



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

## USO DE ACEITES ESENCIALES PARA LA CONSERVACIÓN POSTCOSECHA DE FRUTA DE PEPITA

USE OF ESSENTIAL OILS FOR POSTHARVEST PRESERVATION  
OF POME FRUIT

### **Autor/es**

Claudia Corchero Medina

### **Director/es**

Pedro Marco Montori

Celia M. Cantín Mardones

Juliana Navarro Rocha

Facultad de Veterinaria

Curso 2021-2022

**1 INDICE**

<b>1</b>	<b><i>INDICE</i></b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b><i>RESUMEN</i></b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b><i>INTRODUCCIÓN</i></b>	<b>4</b>
3.1	Importancia de la manzana en España y Aragón	4
3.2	Pérdidas pre y post cosecha que afectan a la manzana	5
3.3	Métodos de lucha contra las podredumbres postcosecha	11
<b>4</b>	<b><i>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</i></b>	<b>15</b>
<b>5</b>	<b><i>DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA EMPLEADA</i></b>	<b>16</b>
5.1	Diseño experimental	16
5.2	Obtención de aceites esenciales de plantas aromáticas	16
5.3	Aislamiento y mantenimiento de cepas fúngicas	16
5.4	Determinación capacidad antifúngica	17
5.5	Determinación de la capacidad antifúngica de los compuestos bioactivos mayoritarios presentes en los AEs	20
<b>6</b>	<b><i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i></b>	<b>22</b>
6.1	Determinación capacidad antifúngica	22
6.2	Determinación de la capacidad antifúngica de los compuestos activos de los aceites esenciales	29
<b>7</b>	<b><i>CONCLUSIONES</i></b>	<b>32</b>
<b>8</b>	<b><i>BIBLIOGRAFÍA</i></b>	<b>34</b>
<b>9</b>	<b><i>ANEXOS</i></b>	<b>39</b>

## 2 RESUMEN

La manzana es una de las frutas de mayor producción y consumo en España. Tras su recolección, se producen grandes pérdidas económicas debido a la acción de diferentes hongos como *Monilinia fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Rhizopus stolonifer* y *Penicillium expansum*. El empleo de técnicas alternativas a la aplicación de fungicidas tradicionales es necesario en la actualidad, evitando efectos negativos sobre el medio ambiente y el rechazo por parte del consumidor.

Para ello, en este trabajo se propone la utilización de aceites esenciales (AEs) de las especies *Origanum virens*, *Salvia officinalis*, *Valeriana officinalis* y *Mentha rotundifolia*, junto con sus hidrolatos, un subproducto obtenido de las destilaciones de los AEs que está constituido principalmente por compuestos hidrosolubles, y algunos de los compuestos activos presentes en estos AEs (Linalool, Timol,  $\beta$ -pineno, Acetato de bornilo, Canfeno y Carvacrol).

Los métodos empleados para su aplicación fueron la difusión de AEs en disco, la dilución de AEs e hidrolatos en Agar Dextrosa Patata (PDA), dilución de AEs e hidrolatos en Caldo de Patata Dextrosa (PBD), actividad volátil, generación de esporas en Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBD), y difusión de compuestos activos en PDA.

El método de difusión de AEs en PDA, junto con el de difusión de los compuestos activos en PDA, fueron los que proporcionaron los mejores niveles de inhibición del crecimiento. En el primer caso, todos los AEs tuvieron gran eficacia contra los microorganismos, con excepción de *S. officinalis* que solo género inhibición frente a *M. fructicola*. En el caso de difusión de compuestos activos en PDA, los compuestos que presentaron una mayor capacidad antifúngica de forma general fueron linalool, timol y carvacrol, dando lugar a inhibiciones totales en el crecimiento de todos los hongos, teniendo en cuenta las diferentes concentraciones aplicadas.

**ABSTRACT**

Apples are one of the most widely produced and consumed fruits in Spain, and they suffer great economic losses due to the action of different fungi such as *Monilinia fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Rhizopus stolonifer* and *Penicillium expansum*. The use of alternative techniques to the application of traditional fungicides is a current need, in order to avoid negative effects on the environment and consumer rejection.

So, in this work, the use of essential oils (EOs) from species such as *Origanum virens*, *Salvia officinalis*, *Valeriana officinalis* and *Mentha rotundifolia*, is proposed, together with their hydrolates (a by-product obtained from the distillation of EOs that is mainly made up of water-soluble compounds) and some of their active compounds (Linalool, Thymol,  $\beta$ -pinene, Bornyl acetate, Camphene, Camphor and Carvacrol).

The methods used for their application were disc diffusion of EOs, dilution of EOs and hydrolates in Potato Dextrose Agar (PDA), dilution of AEs and hydrolates in Potato Broth Dextrose (PBD), lid diffusion of AEs, spore generation in Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBD) and diffusion of active compounds in PDA.

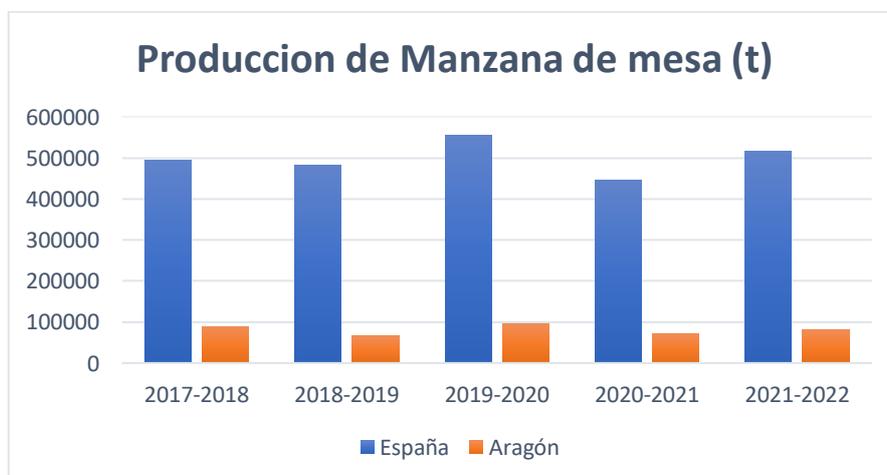
The method of AE diffusion on PDA, together with the method of active compound diffusion in PDA, provided the best levels of growth inhibition. In the first case, all the AEs were highly effective against the microorganisms, with the exception of *S. officinalis*, which only inhibited *M. fructicola*. Regarding the active compound diffusion in PDA, the compounds with the highest overall antifungal capacity were linalool, thymol and carvacrol, resulting in total inhibition of the growth of all fungi, taking into account the different concentrations applied.

### 3 INTRODUCCIÓN

#### 3.1 Importancia de la manzana en España y Aragón

A nivel nacional, las frutas frescas son uno de los productos más consumidos por los hogares españoles, solo por detrás de los productos del sector lácteo, habiendo consumido un total de más de 4 millones de toneladas este último año (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, MAPAMA, 2021). Sin embargo, esta cifra es ciertamente inferior a años anteriores, principalmente debido al fuerte impacto que ha tenido el aumento del precio medio, superando incluso el promedio del mercado con un valor de 1,71 €/kg. Por lo tanto, esta situación ha generado que el volumen de compra general de frutas haya disminuido en todo el territorio con una media de 91,80 kg/per cápita, exceptuando algunas comunidades autónomas como Aragón, con un consumo superior de 100,85 kg/per cápita. También cabe destacar que, en esta CCAA, las frutas más consumidas son las de pepita y con hueso, ocupando el segundo y tercer lugar en cuanto a adquisición tras los cítricos (MAPAMA, 2021).

