

Cómo citar este artículo:

Madrigal Hoyos, L. Sumalla Cano, S., & Elio Pascual, I. (2022). Tecnologías de conservación de frutos rojos basadas en residuos de *Eucalyptus Globulus*. *Environmental, Sciences and Practices*, 1(1), 7-25.

TECNOLOGÍAS DE CONSERVACIÓN DE FRUTOS ROJOS BASADAS EN RESIDUOS DE EUCALYPTUS GLOBULUS

Lorena Madrigal Hoyos

Universidad Europea del Atlántico (España)

lorena.madrigal@uneatlantico.es · <https://orcid.org/0000-0003-1892-8758>

Sandra Sumalla Cano

Universidad Europea del Atlántico (España)

sandra.sumalla@uneatlantico.es · <https://orcid.org/0000-0001-9082-7877>

Iñaki Elio Pascual

Universidad Europea del Atlántico (España)

inaki.elio@uneatlantico.es · <https://orcid.org/0000-0001-6243-5550>

Resumen. El interés ambiental de la presente propuesta parte de la problemática para reducir los residuos no aprovechados de las plantaciones de eucalipto, así como también introducir en el sector de la alimentación un conservante “eco-friendly” natural y más eficiente energéticamente. En definitiva, el proyecto pretende convertir el residuo de las hojas de eucalipto en una materia prima de valor añadido que pueda ser empleado como conservante alimentario. Por un lado, se planteó la validación de un producto conservante basado en esencia de eucalipto para su uso en la industria alimentaria de frutos rojos. En particular, para el control del hongo *Colletotrichum acutatum* a nivel de postcosecha, en el que lamentablemente el extracto de eucalipto no mostró un efecto significativo dando valores de velocidad de crecimiento del hongo superiores al uso de ácidos orgánicos (láctico y cítrico). Por otro lado, se planteó una innovación tecnológica en el análisis del rendimiento de la extracción de esencia de *Eucalyptus globulus* de los bosques de Cantabria por diferentes métodos. El rendimiento promedio de extracción de aceite esencial demostró ser mayor por el método de destilación por arrastre de vapor.

Palabras clave: residuos forestales, eucalipto, aceites esenciales, extracción, frutos rojos.

RED FRUIT PRESERVATION TECHNOLOGIES BASED ON EUCALYPTUS GLOBULUS RESIDUES

Abstract. The environmental interest of this proposal stems from the problem of reducing unused waste from eucalyptus plantations, as well as introducing a natural and more energy efficient "eco-friendly" preservative in the food sector. In short, the project aims to convert the residue of eucalyptus leaves into a value-added raw material that can be used as a food preservative. On the one hand, the validation of a preservative product based on eucalyptus essence for its use in the red fruit food industry was proposed. In

particular, for the control of the fungus *Colletotrichum acutatum* at the post-harvest level, in which, unfortunately, the eucalyptus extract did not show a significant effect, giving values of growth speed of the fungus higher than the use of organic acids (lactic and citric). On the other hand, a technological innovation was proposed in the analysis of the performance of the extraction of essence of *Eucalyptus globulus* from the forests of Cantabria by different methods. The average yield of essential oil extraction was shown to be higher by the steam distillation method.

Keywords: forest residues, eucalyptus, essential oils, extraction, red fruits.

Introducción

El eucalipto es el género botánico con más diversidad de especies todas de gran valor medioambiental, de las cuales 37 tienen interés para la industria forestal y 15 son usadas con fines comerciales. Entre la diversidad de especies se encuentran arbustos de pequeño tamaño hasta los árboles más altos del mundo (*Eucalyptus regnans* de más de 100 metros).

Actualmente el eucalipto está presente en más de 90 países, la mayoría en zonas tropicales y subtropicales, aunque existen plantaciones de gran productividad en zonas templadas de Nueva Zelanda, Chile, Argentina, Brasil, Uruguay, Sudáfrica, la Península Ibérica y Estados Unidos. Se extiende sobre más de 22 millones de hectáreas en todo el mundo (0,53% de la superficie forestal mundial), aunque sólo 13 millones de hectáreas tienen interés industrial. Las plantaciones con productividad industrial representan el 59% de los bosques de eucalipto. En España las plantaciones de eucalipto representan el 3% de la superficie forestal, lo que brinda una oportunidad de desarrollo económico y social natural y sostenible.

En cuanto al eucalipto se refiere, sólo en Cantabria la tala de estas plantaciones genera un total de 4.000 toneladas al año de residuos. El elevado coste que supone sacar del monte las ramas, rabeones y cortezas sobrantes de la tala de los eucaliptos convirtió en costumbre la quema in situ de esos restos, con el consiguiente riesgo de provocar un incendio forestal. Según datos de ENCE, de las talas de eucaliptos no se aprovechan las hojas de las que se extrae el eucaliptol: del 22% de la materia que representa la celulosa se obtiene pasta mientras que del resto (raíces, ramas, corteza, lignina) se obtiene energía. Pero alrededor del 2% de la materia residual se tiende a desaprovechar.

La presente investigación tiene como principal objetivo generar un conocimiento aplicable a la industria alimentaria para el aprovechamiento de los residuos del *Eucalyptus globulus*. En la investigación se evaluarán las diferentes alternativas de captación de residuos forestales que genera la industria maderera de Cantabria en la tala de eucalipto. A continuación, se evaluarán y optimizarán el proceso industrial de la extracción de aceites esenciales provenientes del residuo forestal. Finalmente, se caracterizará y validará el producto obtenido para su utilización como conservante en la industria alimentaria relativa a frutos rojos.

El subproducto a obtener a partir de los residuos de hojas de *Eucalyptus globulus* será una esencia de eucalipto que se aplicará como conservante.

Metodología y Resultados

Para la recolección de residuos forestales, se llevó a cabo una exploración de las empresas de la región que ofrecen servicios de tala, poda y recogida de residuos forestales, también se obtuvo información cualitativa con relación a la posible anuencia de estas empresas a participar en una iniciativa de economía circular, en la cual obtengan

remuneración por el tipo de residuos que gestionan. Actualmente, algunas de éstas obtienen provecho mediante el uso de estos residuos como biomasa para la combustión, por lo que el interés hacia esta otra alternativa estaría condicionado a la rentabilidad y la practicidad que por comparación ofrecería cada procedimiento.

