers, M. 2000. Control of Citrus Green Mold with Aspire is Impacted by the Type of Injury. *Postharvest Biology and Technology*, **18**:57-65.
- Eckert, J.W., Eaks, I.L. 1989. Postharvest Disorders and Diseases of Citrus. En: Reuter, W., Calavan, E.C., Carman, G.E. (eds). *The Citrus Industry*, Vol. 5. Univ. California Press, Berkeley, CA, USA, pp.179-260.
- Ellis, L.C.; Rashad, A.L.; Loveless, M.O.; Sykes, R.; Jacobs, S. 1996. Effect of Dimethylsulfoxide (DMSO) on the Susceptibility of *Micobacterium avium* Complex (MAC) to Azithromycin (AZ), Clarithromycin (CLA), and Erythromycin (ERY). Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Abstract nº E65.
- Endo, E.H.; Córtez, D.A.G.; Ueda-Nakamura, T.; Nakamura, C.V.; Filho, B.P.D. 2010. Potent Antifungal Activity of Extracts and Pure Compound Isolated from Pomegranate Peels and Synergism with Fluconazole against *Candida albicans*. 2010. *Research in Microbiology*, **161**:534-540.

- Haidari, M.; Ali, M.; Casscells III, S.W.; Madjid, M. 2009. Pomegranate (*Punica granatum*) Purified Polyphenol Extract Inhibits Influenza Virus and Has a Synergistic Effect with Oseltamivir. *Phytomedicine*, **16**:1127-1136.
- Hili, P.; Evans, C.S.; Veness, R.G. 1997. Antimicrobial Action of Essential Oils: the Effect of Dimethylsulphoxide on the Activity of Cinnamon Oil. *Letters in Applied Microbiology*, **24**:269-275.
- Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Gestión Integrada de Plagas de Cítricos. Citricultura Valenciana. [en línea]. Dirección URL: <<http://gipcitricos.ivia.es/citricultura-valenciana>>. [Consulta: 4 Set. 2011].
- Jayaprakasha, G.K., Negi, P.S., Jena, B.S. 2006 Antimicrobial Activities of Pomegranate. En: Seeram, N.P., Schulman, R.N., Heber, D. (eds). *Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine*, CRC Press, Boca Ratón, FL, USA, pp.167-183.
- Julie Jurenka, M.T. 2008. Therapeutic Applications of Pomegranate (*Punica granatum* L.): A review. *Alternative Medicine Review*, **13**:123-144.
- Martin, K.R.; Krueger, C.G.; Rodríguez, G.; Dreher, M.; Reed, J.D. 2009. Development of a Novel Standard and New Method for the Quantitative Measurement of Pomegranate Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **89**:157-162.
- Palou, L., Smilanick, J.L., Droby, S. 2008. Alternatives to Conventional Fungicides for the Control of Citrus Postharvest Green and Blue Molds. En: Jiang, Y. (ed). *Stewart Postharvest Review*, **2**:1-16.
- Palou, L.; Usall, J.; Smilanick, J.L.; Aguilar, M.; Viñas, I. 2002a. Evaluation of Food Additives and Low-Toxicity Compounds as Alternative Chemicals for the Control of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* on Citrus Fruit. *Pest Management Science*, **58**:459-466.
- Palou, L.; Usall, J.; Muñoz, J.A.; Smilanick, J.L.; Viñas, I. 2002b. 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.
- Plaza, P.; Usall, J.; Torres, R.; Lamarca, N.; Asensio, A.; Viñas, I. 2003. Control of Green and Blue Mould by Curing on Oranges during Ambient and Cold Storage. *Postharvest Biology and Technology*, **28**:195-198.
- Randhawa, M.A. 2006. The Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on the Growth of Dermotophytes. *Japanese Journal of Medical Mycology*, **47**:313-318.
- Shan, B.; Cai, Y.Z.; Brooks, J.; Corke, H. 2007. The *in vitro* Antibacterial Activity of Dietary Species and Medicinal Herb Extracts. *International Journal of Food Microbiology*, **117**:112-119.
- Smilanick, J.L.; Margosan, D.A.; Mlikota, F.; Usall, J.; Michael, I.F. 1999. Control of Citrus Green Mold by Carbonate and Bicarbonate Salts and the Influence of Commercial Postharvest Practices on their Efficacy. *Plant Disease*, **83**:139-145.
- Tayel, A.A.; El-Baz, A.F.; Salem, M.F.; El-Hadary, M.H. 2009. Potential Applications of Pomegranate Peel Extract for the Control of Citrus Green Mould. *Journal of Plant Diseases and Protection*, **116**:252-256.
- Tayel, A.A.; El-Tras, W.F. 2009. Anticandidal Activity of Pomegranate Peel Extract Aerosol as an Applicable Sanitizing Method. *Mycoses*, **53**:117-122.
- Tuset, J.J. 1987. Podredumbres de los Frutos Cítricos. Conselleria d'Agricultura i Pesca. Generalitat Valenciana, Valencia. 206 pp.
- Valencia-Chamorro, S.A.; Palou L.; del Río, M.A.; Pérez-Gago, M.B. 2008. Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* by Hydroxypropyl Methylcellulose-Lipid Edible Composite Films Containing Food Additives with Antifungal Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**:11270-11278.
- Yahyazadeh, M.; Omidbaigi, R.; Zare, R.; Taheri, H. 2008. Effect of some Essential Oils on Mycelial Growth of *Penicillium digitatum* Sacc. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **24**:1445-1450.