Dentro de las frutas de pepita, la manzana (*Malus domestica*) es una de las más valoradas en España, ocupando el cuarto lugar de consumo con aproximadamente 425 mil toneladas consumidas en el año 2021 (MAPAMA, 2021). Tanto es así, que nuestro país es uno de los mayores productores en toda Europa, con más de 516 mil toneladas en el último año (Figura 1) y, además Aragón, representa la quinta parte de la superficie total de producción de fruta nacional, siendo el segundo productor de manzana (Gobierno de Aragón, 2022) con 80 mil toneladas este último año (Figura 1). Asimismo, el 50% de las plantaciones de manzana aragonesas se encuentran en las comarcas de Bajo Cinca, Comunidad de Calatayud, y Valdejalón con una superficie de algo más de un 13% cada una (Roldan Fau, 2005).



**Figura 1.** Producción total en toneladas de manzana de mesa en España y Aragón en los últimos 5 años (MAPAMA, 2021-2022).

Además de por su sabor y versatilidad en cocina e industria alimentaria, su popularidad radica en que se trata de un producto que posee una serie de características beneficiosas para la salud, ya que aporta hidratos de carbono fundamentalmente en forma de azúcares como fructosa, glucosa y sacarosa (Ticha et al., 2015), y contiene cantidades apreciables de fibra, tanto soluble (21,9 g/kg) como insoluble (13 g/kg), siendo esta última la más abundante, y que hace de este alimento un eficaz regulador de enfermedades del intestino grueso (estreñimiento/diarrea) . La fibra soluble (pectina), tiene por su parte, actividad hipocolesterolémica (Gorinstein et al., 2002). Son una fuente de flavonoides como los flavonoles, catequinas y procianidinas, que poseen propiedades antioxidantes y podrían modular la función inmunitaria y la activación plaquetaria. Contienen también dihidrochalconas (como la floretina), un tipo de flavonoides que se encuentran exclusivamente en las manzanas y sus derivados (Tomás Barberán & Clifford, 2000). Se localizan fundamentalmente en la piel de estas frutas aunque también en la pulpa. Además, en su composición presentan ácidos orgánicos como el cafeico (1994,1 mg/kg), p-cumárico (369,2 mg/kg) y ferúlico (112,2 mg/kg) (Gorinstein et al., 2002). Por desgracia, todas estas características nutricionales hacen que la manzana sea muy susceptible al ataque de diferentes patógenos (MAPAMA, 2018).

## **3.2 Pérdidas pre y post cosecha que afectan a la manzana**

### **3.2.1 Precosecha**

Existen una gran variedad de agentes que pueden afectar al deterioro y pérdida de calidad de la manzana a lo largo de la cadena “del campo a la mesa”, durante los períodos pre- y postcosecha. Durante el periodo de precosecha, es relativamente frecuente encontrar agentes físicos-meteorológicos como las tormentas de granizo y pedrisco, que combinadas con fuertes vientos, pueden producir daños tanto en los manzanos como en el propio fruto. Los impactos destrozan la corteza y ramas (dejando el xilema al descubierto) reduciendo la posibilidad de crecimiento de la fruta, y aumentando el riesgo de enfermedades y de pudrición; y el rameado, que es generado por fuertes vientos y da lugar a lesiones en la epidermis producidas por el rozamiento continuado del fruto contra las ramas y hojas (Urbina Vallejo, 2007). Otras inclemencias que afectan a las manzanas son las heladas, produciendo daños por congelación de los frutos recién formados; la insolación, sobre todo en los meses de verano, debido a que los frutos están más expuestos al sol, que produce quemaduras en la epidermis; y las precipitaciones elevadas, que dan lugar a la proliferación de hongos como *Venturia inaequalis* afectando al cuajado de los frutos debido a que al mojarse el polen, se dificulta la polinización por acción de los insectos y anemócora (Lasheras Blanco, 2013).

Otros elementos que pueden afectar a la producción de la manzana son los pesticidas y fungicidas utilizados para proteger las plantas y frutos, debido a que por su toxicidad se consideran uno de los factores principales por los que algunas especies de insectos polinizadores como las abejas están desapareciendo (European Food Safety Authority, 2013).

Relacionado con los insectos, también existen peligros biológicos asociados a diferentes plagas que afectan a los frutales como es el caso del *Pulgón ceniciento* que puede provocar daños severos en hojas y frutos; la carpocapsa (*Cydia pomonella*), cuyas larvas se alimentan de las manzanas malogrando el fruto; la mosca mediterránea de la fruta (*Ceratitis capitata*), que actúa de forma similar al anterior; y los barrenadores de la madera (*Zeuzera pyrina* y *Synanthedon myopaeformis*), que atacan a los árboles frutales excavando galerías hasta los brotes y ramas secándolos completamente. Asimismo, las aves también son un tipo de plaga bastante peligrosa debido a que son portadoras de una gran cantidad de parásitos y bacterias que pueden afectar a la salud humana (Alins et al., 2010). Además de estos, en el campo también existen más peligros biológicos como las bacterias gram negativas *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*, asociadas a los alimentos y que se encuentran en el agua y suelo, o pueden aparecer por contaminaciones cruzadas, aseo personal inadecuado y saneamiento deficiente; bacterias gram positivas *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, que se pueden encontrar en la vegetación, suelo y agua ; y hongos, como los pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria* (productores de micotoxinas como las zearalenonas, aflatoxinas, alternarioles, etc.), *Mucor* y *Rhizopus* (Valle Algarra, 2010); Inteligencia de Negocios Técnicos Agrícolas, 2012). Durante la recolección de las frutas también existen riesgos de pérdidas, sobre todo debido a la manipulación y el transporte poco cuidadosos que ocasionan lesiones mecánicas y generan manchas y podredumbres en la fruta. Hay que tener en cuenta que estas operaciones tienen que realizarse protegiendo a las frutas del sol, ya que las altas temperaturas afectan de forma negativa a su calidad. Esta etapa puede generar hasta un 30% de pérdidas económicas, por ello es muy importante que esta fase se realice de la forma más adecuada posible (Tzunúm Saquic, 2014).

### 3.2.2 Postcosecha

Después de la cosecha, por lo general, las manzanas se almacenan a bajas temperaturas (óptimo  $1^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ), preferiblemente en atmósferas controladas hasta su consumo, principalmente para controlar cambios fisiológicos tales como la disminución de la firmeza, cambios de color y otro tipo de alteraciones provocados por microorganismos como bacterias y hongos. Entre las bacterias, las que presentan un mayor riesgo para la salud humana son *Salmonella* spp., Enterobacterias, Coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* presuntivos, aunque

afortunadamente, en las manzanas suelen tener una incidencia baja de forma general (Viñas Almenar, 2005). Por el contrario, una gran cantidad de géneros de mohos son capaces de invadir la fruta y causar pérdidas económicas importantes (Venturini, Blanco y Oria, 2002).