Durante la ventana temporal en la que se realizó la recolección de este residuo, no fue posible formalizar la colaboración empresarial, por lo que se procedió a la recolección en sitios de propiedad privada, con previa autorización. No obstante, se estableció que las empresas involucradas deberían cumplir con los siguientes criterios: reportar actividad continuada durante el año, trabajar con árboles de la especie *Eucalyptus globulus* al menos dos veces al año, manejar un volumen de residuos correspondiente a plantaciones forestales y no correspondiente a zonas residenciales ni sitios públicos.

Los residuos forestales fueron obtenidos en Parbayón, municipio de Piélagos, con ubicación geográfica 43° 21'44''N, 3°54'09''W (Figura 1). Esta es una zona cuya principal especie de cultivo forestal es el eucalipto, específicamente la especie *Eucalyptus globulus*.



Figura 1. Ubicación geográfica de los residuos de Eucalipto (*Eucalyptus globulus*)

Los residuos forestales fueron obtenidos “in situ” y en seguida se tomaron muestras de alrededor de 5 kg por cada lote. Se evaluaron 3 lotes en total, correspondientes a diferentes días de recolección de los residuos forestales, cada uno de éstos fue sometido a las mismas determinaciones técnicas, con la finalidad de obtener un resultado promedio y estimaciones estadísticas de la dispersión de los datos obtenidos.

Las fechas de la actividad de captación fueron: 28-07-2019, 04-08-2019, 18-08-2019.

Cada lote tuvo que ser procesado para su análisis en el menor tiempo posible, ya que el aceite esencial que se encuentra en las hojas se descompone rápidamente una vez que las hojas son separadas del árbol.

Los residuos captados fueron sometidos a un tratamiento de limpieza, para remover impurezas que pudieran alterar los resultados del estudio. La limpieza se llevó a cabo mediante la inmersión de las hojas de eucalipto en agua y haciendo movimientos de agitación para desprender las impurezas (Figura 2), seguidamente se realizó un segundo lavado con agua destilada.



Figura 2. Lavado de las hojas con agua

A continuación, las hojas frescas fueron escurridas (Figura 3) y colocadas sobre papel absorbente para retirar el agua en la superficie (Figura 4), lo que correspondió al secado inicial de las hojas, previo al proceso de secado en estufa.

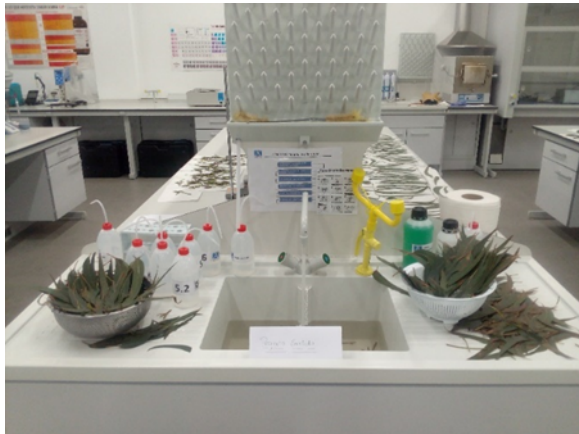


Figura 3. Lavado y escurrido de las hojas



Figura 4. Secado inicial de las hojas

El secado se llevó a cabo siguiendo las condiciones óptimas determinadas por el trabajo publicado por Moreno et al. 2010, correspondientes a 20 horas a temperatura de 40 °C. Las muestras fueron cortadas en pequeños trozos de 1 cm² aproximadamente (Figura 5) y colocadas en una estufa de secado marca Nahita modelo 631 (Figura 6).



Figura 5. Preparación de las muestras previo al proceso de secado



Figura 6. Muestras en estufa sometidas al proceso de secado

La etapa final de la fase de preparación de las muestras consistió en la molienda de las hojas (Figura 7). Este es un paso que se realiza comúnmente en los procesos de extracción de aceites esenciales y tiene el objetivo de disminuir el tamaño de partícula, lo que aumenta la superficie de contacto entre la muestra y el agua de extracción, facilitando así la transferencia de calor y masa, todo esto con el objetivo de lograr un mejor rendimiento de la operación de extracción del aceite esencial.



Figura 7. Muestras antes y después del proceso de molienda

Aceites esenciales

El fenómeno biofísico de la extracción del aceite esencial se describe como la ruptura de las estructuras histológicas de la planta (glándulas excretoras), liberando el aceite y éste se dispersa en el fluido de extracción, para posteriormente ser separado o aislado, generalmente por decantación (El Asbahani et al., 2015).

El fluido de extracción puede estar en forma líquida o en forma de vapor, pueden ser solventes orgánicos o agua. Para el caso de los alimentos, únicamente se puede utilizar agua como solvente de extracción, porque los solventes orgánicos son tóxicos y siempre existe el riesgo de encontrar trazas en el extracto del aceite esencial (Kumar et al., 2011).

Hidrodestilación

La hidrodestilación es uno de los métodos más antiguos y sencillos para la extracción de aceites esenciales de las plantas (Meyer-Warnod et al., 1984). En este método (Figura 8) el material vegetal es sumergido en agua hirviendo, los vapores son condensados y el líquido obtenido es posteriormente decantado para separar el aceite esencial de la fase acuosa del condensado. El aparato de Clevenger es el que tradicionalmente se utiliza para este tipo de extracción (Rassem et al., 2016).

Esta técnica tradicional presenta importantes desventajas con relación a otras técnicas convencionales, como la de destilación por arrastre de vapor. Entre las principales desventajas se señalan los cambios químicos (hidrólisis, ciclación, entre otros) en las moléculas terpénicas debido al prolongado contacto directo con el agua hirviendo y la pérdida de moléculas polares del aceite esencial al quedar atrapadas en la fase acuosa del agua hirviendo (Peredo-Luna et al., 2009).

Destilación por arrastre de vapor

En la destilación por arrastre de vapor de agua (Figura 9) se lleva a cabo mediante la inyección de vapor de agua recalentado directamente en la muestra vegetal, produciendo la ruptura de la estructura vegetal y la liberación y evaporación de los componentes volátiles. Los componentes volátiles son transportados junto con el vapor de agua hasta una etapa de condensación en donde se obtiene una mezcla líquida de dos fases, acuosa y orgánica, que es separada por decantación para obtener el extracto de aceite esencial puro (fase orgánica).

Este método permite la separación de los compuestos volátiles de los no volátiles (vaporización selectiva), ya que estos últimos no son arrastrados por el vapor. Así mismo,

este método posee la ventaja de que la interacción física del vapor de agua sobrecalentado no produce cambios químicos significativos en las especies químicas del aceite esencial.