Algunas de las cepas fúngicas más importantes por los daños y alteraciones de las propiedades organolépticas que pueden ocasionar en fruta de pepita son *Monilinia fructicola* (El Khetabi et al., 2021), *Botrytis cinerea* (di Francesco et al., 2022), *Alternaria alternata* (Sajid et al., 2020), *Rhizopus stolonifer* (Alizadeh-Salteh et al., 2010) y *Penicillium expansum* (Yu et al., 2020). Algunas de sus características más significativas son:

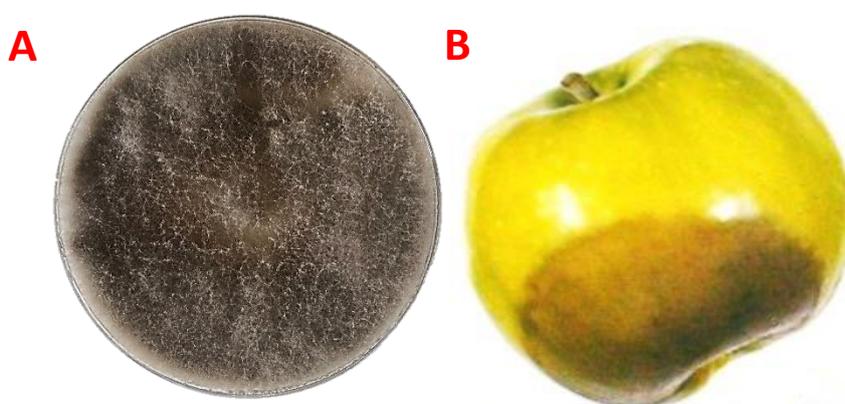
*Monilinia fructicola* (Figura 2): Considerada una de las tres especies del género *Monilinia* que tiene una mayor importancia económica debido a las pérdidas causadas, ya que pueden suponer, junto a otras especies, de un 5% a un 25% de pérdidas en manzanas durante el almacenamiento y la comercialización (di Francesco et al., 2022). Produce la podredumbre parda, que suele encontrarse de forma latente en el interior de los frutos, por lo que es difícil de combatir (El Khetabi et al., 2021). Cuando se encuentra activa, da lugar a lesiones de color marrón grisáceo, circulares y de forma definida con consistencia blanda que se extienden rápidamente. Suele infectar a una amplia gama de frutas de hueso rosácea y en menor medida manzana (*Malus* spp.) y pera (*Prunus* spp.). Para poder evitar su aparición, tradicionalmente se han aplicado tratamientos fungicida postcosecha como el captan, benomilo e iprodiona (Tsao & Zhou, 2000). Por ello se hace necesario la búsqueda de alternativas que permitan prescindir o minimizar la utilización de estos productos (Poniatowska, Michalecka and Bielenin 2013).



**Figura 2.** A - Cepa de *Monilinia fructicola* utilizada en este estudio. B – Manzana afectada por *Monilinia fructicola* (Foto (B): Servicio Agrícola y Ganadero, 2015).

*Botrytis cinerea* (Figura 3): Este patógeno conocido como "hongo del moho gris", provoca graves pérdidas de hasta el 50 % en más de 200 especies vegetales de todo el mundo durante su vida útil (di Francesco et al., 2022), entre las que se encuentran importantes cultivos y productos básicos cosechados, como la vid, el tomate, la fresa, la frambuesa, etc. Con el aumento del

comercio internacional de productos almacenados en refrigeración, este hongo ha alcanzado gran importancia porque puede crecer eficazmente durante largos periodos de tiempo a temperaturas justo por encima de la congelación en productos como manzanas, peras y fresas (Mohammadi, Hashemi y Hosseini, 2015). Por lo tanto, tiene la característica de ser extremadamente polífago ya que afecta a gran cantidad de especies y asimismo es capaz de afectar a las plantas en sus diferentes estados de desarrollo (el Ouadi et al., 2017). En el caso de las frutas, este tipo de infección fúngica origina manchas deprimidas de una textura firme y seca que se producen únicamente si el microorganismo penetra a través de algún tipo de herida o lesión generada en el fruto. Los métodos tradicionales utilizados para controlar su aparición consisten en la aplicación de fungicidas como el captan, benomilo e iprodiona (Tsao & Zhou, 2000).



**Figura 3.** A- Cepa de *Botrytis cinerea* utilizada en este estudio. B- Manzana afectada por *Botrytis cinerea* (Foto (B): Inteligencia de Negocios Técnicos Agrícolas, 2012).

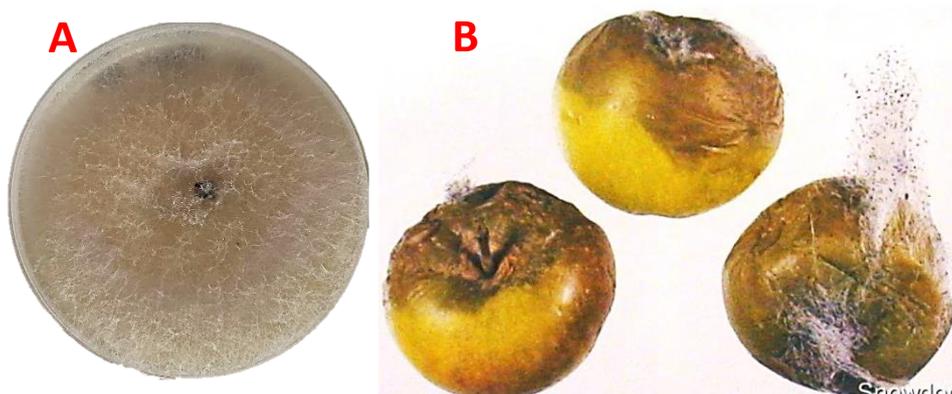
*Alternaria alternata* (Figura 4): Se trata de un hongo que puede ser encontrado en muchos tipos de plantas, frutos y otros sustratos; y que puede actuar tanto en campo como en postcosecha comportándose como oportunista o infectando por sí solo. Suele afectar a las plántulas, hojas, tallos, flores y frutos generando pérdidas en el rendimiento del 15 al 25% (Moumni et al., 2021; Benavides, Fernández Pinto y Pose, 2019). La podredumbre de la fruta por *Alternaria spp.* da lugar a manchas circulares amplias de color marrón, sin micelio aparente, firmes y secas que tiene un desarrollo lento presentado sobre todo en las últimas etapas de conservación y que es responsable de la pérdida de peso, cambios de color, ablandamiento, aumento de las pérdidas en el mercado y del impacto negativo en la economía. Esto sobre todo se produce debido a condiciones climáticas (25-32°C / 40-95% HR) que favorezcan al desarrollo de este hongo (Sajid et al., 2020). Además, las especies del género *Alternaria* sintetizan más de 70 metabolitos secundarios tóxicos para las plantas (fitotoxinas), algunos de los cuales afectan también a personas y animales, por lo que se consideran micotoxinas. La exposición a las toxinas de *Alternaria spp.* se ha relacionado con la aparición de efectos adversos para la salud y, en muchos

casos, se ha demostrado que tienen capacidad genotóxica, mutagénica, carcinogénica y citotóxica. Algunas de las micotoxinas producidas por *A. alternata* son el ácido tenuazónico (AT), el alternariol éter monometálico (AME) y alternariol (AOH) (Pavón Moreno et al., 2012). Para poder controlar este microorganismo y evitar su desarrollo, algunos de los fungicidas utilizados de forma habitual son difenoconazol y fludioxonil (Moumni et al., 2021).