Esta técnica presenta la ventaja de permitir el uso de temperaturas menores para extraer aceites esenciales termosensibles. Para esto se requiere configurar un equipo de generación de vacío para realizar el proceso de extracción a presiones reducidas y de este modo la evaporación de los compuestos volátiles ocurrirá a menor temperatura (Peredo-Luna et al., 2009).

Extracción con disolventes

La extracción con disolventes también se conoce como extracción Soxhlet, por ser el método más utilizado. En este método, la muestra, previamente secada y molida, entra en contacto con disolventes orgánicos (alcohol y cloroformo entre los más utilizados), que son calentados para acelerar el proceso de ruptura de las estructuras vegetales y la solubilización de la esencia en el disolvente.

Una de las desventajas más importantes de este método es que todos los disolventes que se pueden emplear son tóxicos (excepto el etanol, pero éste no se utiliza por su bajo rendimiento) y por lo tanto no pueden usarse para obtener aceites esenciales destinados a ser añadidos a productos alimentarios. Otro inconveniente es que el disolvente también solubiliza y extrae otras sustancias (ceas, grasas) y se obtiene al final un extracto impuro. También resulta costoso a nivel industrial y existe riesgos de explosión e incendio, por la naturaleza inflamable de los disolventes orgánicos.

De este modo, para obtener el extracto puro de aceite esencial, el producto de la extracción debe filtrarse y posteriormente se aplican condiciones de temperatura y presión para inducir la volatilización del disolvente, que además debe ser recuperado por restricciones de salud y seguridad y para ser reutilizado (Ortuño, 2006).

La extracción con disolventes por medio de métodos alternativos a Soxhlet, tienen la desventaja de requerir periodos de tiempo más largos y la mayor dificultad de separación del aceite esencial de la fase orgánica del extracto.

Evaluación de rendimiento de extracción por el método de destilación por arrastre de vapor

Los residuos de eucalipto, una vez acondicionados según lo descrito con anterioridad, se sometieron al proceso de destilación por arrastre de vapor (Figura 8) a escala de laboratorio. Para ello, se emplearon muestras de 500 g, previamente pesadas en balanza de precisión (Nahita 5062) para obtener los datos experimentales del peso del material antes de la extracción que permitieron calcular el rendimiento.

Las muestras estaban contenidas en un matraz o balón de fondo plano de 1000 ml de capacidad y el balón o matraz para la generación del vapor tenía una capacidad de 2000 ml.

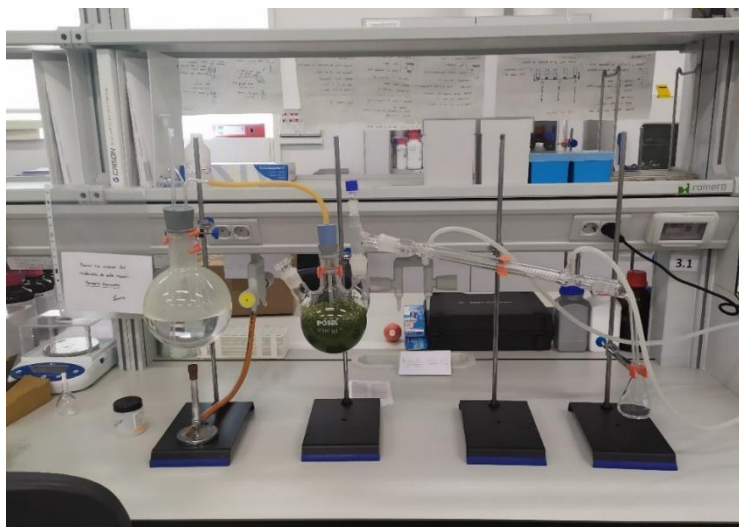


Figura 8. Método de extracción por arrastre de vapor realizado en el laboratorio del CITICAN, julio-agosto 2019

Se siguió un protocolo convencional para la extracción, bajo condiciones óptimas obtenidas mediante trabajos de investigación previos (Moreno *et al.* 2010) que corresponde a 120 minutos de tiempo de extracción, con las condiciones de sacado de las hojas de 42 °C y 20 horas.

Se realizaron tres ciclos de extracción por cada lote de residuos recolectado (tres lotes, recolectados en tiempos diferentes y en la misma localidad), y para cada método a ser comparado. Esta etapa de extracción se llevó a cabo en un tiempo aproximado de tres semanas, sin incluir las actividades de acondicionamiento de la muestra y el posterior manejo y almacenamiento del extracto. El extracto obtenido presentó un color amarillo claro, fue almacenado a temperatura de refrigeración (4 °C) y en ausencia de luz (Figura 9).



Figura 9. Extracto obtenido por el método destilación por arrastre de vapor

Una vez obtenido el extracto, se separó de la fracción acuosa mediante decantación (Figura 10), empleando un embudo de decantación (esmeril 19/26, 100 ml).

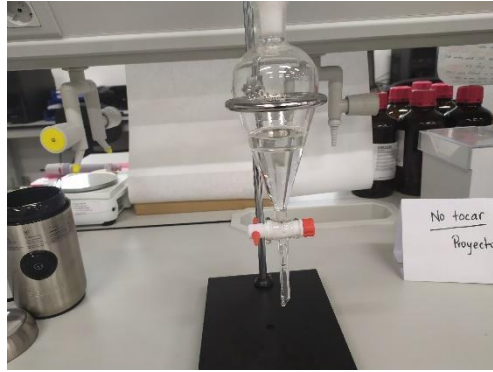


Figura 10. Separación del extracto de la fracción acuosa por decantación

El rendimiento de la extracción del aceite esencial (R), en proporción peso/peso, se determinó mediante la expresión:

$$R (\%) = \frac{m_a}{m_e} \cdot 100$$

Siendo m_a la masa del extracto obtenido del aceite esencial y m_e la masa de las hojas, después del proceso de secado, que fue pesada antes del proceso de destilación por arrastre de vapor, para la obtención del aceite.

El promedio de los valores obtenidos para el rendimiento de este método de extracción fue de 0,84%, con una desviación estándar de 0,08% y un coeficiente de variación del 9% (Cuadro 1).

En la bibliografía se evidencia un amplio rango de valores de rendimiento de extracción del aceite esencial mediante este método, que va desde 0,35% hasta 1,30% (Sebei et al. 2015). Hay múltiples factores que determinan esta variabilidad en los resultados, entre éstos: ubicación de los árboles, tipo de suelo, edad de los árboles, el método de secado como pretratamiento de las hojas y la estación del año (Aziz et al., 2018, Brooker et al., 2006). Por otro lado, un coeficiente de variación por debajo del 10% se suele considerar como aceptable en este tipo de investigaciones (Rao et al., 2014).