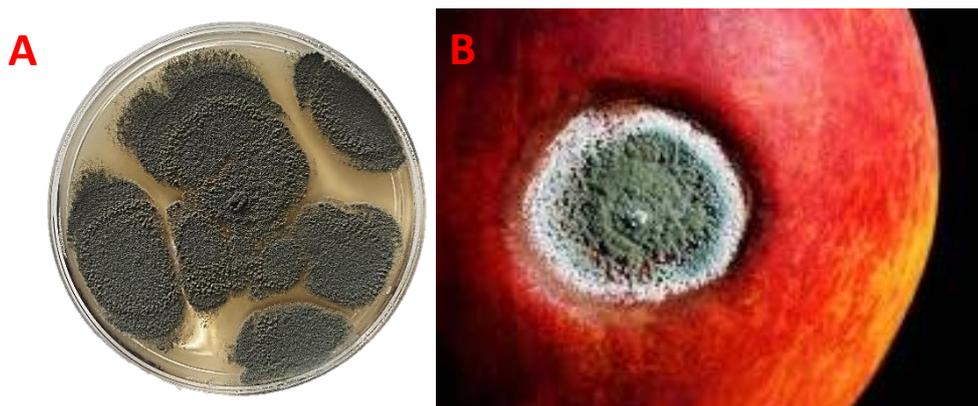
**Figura 4.** A- Cepa de *Alternaria alternata* utilizada en este estudio. B- Manzana afectada por *Alternaria alternata* (Foto (B): Lolás, 2020).

*Rhizopus stolonifer* (Figura 5): *R. stolonifer* es el segundo patógeno fúngico más importante, por detrás de la podredumbre parda (Yang & Jiang, 2015), ya que pueden causar el deterioro en frutas como manzanas, peras y melocotones, y también en verduras después de la cosecha de entre el 5 al 50% junto con otros mohos (el Ouadi et al., 2017; Bautista-Baños et al., 2014). Este hongo penetra en el huésped principalmente a través de magulladuras externas durante la cosecha, el transporte y la comercialización. La podredumbre por *Rhizopus* se trata de una podredumbre muy agresiva y difícil de controlar debido a que las esporas son muy comunes en la atmósfera y pueden infectar más fácilmente. Este organismo crece rápidamente bajo una temperatura de 23-28°C y provoca una grave descomposición en la fruta en 2 o 3 días, con lo que está se vuelve blanda y acuosa. A continuación, la masa micelial crece en la superficie de la fruta y produce largos estolones miceliales, dando lugar a una "infección anidada" al infectar la fruta sana adyacente y afectando a toda la caja en 1-2 días, lo que supone grandes pérdidas durante el transporte y la comercialización. Para controlar su aparición, tradicionalmente se han aplicado fungicidas comerciales como tiabendazol, benomilo, imazalil, propiconazol y tiocarbamatos (Yan et al., 2020); pero también se necesita conservar los frutos a temperaturas de refrigeración, ya que este microorganismo es muy sensible a la temperatura y así se evita su desarrollo.



**Figura 5.** A- Cepa de *Rhizopus stolonifer* utilizada en este estudio. B- Manzana afectada por *Rhizopus stolonifer* (Foto (B): Inteligencia de Negocios Técnicos Agrícolas, 2012).

*Penicillium expansum* (Figura 6): Hongo filamentoso que pertenece al género *Penicillium* y que infecta a la fruta huésped principalmente después de que se produzca un daño mecánico causado por la cosecha y el manejo postcosecha. La virulencia de este patógeno está estrechamente relacionada con el patógeno y el huésped mismo, el microambiente del huésped y el macroambiente en el que se encuentra el huésped. De tal forma que factores del entorno tales como la temperatura, niveles de etileno, humedad, etc. van a afectar a la extensión de la invasión (Yu et al., 2020). La podredumbre del moho azul por *P. expansum* es la principal condición patológica asociada a las manzanas almacenadas después de la cosecha. En nuestro país, esta podredumbre es responsable del 80 al 90% del deterioro por moho de la fruta almacenada. Causa una podredumbre húmeda que tiene forma circular con contornos nítidos de color marrón claro; el moho es primero blanco, y luego se va tornando verde azulado (Venturini, Blanco y Oria, 2002; el Ouadi et al., 2017).



**Figura 6.** A- Cepa fúngica de *Rhizopus stolonifer* utilizada en este estudio. B- Manzana afectada por *Rhizopus stolonifer* (Foto (B): Alomar, 2009).

Además, *P. expansum* es considerado como el principal productor de una micotoxina, la patulina, que se encuentra comúnmente en las manzanas podridas y está asociada a propiedades agudas, subagudas, genéticas, inmunitarias y teratogénicas (Yu et al., 2020). En las

últimas décadas, algunos de los productos fungicidas que se han aplicado para controlar esta podredumbre en la postcosecha son el imazalil y el tiabendazol (Venturini, Blanco y Oria, 2002).

### **3.3 Métodos de lucha contra las podredumbres postcosecha**

#### **3.3.1 Métodos tradicionales (Químicos)**

Desde principios de la década de 1960, los fungicidas de síntesis se han utilizado ampliamente para controlar las podredumbres postcosecha en frutas y hortalizas, habiéndose utilizado incluso durante más de tres décadas. Aunque los fungicidas sintéticos son eficaces, su aplicación continuada o repetida presenta importantes inconvenientes, como el coste, los riesgos de manipulación, la contaminación de frutas y hortalizas con residuos de fungicidas, las amenazas para la salud humana y el medio ambiente y el desarrollo de cepas de patógenas postcosechas resistentes a los fungicidas. Todos estos factores han hecho que aumente la preocupación pública por los posibles riesgos y que un gran número de organizaciones sanitarias e investigadores señalen que, aunque los fungicidas evitan el deterioro, su uso en productos alimentarios ya no es recomendable debido a su toxicidad y riesgo oncogénico (Venturini, Blanco y Oria, 2002). Además, las manipulaciones posteriores a la cosecha que se pueden realizar en uno o varios procesos con estos productos pueden causar magulladuras externas, dando lugar a un grave deterioro después de la cosecha sobre todo en frutas blandas (Yan et al., 2020; Mohammadi, Hashemi y Hosseini, 2015). Otra limitación que se presenta es la creciente reducción de los límites máximos de residuos (LMR) de plaguicidas establecidos en la legislación vigente para los productos de origen animal y vegetal, lo que provoca a su vez una restricción en las dosis que se puede utilizar de estos productos o incluso la prohibición de su aplicación. Este es el caso de los fungicidas Ciproconazol y Tiram, que se tratan de fungicidas de contacto con actividad preventiva, curativa y erradicante que tradicionalmente estaban autorizados para ser aplicados en manzanas por la Directiva 91/414/CEE. Actualmente, el reglamento (CE) nº 1107/2009 indica que el primero es muy posible que sea sustituido o no renovado para su utilización, mientras que el segundo tampoco va a ser renovado. (MAPAMA, 2022)

#### **3.3.2 Tratamientos alternativos**

Ante esta situación, se ha incrementado la búsqueda de soluciones al uso de fungicidas debido a las múltiples controversias mencionadas anteriormente.

Actualmente, las alternativas utilizadas pueden ser de varias clases: tipo físico, como la aplicación de tratamientos térmicos, luz ultravioleta y radiación ionizante; tipo químico, como la adicción de agentes colorantes, oxidantes o hidrolíticos; tipo biológico, como agentes de

biocontrol mediante el uso de cepas microbianas; y el uso de aceites esenciales, siendo este último una de las alternativas más y sencillas de aplicar (Calvo et al., 2017; Ozcakmak et al., 2016).

Todas estas técnicas son alternativas que permiten sustituir este tipo de compuestos nocivos por otros más naturales y menos peligrosos tanto para el medio ambiente como para los consumidores, ayudando a su vez en la consecución de los objetivos del Pacto Verde Europeo; reducir en un 50% el uso y riesgo de pesticidas químicos para 2030, control de plagas respetuoso con el medio ambiente y prohibición del uso de pesticidas en áreas sensibles (European Commission, 2022). Como ya se ha mencionado, el uso de aceites esenciales (AEs) procedentes de diferentes especies de plantas aromáticas, ha producido un incremento del interés científico por conocer el poder de este tipo de plantas y porque se trata de productos naturales. Varios estudios han demostrado las diferentes actividades biológicas de las plantas aromáticas y medicinales, especialmente el poder antifúngico, antibacteriano, antioxidante e insecticida. Así, los aceites esenciales podrían utilizarse como conservantes de los alimentos, gracias a la acción inhibidora del crecimiento y la toxigenogénesis de varias bacterias y hongos por parte de estos (el Ouadi et al., 2017).

Dentro de la gran variedad de AEs, aquellos que se ha visto que tienen una gran capacidad antifúngica en otros productos hortofrutícolas como calabazas, melocotones y uvas, son *Origanum virens*, *Salvia officinalis*, *Valeriana officinalis* y *Mentha rotundifolia* (Moumni et al., 2021; Alizadeh-Salteh et al., 2010; Sajid et al., 2020). A continuación, se detallan las principales características de estos AEs:

*O. virens*: El orégano es una planta aromática cultivada en varias regiones del mundo, cuyo valor se debe a su importancia industrial y farmacéutica como aceite esencial, el cual se emplea como fragancia en jabones, cosméticos y saborizantes. Además, posee propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias, antimicrobianas y antioxidantes. Entre estas actividades se puede destacar la actividad antioxidante (puede limitar o inhibir la oxidación de biomoléculas, ya que impiden la iniciación o propagación de las especies reactivas de oxígeno), antiséptica-antiviral (eficacia inhibitoria frente a bacterias, hongos e incluso algún virus), antiinflamatoria (el extracto soluble en agua de orégano puede mostrar actividad antiinflamatoria en células humanas), actividad frente a enfermedades crónico-degenerativas (el extracto o componentes aislados del orégano poseen actividad hipoglucémica, hipotensiva e hipolipidémica) y enfermedades neurodegenerativas (actividad inhibitoria frente a las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, relacionadas con el Alzheimer) (García Pérez et al., 2010).

*S. officinalis*: La salvia se trata de una planta herbácea muy aromática de origen mediterráneo. Su importancia radica en sus cualidades curativas, que son conocidas desde la antigüedad. Le han sido atribuidas numerosas actividades farmacológicas como antibacteriano, fungistático y virostático. Otras actividades destacables son la antiinflamatoria y antiséptica, ambas relacionadas con la presencia de componentes terpénicos; y la antimicrobiana, antifúngica y antiviral frente a distintos microorganismos. Además, los extractos acuosos de la salvia también poseen actividad antiséptica y antioxidante, debido a los ácidos fenólicos libres y en forma heterosídica que contienen (Hernández-Aguero, Carretero Accame y Villar del Fresno 2002).

*V. officinalis*: La valeriana es una planta perteneciente a la familia de las *Valerianaceae*. Se utilizan los órganos subterráneos (rizomas, raíces y estolones), para el tratamiento de estados neuróticos, especialmente en casos de ansiedad y trastornos del sueño. Desde la antigüedad, también se ha utilizado para combatir el dolor de cabeza, cólicos intestinales, dolores reumáticos, dismenorreas; por vía tópica en cortes, pequeñas inflamaciones y el acné (Villar del Fresno & Carretero Accame, 2001). De hecho, también se ha observado que la valeriana y sus extractos poseen fuertes actividades antioxidantes que pueden utilizarse en el tratamiento de enfermedades gracias a la presencia de compuestos como el ácido valerénico y el valepotriato (Dugaheh et al., 2013). Asimismo, existen otros compuestos como los terpenos iridoides que poseen diversas propiedades como la actividad antimicrobiana, antitumoral, antiviral y antiinflamatoria que resultan de gran utilidad (López-Carreras, Miguel y Aleixandre, 2012).

*M. rotundifolia*: El género *Mentha*, que comprende 20 especies distribuidas por todo el mundo, se encuentra entre los principales géneros pertenecientes a la familia *Lamiaceae*. Se consideran de gran importancia debido a su uso en medicina popular, culinaria, cosmética, saborizante y producción de aceites esenciales en todo el mundo. Dentro de las múltiples propiedades que son beneficiosas para la salud humana, la antioxidante es una de ellas, ya que la menta y sus extractos se tratan de eliminadores de radicales libres favorables, así como antioxidantes primarios que pueden reaccionar con los radicales libres y limitar el ataque de las especies reactivas del oxígeno (ROS), lo que es de gran utilidad para poder caracterizar la salud nutricional de los alimentos. Además, también posee elevadas propiedades antimicrobianas contra bacterias Gram positivas y negativas debido a los compuestos fenólicos; actividad antifúngica frente a hongos y levaduras gracias a componentes como el Germacrene D; y actividad insecticida significativa frente a insectos que actúan sobre la fruta gracias al constituyente mayoritario de la menta, la pulegona. (Riahi et al., 2013; el Arch et al., 2003).

Además, la capacidad inhibitoria y fungicida de cada uno de estos aceites también estará determinada por sus respectivos quimiotipos o moléculas con capacidad antifúngica que los

componen, ya que como se ha observado en otros estudios, compuestos como el carvacrol, timol y linalool pueden ser buenas alternativas contra microorganismos como *M. fructicola* y *B. cinerea* (Elshafie et al., 2015; Zhang et al., 2019). Así, también sería una alternativa interesante la aplicación y/o utilización únicamente de algunos de los compuestos activos de los AEs, determinando a su vez si la capacidad inhibitoria está exclusivamente ligada a esos componentes o está relacionada con la sinergia entre los distintos elementos que forman parte de los aceites.

Por último, cabe destacar que, durante el proceso de obtención por destilación de los aceites esenciales, se genera una gran cantidad de agua mejor conocida como hidrolato, que, aunque se pueda considerar un residuo líquido, también podría ser susceptible de ser usado como antimicrobiano. Es una sustancia que puede contener una cantidad apreciable de aceite valioso, además de que permite recuperar compuestos bioactivos e hidrosolubles como alcoholes, cetonas, fenoles, etc. que pueden tener cierta capacidad fungicida (Saha & Basak, 2020). Su utilización permitiría un mayor aprovechamiento de las sustancias con beneficios económicos significantes, evitando una mayor generación de residuos y contaminación, protegiendo a su vez al medio ambiente (Antezana Ruiz, 2017).

#### 4 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La creciente demanda, por parte de los consumidores, de alimentos ecológicos producidos mediante unas buenas prácticas agrícolas y de comercialización respetuosas con el medio ambiente, y las normativas legales cada vez más restrictivas en el uso de productos de origen químico, hace necesario buscar otras alternativas que contribuyan a una agricultura sostenible que ayude a evitar el deterioro de productos frutícolas, tales como la fruta de pepita, y alargar su periodo de conservación.