Tabla 1

Resultados rendimiento del método extracción por arrastre de vapor

Lote	Rendimiento (%)
1	0,85
2	0,91
3	0,76
Media	0,84
Desvest	0,08
C.V.(%)	9,0

Evaluación de rendimiento de extracción por el método de hidrodestilación

De modo similar al procedimiento anterior, los residuos de eucalipto fueron acondicionados según lo descrito previamente antes de ser sometidos al proceso de hidrodestilación (Figura 11). En este caso también se emplearon muestras de 500 g.



Figura 11. Método de extracción por hidrodestilación realizado en el laboratorio del CITICAN, Julio-Agosto 2019

Se siguió el protocolo de extracción utilizando las mismas condiciones del método de comparación, que fueron 120 minutos de tiempo de extracción y secado de las hojas a 42 °C por 20 horas.

De manera similar al método anterior, se recolectaron 3 lotes de hojas en la misma localidad y se realizaron tres ciclos de extracción para cada uno de estos. Esta etapa de extracción se llevó a cabo en un tiempo aproximado de tres semanas, sin incluir las actividades de acondicionamiento de la muestra y el posterior manejo y almacenamiento del extracto. De igual modo que en el método anterior, el extracto obtenido fue almacenado a temperatura de refrigeración (4 °C) y en ausencia de luz, antes de ser sometido al análisis fisicoquímico. Se observó un color ligeramente más oscuro que el extracto obtenido por el método anterior.

El extracto se obtuvo mediante la separación por decantación de la fracción acuosa y el extracto obtenido fue pesado para cada lote de extracción y, junto con los datos de masa inicial de las hojas, se determinó el rendimiento para cada lote, según la ecuación 1.

Los resultados de rendimiento por el método de extracción por hidrodestilación se presentan en el cuadro 2. Se obtuvo un promedio de 0,78% con una desviación estándar de 0,09% y un coeficiente de variación de 10% (Cuadro 2), éste último se considera aceptable en este tipo de investigaciones (Rao *et al.*, 2014).

Tabla 2

Resultados rendimiento del método extracción por hidrodestilación

Lote	Rendimiento (%)
1	0,75
2	0,72
3	0,87
Media	0,78
Desvest	0,09
C.V.(%)	10,2

Comparación de métodos de extracción del aceite esencial

Tal y como se evidencia en la literatura científica, existe una gran variabilidad en los resultados del rendimiento de extracción (0,35% - 1,30%) que no solo se deben a las diferencias entre los distintos métodos de extracción, sino que también obedecen a múltiples factores relacionados con las características propias del árbol o de las hojas, sin encontrar alguna correlación entre al menos una de estas variables y el rendimiento (Sebei et al., 2015; Brooker et al., 2006). Para minimizar el efecto de estos factores o variables, que pueden influir en el rendimiento, en cada método se aplicaron las mismas condiciones de temperatura y tiempo para el pretratamiento de secado de las hojas, conforme a las condiciones óptimas determinadas por estudios previos (Moreno et al., 2010). Asimismo, los lotes de muestra se obtuvieron del mismo lugar.

La característica de variabilidad del rendimiento según la ubicación del cultivo forestal de eucalipto convierte a este estudio en un aporte original de investigación, ya que en la revisión bibliográfica no se encontró ningún otro trabajo de investigación que estudiara el rendimiento de extracción de aceite esencial para cultivos forestales de eucalipto en esta región de España. De modo que se han generado datos experimentales que pueden tener utilidad en un futuro.

En la revisión bibliográfica se encontraron múltiples referencias sobre el método de extracción de destilación por arrastre de vapor, el cual es señalado como el procedimiento más viable desde el punto de vista de explotación comercial y con mayores facilidades para ser escalable a nivel industrial (Hesham et al., 2016; El Asbahani et al., 2015; Meyer-Warnod, 2004).

Si bien el promedio del porcentaje de rendimiento fue mayor para el método de extracción de destilación por arrastre de vapor, $0,85\% \pm 0,09\%$, con respecto al método de hidrodestilación, $0,78\% \pm 0,10\%$, no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos valores. Por otro lado, la extracción por hidrodestilación es señalado en múltiples estudios como un método que presenta desventajas como cambios químicos en las moléculas terpénicas debido al prolongado contacto directo con el agua hirviendo, así como la pérdida de moléculas polares del aceite esencial al quedar atrapadas en la fase acuosa del agua hirviendo (Aziz et al.; 2018, Kumar et al.; 2011).

Por las razones expuestas, se considera que el método de extracción por destilación por arrastre de vapor es el más adecuado para los propósitos del presente proyecto. Por lo que se recomienda escoger este método para la siguiente fase de investigación, que consiste en la caracterización fisicoquímica del extracto.

Propuesta del proceso de extracción

De acuerdo con la evaluación de los diferentes métodos de extracción del aceite esencial el método seleccionado fue la destilación por arrastre de vapor. Esta propuesta ha sido fundamentada con los resultados experimentales y con el conocimiento generado en estudios previos, obtenidos de la literatura científica (Hesham et al., 2016; Meyer-Warnod, 2004).

Por otro lado, el método tradicional de extracción por hidrodestilación puede presentar la desventaja de la producción de cambios químicos del aceite esencial (Aziz et al.; 2018); el método de extracción por solventes orgánicos conlleva el riesgo de encontrar trazas del solvente en el extracto del aceite esencial, lo cual es tóxico si se encuentra en los alimentos (Kumar et al.; 2014); mientras que los métodos alternativos representan desventajas para el escalamiento del laboratorio al nivel industrial, porque involucran mayor complejidad en el diseño y requieren mayores costos de instalación y de mantenimiento (El Asbahani et al., 2015; Stateva et al., 2011).

Caracterización fisicoquímica del aceite esencial

Para la caracterización del aceite esencial obtenido mediante el método de extracción por destilación por arrastre de vapor, se siguieron los procedimientos señalados en la norma técnica española UNE 84300 para el aceite esencial de *Eucalyptus globulus* de España (Asociación Española de Normalización y Certificación [AENOR], 2006).