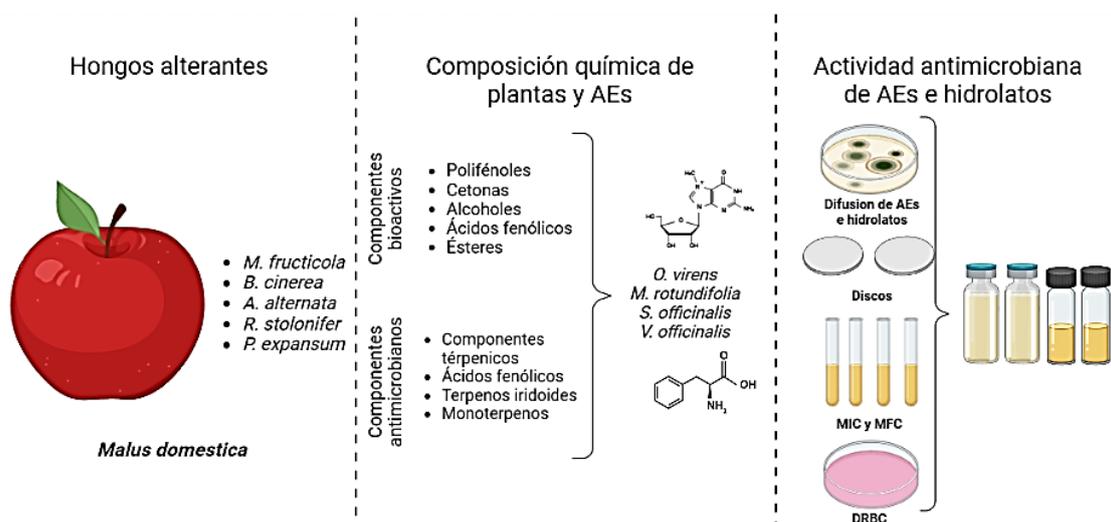
Por ello, este Trabajo de Fin de Grado tiene como objetivo general buscar una alternativa a fungicidas de origen químico aplicados a manzana mediante la utilización de AEs de plantas aromáticas cultivadas en Aragón, determinando su capacidad antifúngica frente a los principales hongos alterantes de la manzana durante su periodo de conservación postcosecha. Para la consecución de este objetivo general, se abordarán los siguientes objetivos parciales:

1. Aprendizaje de búsqueda de información en bases de datos, manejo de herramientas de gestión bibliográfica y otros programas de ayuda para la elaboración de textos científicos.
2. Revisión bibliográfica sobre propiedades de las plantas aromáticas medicinales, hongos fitopatógenos de la fruta de pepita, y técnicas para determinar la capacidad antimicrobiana de aceites esenciales.
3. Determinación la actividad antifúngica *in vitro* de los aceites esenciales e hidrolatos obtenidos de plantas aromáticas cultivadas en Aragón.
4. Determinación de quimiotipos y evaluación de la capacidad antifúngico de compuestos bioactivos seleccionados a partir de la composición molecular de los aceites esenciales.
5. Establecer que aceites esenciales tienen una mayor capacidad de inhibición de hongos fitopatógenos de fruta de pepita, y establecer qué metodología es más adecuada para un posterior ensayo *in vivo*.

## 5 DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA EMPLEADA

### 5.1 Diseño experimental

Para la elaboración de este TFG, se ha evaluado la eficacia antifúngica de 4 aceites esenciales frente a 5 hongos fitopatógenos que afectan a manzana durante su periodo de conservación postcosecha. Para ello, se han realizado diferentes ensayos: de difusión de AEs en disco, dilución de AEs e hidrolato en medio sólido Agar Patata Dextrosa (PDA) y en medio líquido Caldo Patata Dextrosa (PDB), de actividad volátil, y de germinación de esporas en agar DRBC. También se ha analizado el quimiotipo de los AEs, y se ha determinado capacidad antifúngica de compuestos bioactivos mayoritarios. La Figura 7 resume el trabajo experimental realizado en este TFG.



**Figura 7.** Representación gráfica del diseño experimental llevado a cabo en este trabajo. Creado con BioRender.

### 5.2 Obtención de aceites esenciales de plantas aromáticas

El material vegetal de *O. virens* (ORI), *S. officinalis* (SAL) y *M. rotundifolia* (MEN) se obtuvo de una plantación de Bolea (Huesca). Los AEs e hidrolatos se extrajeron de forma semi-industrial por arrastre de vapor en una planta de destilación industrial que hay en el CITA, equipada con una cámara de destilación de 100 Kg y un vaso de 500 L. La extracción se realizó en un rango de presión de vapor de 0,5 a 1,0 bar. El agua recolectada tras decantar el AE se filtró obteniendo el residuo acuoso o hidrolato (Julio Torres, 2017). El AE de *V. officinalis* (VAL) fue adquirido comercialmente en la tienda online ESSENCIALES, aceites y esencias.

### 5.3 Aislamiento y mantenimiento de cepas fúngicas

Las especies de hongos seleccionadas para este trabajo fueron *Monilinia fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Rhizopus stolonifer* y *Penicillium expansum*. Las cepas utilizadas fueron cedidas por parte del Grupo de Patología Postcosecha del Instituto de Investigación y

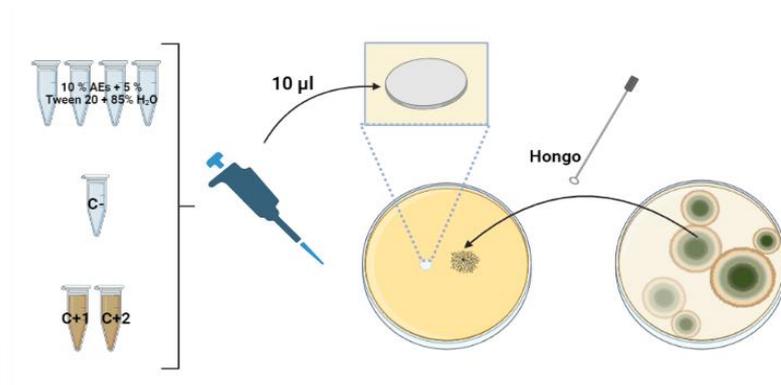
Tecnología Agroalimentaria (IRTA). Una vez recibidas fueron sembradas por quintuplicado en placa de Petri y se mantuvieron a 21°C durante todo el ensayo para tener siempre cultivo puro.

#### 5.4 Determinación capacidad antifúngica

Para establecer la capacidad antifúngica de los AEs frente a los cinco hongos se llevaron a cabo seis metodologías diferentes que se describen a continuación:

##### 5.4.1 Método de difusión de aceites esenciales en disco

Se prepararon 5 disoluciones de 100 µl cada una que contenían: 10 % de AE, 5 % de Tween 20 y 85 % de agua estéril. En placas de Petri con PDA, preparadas con 24 h de antelación, se inocularon los cinco hongos con un asa de siembra, y a 2 cm del punto de siembra, se colocaron los discos de papel de 6 mm. En diferentes discos, se añadieron 10 µl de cada disolución de AE homogenizada previamente. Se utilizó una disolución con 50 µl Tween 20 + 950 µl de agua estéril como control negativo (C-), y dos disoluciones con 100 µl de los fungicidas Tiram ó Ciproconazol + 900 µl de agua estéril como controles positivos (C+) (Figura 8) (Venturini, Blanco y Oria, 2002). Los C+ y C- se realizaron en el resto de las determinaciones de capacidad antifúngica.