Para la determinación de la densidad relativa del aceite esencial a 20 °C, se utilizó un picnómetro limpio y seco (Figura 12) de 3 ml de capacidad, se pesó vacío en una balanza analítica (Nahita 5062), seguidamente se llenó con el aceite esencial (que se encontraba en baño a 20 °C), tapándose y limpiándose el exceso de muestra y éste se pesó. Este procedimiento se repitió para muestras de los tres lotes del estudio. Se realizó el mismo procedimiento con agua destilada a 20 °C. Se determinó la densidad relativa del aceite esencial empleando la siguiente ecuación.

$$\rho_{20^{\circ}\text{C}} = \frac{(m_{a.e} - m_p)}{(m_a - m_p)}$$

Siendo ρ la densidad relativa a 20 °C, $m_{a.e}$ el peso en gramos del picnómetro con la muestra de aceite esencial, m_p el peso en gramos del picnómetro sin la muestra y m_a el peso en gramos del picnómetro con agua destilada.

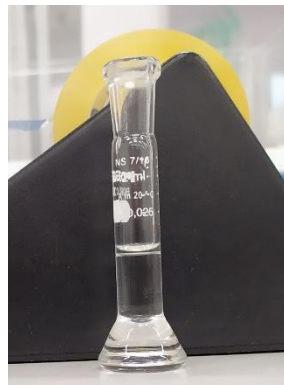


Figura 12. Picnómetro 3mL para determinación de densidad relativa.

Este procedimiento se realizó siguiendo las pautas de la norma española correspondiente, para aceites esenciales (AENOR, 2000) y se obtuvieron valores para cada lote de aceite esencial que fue extraído mediante destilación por arrastre de vapor. Los resultados se presentan en el cuadro El valor promedio de densidad relativa fue de $0,91 \pm 0,01$, el cual resulta un valor dentro del rango que la norma española señala como aceptable, siendo éste entre 0,905 y 0,925.

Tabla 3

Densidad relativa obtenida para las muestras de aceite esencial

Lote	Densidad relativa
1	0,89
2	0,92
3	0,91
Media	0,91
Desvest	0,01
C.V.(%)	1,4

El índice de refracción es una propiedad definida como la razón entre las velocidades de la luz en dos medios diferentes, calculado como el cociente de los senos de los ángulos de incidencia (en el primer medio) y el ángulo de refracción (en el segundo medio). El índice de refracción es una propiedad característica de cada aceite esencial y cambia cuando éste es mezclado o diluido con otras sustancias, por lo que éste es uno de los parámetros utilizados para evaluar la pureza del aceite esencial (Ortuño, 2006).

Se empleó un refractómetro digital (marca Hanna instruments, modelo HI96801), cuyas mediciones son arrojadas en las unidades de grados Brix, y se empleó una tabla de conversión correspondiente a 20 °C.

El cuadro 2 presenta los valores de índice de refracción obtenido para las muestras de los diferentes lotes. En promedio se obtuvo un valor de índice de refracción de 1,4601, que se encuentra dentro del rango de valores aceptables, entre 1,457 y 1,475, de acuerdo con lo indicado en la norma española UNE 84300 (AENOR, 2006).

Tabla 4
Índice de refracción de las muestras de aceite esencial

Lote	Índice de Refracción
1	1.4601
2	1.4583
3	1.4597
Media	1.4594
Desvest	0.0009
C.V.(%)	0.0648

Para el cálculo del índice de etanol, también se sigue el procedimiento respectivo según la norma española (AENOR, 2000). En éste, se utilizan mezclas etanol-agua de diferentes concentraciones volumétricas (70 y 96%) que se añaden a un volumen conocido de aceite esencial (1ml), al añadir un cierto volumen, de la mezcla de alcohol de mayor concentración, se observa una turbidez momentánea que desaparece por agitación. De manera progresiva, se continúa añadiendo la mezcla alcohólica, mientras se mide la cantidad añadida con una bureta.

Los resultados obtenidos para la solubilidad en etanol de las muestras de aceite esencial mostraron completa solubilidad para la mezcla de mayor concentración alcohólica, 96%, mientras que para la mezcla de 70% se obtuvo un valor de 7 partes de mezcla de etanol para obtener una solución clara, por cada parte (volumen) del aceite esencial.

Comparación con la norma UNE 84300:2006

El valor promedio de densidad relativa fue de $0,91 \pm 0,01$ g/ml, mientras que la norma señala como aceptable los valores que se encuentren dentro de un rango de 0,905 y 0,925. El valor de índice de refracción que se obtuvo fue de 1,4594, el cual se encuentra dentro del rango de valores aceptables señalados por la norma, entre 1,457 y 1,475. Mientras que el resultado de solubilidad en etanol, 7 volúmenes o partes solubles de etanol al 70% también se encuentra dentro de los valores conformes a lo que indica la norma UNE 84300 (AENOR, 2006).

Diseño del conservante

El objetivo de esta fase de la investigación estaba orientado a lograr la inhibición del crecimiento de *Colletotrichum acutatum*. Este hongo es el responsable de una enfermedad conocida como antracnosis y tiene una alta incidencia en la vida postcosecha de todos los frutos rojos, causando grandes pérdidas de producto comercial y, por tanto, pérdidas económicas para las empresas.

Este propósito se fundamenta en la baja disponibilidad de productos fitosanitarios autorizados de los que puedan disponer los productores en etapas de postcosecha, ya que es la etapa en la que el producto es adquirido por el consumidor para su consumo.

Para realizar el ensayo se utilizó la metodología propuesta por EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) aplicado sobre un extracto de eucalipto comercial y el obtenido en este proyecto.

El principio de esta metodología es impregnar discos de papel de calidad de laboratorio en una solución de concentración conocida de la sustancia a testar. Dicho papel se pone sobre un medio agarificado que estimule el crecimiento del microorganismo. De esta manera se garantiza que el agente que inhiba el desarrollo es el que está inoculado en el disco.

Si esta sustancia tiene una propiedad antimicrobiana, inhibirá el desarrollo del microorganismo cerca de él. En cambio, si no posee dicha propiedad, el microorganismo crecerá en dicha zona. Por tratarse de un disco de papel, la sustancia se difunde de forma homogénea creando una circunferencia que se denomina halo de inhibición, cuyo diámetro es una estimación del poder de inhibición: a mayor diámetro mayor poder inhibitorio (Figura 13).

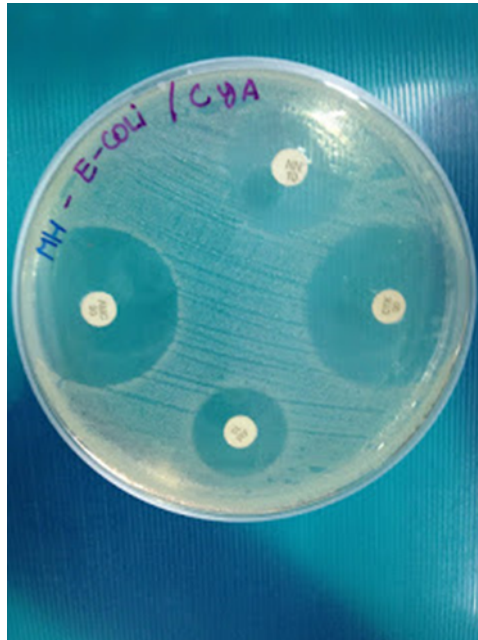


Figura 13. Esquema de halo de inhibición

Para realizar los ensayos, se adquirió en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) la cepa de antracnosis, pero en concreto su forma asexual o imperfecta que es la que certifica CECT, *Glomerella acutata*, y que además presenta la ventaja de que es fácilmente reproducible en condiciones de laboratorio.

Tras recibir el hongo, y tener adquirido el extracto comercial de eucalipto, al leer la etiqueta se observó que el producto era a base de un concentrado de extracto y que además tenía entre sus ingredientes alguna sustancia que igualmente pudiera presentar un efecto inhibitorio, por lo que se decidió comparar el extracto obtenido en este proyecto

con otros agentes frecuentes en el control de patógenos en postcosecha: ácido láctico y ácido cítrico (Feliziani et al., 2016; Romanazzi et al., 2009).

Ajustado el ensayo, se procedió a replicar el hongo en medio PDA (Patata-Dextrosa-Agar) y a impregnar los discos de papel en concentraciones de 0,1-5% de extracto de eucalipto, ácido láctico y ácido cítrico. En la figura 14 se puede observar los discos de papel, el trozo de hongo replicado y el micelio.

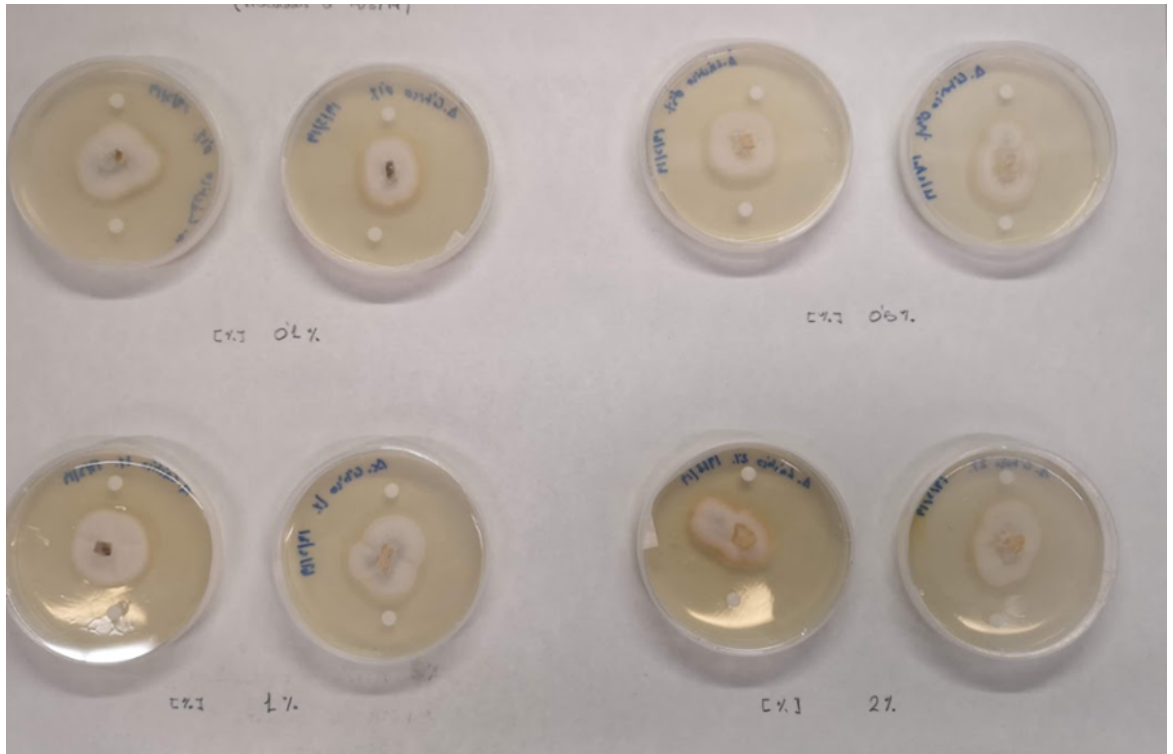


Figura 14. Trozo de hongo replicado y el micelio.

Se fue realizando un seguimiento diario del crecimiento. Como se puede observar en la figura anterior, la forma de crecimiento del micelio variaba entre circular y elíptica. En el primer caso se medía el diámetro y en el segundo el diámetro mayor. Se observó que en un periodo de 12-15 días la placa Petri estaba totalmente cubierta por el micelio del hongo. También se pudo observar que los discos no inhibían el desarrollo del hongo, creciendo el micelio por encima de los discos.

Este resultado obligó a replantear el ensayo buscando una metodología alternativa. Se optó por diluir el extracto de eucalipto, el ácido cítrico y el ácido láctico directamente en el medio PDA a las concentraciones estimadas (0,1-5%) y replicar directamente encima el hongo. En este caso los resultados sí fueron positivos, observando claramente cómo se modificaba la velocidad de crecimiento del hongo (Figura 15). El ensayo se mantuvo hasta que el micelio ocupaba toda la placa.