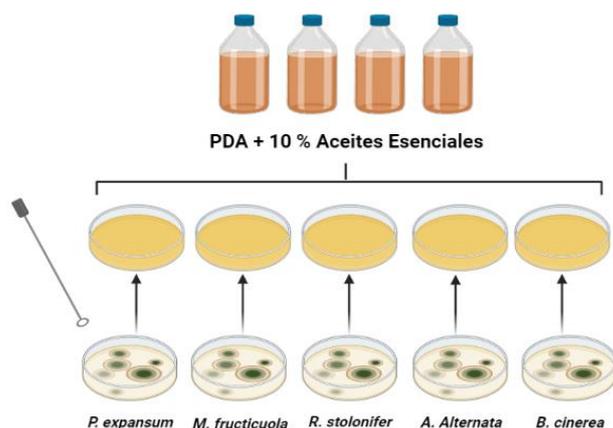


**Figura 8.** Representación gráfica del método de difusión de los cuatro AEs en discos de papel utilizando como medio de cultivo Agar Dextrosa Patata (PDA). Creado con BioRender.

Tras la inoculación de patógeno y AE, las placas se incubaron a 21 °C/144 h, midiendo el diámetro de crecimiento de los hongos cada 24 horas utilizando un pie de rey.

##### 5.4.2 Método de dilución de aceites esenciales en medio de cultivo PDA

Se prepararon diferentes frascos de PDA, y tras su autoclavado, se añadieron los diferentes AEs a una concentración del 10 % (Figura 9). Debido a la gran inmiscibilidad existente, fue necesario utilizar Tween 20 para evitar esa separación de fases. (Moumni et al., 2021)

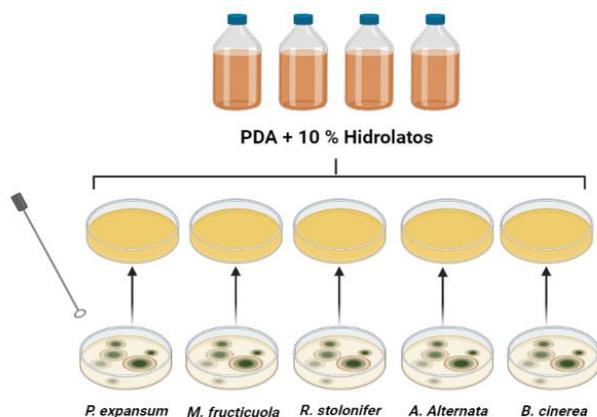


**Figura 9.** Representación gráfica del método de dilución de los cuatro AEs en el medio de cultivo Agar Dextrosa Patata (PDA). Creado con BioRender.

Tras servir el medio, se inoculó cada cepa con asa de siembra y se incubaron (21 °C / 96 h), midiendo el diámetro de crecimiento de los hongos cada 24 horas utilizando un pie de rey.

#### 5.4.3 Método de dilución de hidrolatos en medio de cultivo PDA

El hidrolato generado durante la destilación de los AEs, se mezcló con PDA a una concentración del 10 % (Figura 10) (Moumni et al., 2021).



**Figura 10.** Representación gráfica del método de dilución de los cuatro Hidrolatos en el medio de cultivo Agar Dextrosa Patata (PDA). Creado con BioRender.

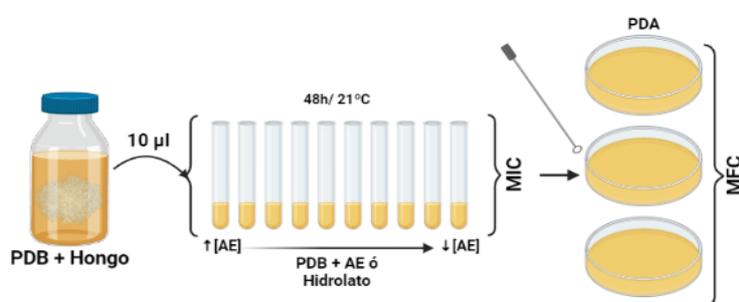
Al ser soluciones principalmente acuosas, no existen fenómenos de inmiscibilidad y las mezclas son mucho más sencillas. Una vez solidificados, se realizó la siembra de cada cepa mediante el asa de siembra, y su posterior incubación (21 °C / 96 h). Los resultados se obtuvieron midiendo los diámetros de crecimiento con el pie de rey.

#### 5.4.4 Método de dilución en PDB

El medio líquido PDB se empleó para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC), concentración mínima de un fármaco que inhibe el crecimiento de un organismo tras su periodo de incubación, y la concentración mínima fungicida (MFC), conocida como la concentración

mínima de un compuesto antifúngico que impida el crecimiento de un organismo tras cultivarlo en un medio libre y nutritivo (Andrews, 2001).

Para ambas determinaciones, las concentraciones elegidas de AEs fueron: 1 %, 0,5 %, 0,25 %, 0,125 % y 0,0625 %, que se ensayaron frente a *M. fructicola*, *B. cinerea* y *A. alternata*. Para el caso de los hidrolatos las concentraciones elegidas fueron: 100 %, 50 % y 25 %, que se ensayaron frente a *M. fructicola*, *R. stolonifer* y *P. expansum*. Una vez inoculados los tubos, se incubaron a 21°C / 7 días, controlando visualmente el crecimiento cada 24 horas. El MIC se determinó seleccionando la primera dilución inmediatamente anterior a la que se observó crecimiento fúngico. En caso de crecimiento en todos los tubos, se eligieron aquellos con una mayor concentración de AE/hidrolato (Sajid et al., 2020).

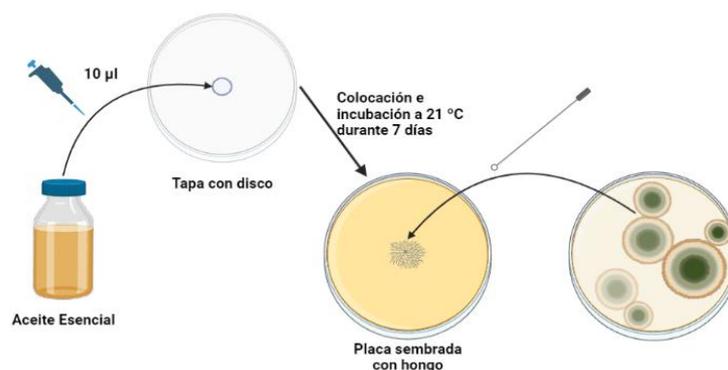


**Figura 11.** Representación gráfica del método de dilución en el Caldo Dextrosa Patata (PDB) para la determinación del MIC y MFC de cada AE o hidrolato contra los hongos estudiados, mediante la utilización de distintas concentraciones. Creado con BioRender.

Para determinar el MFC, se realizó una siembra en superficie por agotamiento de aquellas diluciones en las que no se observó crecimiento, más la primera dilución que sí, en placas de Petri con PDA y se incubaron a 21 °C/7 días observando si existía o no crecimiento (Basak & Guha, 2017).