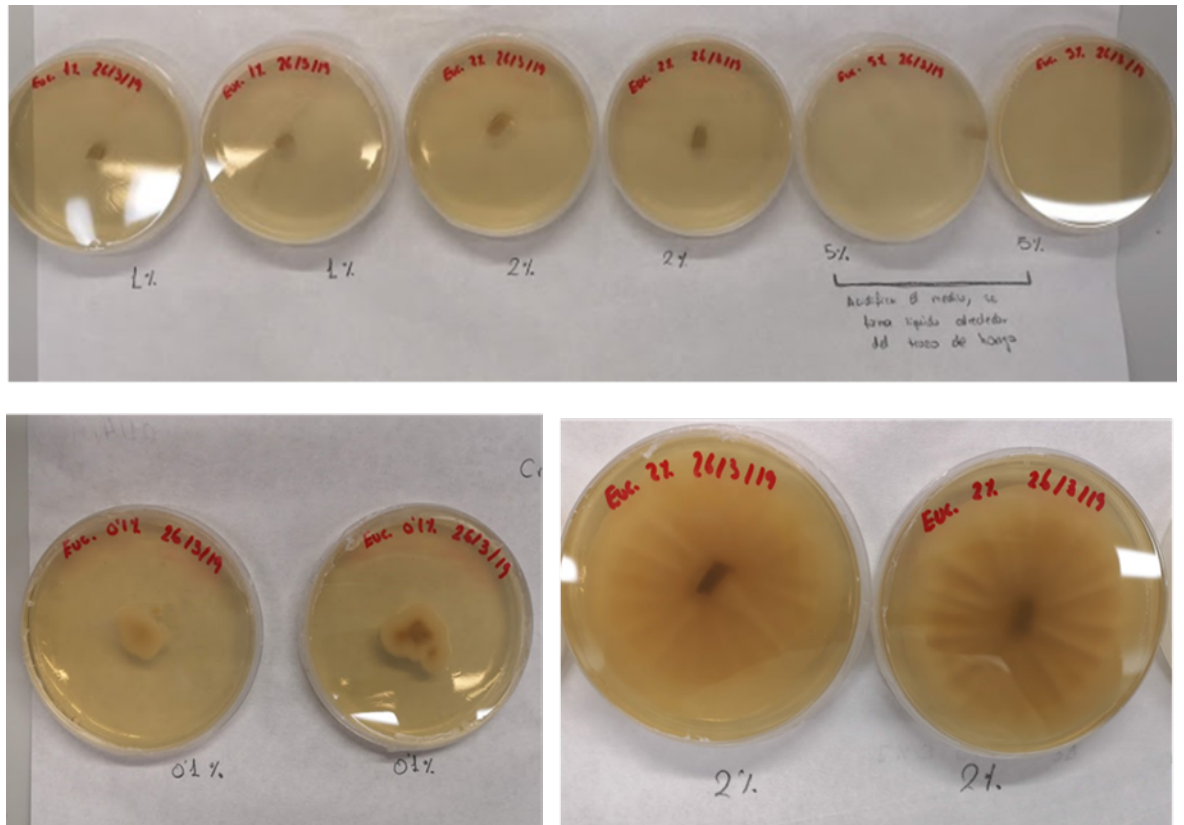


Figura 15. Velocidad de crecimiento del hongo

Las concentraciones a los que se aplicaron los tres productos fueron: 0,1%, 0,5%, 1%, 2% y 5%. En el caso de los ácidos cítrico y láctico, a partir de la concentración del 2% ya se inhibía el desarrollo del hongo, y en concreto, a partir del 1% la velocidad de crecimiento del ácido láctico era muy inferior al del ácido cítrico. En el caso del extracto de eucalipto, a partir del 2% el hongo seguía mostrando una actividad de crecimiento intensa.

En las siguientes figuras se muestran las gráficas que representan la velocidad de crecimiento de *G. acutata*. Cada línea viene definida por un tramo de ascenso cuya pendiente es la velocidad de crecimiento, expresada en mm/día, y una zona de meseta u horizontal que corresponde al momento en que la placa Petri estaba totalmente ocupada.

Para el caso de la concentración al 0,1%, el hongo creció de una manera más lenta con el extracto de eucalipto que con respecto a los dos ácidos. Con el extracto creció a un ritmo medio de 4,7 mm/día mientras que para los ácidos cítrico y láctico fue de 6,7 mm/día y 7,1 mm/día respectivamente. A pesar de tener una velocidad inferior, a partir del noveno día llenó toda la placa. Esto puede ser debido a que en el quinto y octavo día el hongo tuvo una actividad de desarrollo mayor que aceleró el proceso. No obstante, no se han encontrado referencias documentales para explicar este fenómeno.

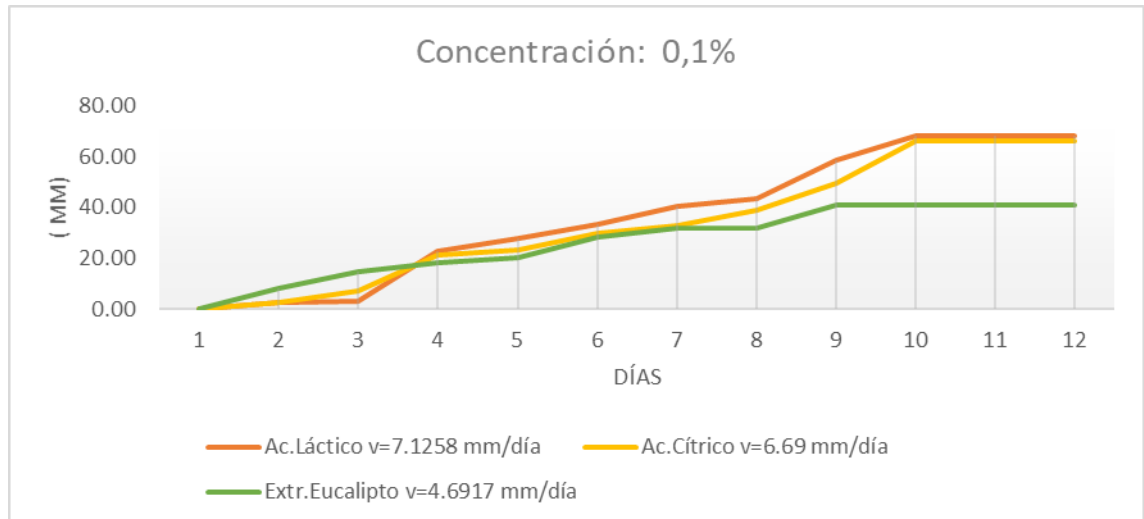


Figura 16. Velocidad de crecimiento de *G. acutata* para una concentración del 0,1% de los tres agentes de control ensayados.

Discusión y conclusiones

Si bien el rendimiento promedio de extracción de aceite esencial fue mayor para el método de destilación por arrastre de vapor con respecto al método de hidrodestilación, no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos valores. No obstante, la extracción por hidrodestilación es señalado en múltiples estudios como un método que presenta desventajas como cambios químicos en las moléculas terpénicas debido al prolongado contacto directo con el agua hirviendo, así como la pérdida de moléculas polares del aceite esencial al quedar atrapadas en la fase acuosa del agua hirviendo (Aziz et al.; 2018, Kumar et al.; 2011). Por tanto, se considera que el método de extracción por destilación por arrastre de vapor es el más adecuado para los propósitos del presente proyecto.

Lamentablemente, el extracto de eucalipto no mostró efecto para el control del hongo *Colletotrichum acutatum* a nivel de postcosecha, dando valores de velocidad de crecimiento del hongo superiores al uso de ácidos orgánicos (láctico y cítrico).

Comparando el efecto en el color y composición en compuestos con actividad antioxidante y el pH del extracto de eucalipto, sólo se observaron diferencias significativas en la aplicación de extracto de eucalipto para el caso del pH y los compuestos fenólicos, siendo en este caso superior a los valores encontrados para los tratamientos con los dos ácidos.

Sensorialmente, los arándanos tratados con el extracto tuvieron la peor valoración.

Estos resultados, a priori negativos, invitan a una investigación más profunda en futuras ocasiones centradas en:

- Evaluar el efecto en distintos estadios de desarrollo de *Colletotrichum acutatum*
- Evaluar el efecto de control del extracto sobre bacterias que afectan al cultivo como la Roya (*Pucciniastrum vaccinii*).
- Evaluar el efecto de control del extracto sobre otros hongos de interés para el arándano: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, etc.
-

Agradecimientos

Los autores desean expresar un especial agradecimiento al Dr. Marcos Hernández Suárez por el apoyo y asesoramiento en este proyecto, poniendo a disposición su conocimiento y dedicación. Asimismo, los autores agradecen a la Sociedad para el Desarrollo de Cantabria (SODERCAN) la cofinanciación del proyecto EC18-XX-004 dentro de la Convocatoria dedicada a la Economía Circular.

Referencias

- Aris, A. & Morad, A. (2014). Effect of extraction time on degradation of bioactive compounds. *Journal Teknologi* 67(4), 63–66.
- Asociación Española de Normalización y Certificación. 2006. Aceite esencial, crudo o rectificado, de *Eucalyptus globulus* de España (UNE 84300).
- Asociación Española de Normalización y Certificación. 2002. Aceites esenciales. Determinación de la miscibilidad en etanol (UNE 84153).
- Asociación Española de Normalización y Certificación. 2000. Aceites esenciales. Determinación de la densidad relativa a 20 °C. Método de referencia. (UNE 84156).
- Asociación Española de Normalización y Certificación. 2000. Aceites esenciales. Determinación del índice de acidez. (UNE 84157).
- Asociación Española de Normalización y Certificación. 2000. Aceites esenciales. Determinación del índice de refracción de los aceites esenciales. (UNE 84158).
- Aziz, Z., Ahmad, A., Setapar, S., Karacucuk, A., Ganash, M., Kamal, M., & Ashraf, G. (2018). Essential oils: extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential – A review. *Current Drug Metabolism*, 19, 11-20.
- Bachir R. & Benali, M. (2012). Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(9), 739-742.
- Boom, E., Orozco, J., Alean, J., & Rojano, B. (2018). evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales de eucaliptos cultivados en Colombia. *Información Tecnológica* 29(6), 57-66.
- Brooker, M. & Kleinig, D. (2006). *Field Guide to Eucalyptus. South-Eastern Australia, Bloomings*. Melbourne.
- Denev, P., Kratchanova, M., Ciz, M., Lojek, A., Vasicek, O., Nedelcheva, P., Blazheva, D., Toshkova, R., Gardeva, E., Yossifova, L., Hyrsil, P., & Vojtek, L. (2014). Biological activities of selected polyphenol-rich fruits related to immunity and gastrointestinal health. *Food Chem*, 157, 37–44.
- El Asbahani, A., Miladi K., Badri, W., Sala, M., Aït Addi, E., & Casabianca, H., El Mousadik, A., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F., & Elaissari, A. (2015) Essential oils: from extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(12), 220-243.
- EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). <http://www.eucast.org/organization/>
- Feliziani, E., Lichter, A., Smilanick, J., & Ippolito, A. (2016). Disinfecting agents for controlling fruits and vegetables diseases after harvest. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 53-69.

- Hesham, R., Abdurahman, N., & Rosli, M. (2016). Techniques for extraction of essential oils from plants: A review. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 10(16), 117-127.
- Kang, H.-C., Park, Y.-H., & Go, S.J. (2003). Growth inhibition of a phytopathogenic fungus: *colletotrichum* species by acetic acid. *Microbiol. Res*, 158, 321–326.
- Kumar, R. & Tripathi, Y. (2011). *Extraction technology of natural medicinal plants*. Forest Research Institute. Dehradun.
- Li, D., Li, B., Ma, Y., Sun, X., Lin, Y., & Meng, X. (2017). Polyphenols, anthocyanins, and flavonoids contents and the antioxidant capacity of various cultivars of highbush and half-high blueberries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 62, 84–93.
- Marcel, S. (2018). Use of essential oils as new food preservatives (Case: *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus crebra*). *Journal of Plant Science and Phytopathology*, 2, 083-090.
- Meyer-Warnod, B. (1984). Natural essential oils: extraction processes and application to some major oils. *Perfume Flavorist*, 9, 93-104.
- Moreno, J., López, G., & Siche, R. (2010). Modelación y optimización del proceso de extracción de aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*). *Scientia Agropecuaria* 1, 147–154.
- Ochoa, K., Paredes, L., Bejaranao, D., & Silva, R. (2012). Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens*. *Scientia Agropecuaria*, 3, 291-302.
- Ortuño, M. F. (2006). *Manual Práctico de Aceites Esenciales*. Aiyana.
- Rao, R., Syamasundar K., & Patel, R. (2014). Effect of method of distillation on the yield and chemical composition of *Artemisa annua* essential oil. *Journal of Essential Oil Research* 26(6), 486-491.
- Romanazzi, G., Mlikota Gabler, F., Margosan, D., Mackey, B.E., & Smilanick, J.L. (2009). Effect of chitosan dissolved in different acids on its ability to control postharvest gray mold of table grape. *Phytopathology*, 99, 1028–1036.
- Sebei, K., Sakoui, F., Larbi, M., & Boukhchina S. (2015). Chemical composition and antibacterial activities of seven eucalyptus species essential oils leaves. *Journal of Biological Research* 48(1), 70-83.
- Stateva, R.P. & Sovová, H. (2011). Supercritical fluid extraction from vegetable materials. *Reviews in Chemical Engineering* 27, 79–156.

Fecha de recepción: 30/05/2022

Fecha de revisión: 29/06/2022

Fecha de aceptación: 04/07/2022