#### 5.4.5 Método de actividad volátil

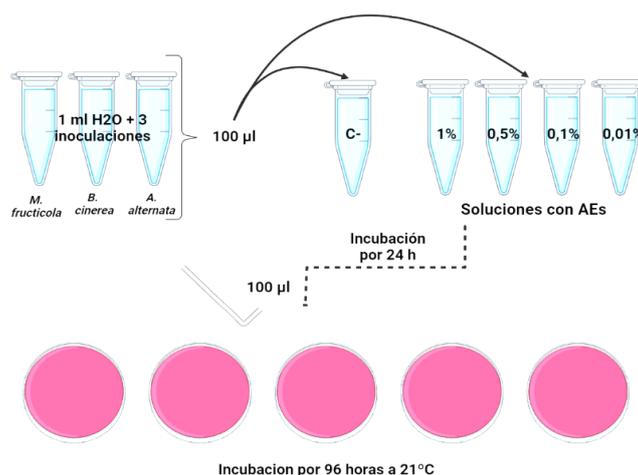
Para este ensayo se diseñó una nueva metodología. Para ello, se utilizaron placas de Petri con PDA a las que se les colocó en la tapa un disco de papel con 10 µl de cada AEs y posteriormente se sembraron las cepas fúngicas (Figura 12)(el Ouadi et al., 2017). Esto nos permitió determinar si existe efecto inhibitorio debido a los compuestos volátiles generados de los AEs, generando una especie de atmósfera protectora. Tras la inoculación de los hongos con un asa de siembra, se incubaron a 21°C / 144 horas, midiendo los diámetros de crecimiento cada 24 horas con un pie de rey para observar su cinética de crecimiento.



**Figura 12.** Representación gráfica del método de inoculación de los cuatro AEs en discos de papel colocados en la tapa de las placas donde se realiza la siembra e incubación de los hongos a estudiar. Creado con BioRender.

#### 5.4.6 Germinación de esporas en cultivo DRBC

Para este ensayo, se diseñó una nueva metodología en la que se preparó una disolución madre de *M. fructicola*, *B. cinerea* y *A. alternata* en microtubos, para obtener una solución concentrada de esporas de cada hongo.



**Figura 13.** Representación gráfica del método de generación de esporas de *M. fructicola*, *B. cinerea* y *A. alternata* utilizando el medio de cultivo DRBC. Creado con BioRender.

De cada disolución madre, se pipetearon 100 µl a otros microtubos con 900 µl de H<sub>2</sub>O destilada estéril como control negativo, y con 900 µl de AEs a concentraciones de 1 %, 0,5 %, 0,1% y 0,01 % (con H<sub>2</sub>O destilada estéril como diluyente). Se incubaron a 21 °C/ 24 h, y se sembraron 100 µl por extensión en superficie con asa de Digrafsky en DRBC (medio selectivo que restringe el desarrollo colonial de hongos, facilitando su recuento). Se incubaron a 21 °C/ 96 h (Figura 13).

#### 5.5 Determinación de la capacidad antifúngica de los compuestos bioactivos mayoritarios presentes en los AEs

Para ello, se determinó el quimiotipo de cada AE, y previamente a establecer el efecto inhibitorio de las diferentes moléculas que componen los aceites esenciales, se realizó una búsqueda

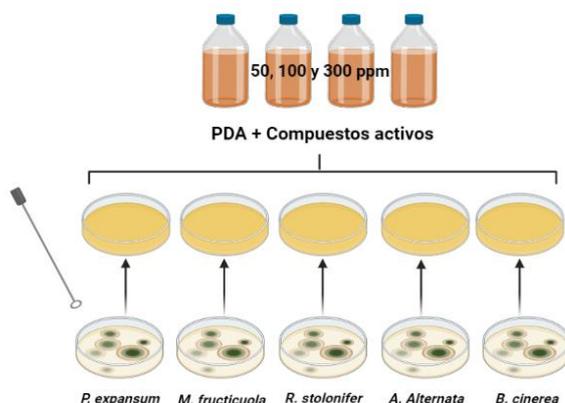
bibliográfica para seleccionar qué moléculas, de las mayoritarias, mostraron una mayor capacidad antifúngica en otros estudios.

### 5.5.1 Determinación quimiotípica de aceites esenciales

La determinación quimiotípica de los AEs utilizados se analizó mediante cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS) utilizando un cromatógrafo de gases Agilent modelo 5973N acoplado a un detector de masas con fuente de ionización por impacto electrónico (IE) a 70eV. Se utilizó una columna capilar HP-1 de Hewlett-Packard: 25 m de largo, 200  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y 0.2  $\mu\text{m}$  de espesor de fase. Las condiciones utilizadas fueron: split (30:1), temperatura del inyector 260°C, temperatura de la columna 70°C, calentando hasta 270°C a 4°C/min. Los espectros de masas y el tiempo de retención se utilizaron para identificar los compuestos comparando con la base de datos Wiley (Wiley 275 Mass Spectra Database, 2001) mientras que para la cuantificación se han utilizado los % del área de los picos obtenidos en los cromatogramas (Julio Torres, 2017).

### 5.5.2 Determinación de la capacidad antifúngica de moléculas activas por difusión en agar

Los compuestos seleccionados fueron Linalool, Timol,  $\beta$ -pineno, Acetato de bornilo, Canfeno y Carvacrol. Se realizó su difusión en PDA a concentraciones de 50, 100 y 300 ppm (Figura 14). Previamente a la adición de compuestos, se autoclavó el PDA y se atemperó; los compuestos sólidos (Timol y Canfeno), se disolvieron utilizando etanol al 95 % (Elshafie et al., 2015). Tras servir el PDA+AE en placas de Petri, y una vez sólido, se realizó la siembra de los cinco hongos con el asa de siembra y se dejaron incubando las placas a 21 °C / 96 horas, observándose cada 24 horas.



**Figura 14.** Representación gráfica del método de determinación de la capacidad antifúngica de algunos de los compuestos activos de los AEs. Creado con BioRender.

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Determinación capacidad antifúngica

#### 6.1.1 Método de difusión de aceites esenciales en disco

Los resultados obtenidos (Tabla 1) muestran que *O. virens* presentó un mayor efecto inhibitorio frente al crecimiento de prácticamente todos los hongos. Los patógenos *M. fructicola* y *A. alternata* presentaron sensibilidad frente a todos los aceites, a excepción de *M. rotundifolia*, para el que *M. fructicola* presenta resistencia. *S. officinalis* es el único de los aceites que presenta efectividad frente a *B. cinerea*. Por último, ninguno de los AEs presentó apenas efecto frente a *R. stolonifer* y *P. expansum*, aunque sí hubo cierta inhibición por parte de *O. virens* frente a *P. expansum*. En el resto de los AEs ensayados, el desarrollo fúngico fue muy similar, en cinética de crecimiento y morfología, al del control negativo, sugiriendo una escasa capacidad antifúngica bien por la concentración utilizada, o bien por el método aplicado.

**Tabla 1.** Efecto inhibitorio del método de difusión en disco de AEs (10%) sobre el crecimiento de los hongos tras 96 horas a 21 °C. X: no hay crecimiento. Resultados expresados en mm.

144 h	C-	C+1	C+2	AE ORI	AE MEN	AE SAL	AE VAL
<i>A. alternata</i>	12,45	12,33	6,32	10,24	11,94	7,92	6,87
<i>B. cinerea</i>	45,42	6,1	X	28,02	28,65	21,53	22,13
<i>P. expansum</i>	45,68	34,18	12,35	24,69	32,64	48,36	26,47
<i>M. fructicola</i>	38,42	8,84	X	5,67	X	6,91	X
<i>R. stolonifer</i>	52	43,45	49,11	43,75	42,76	44,26	43,61

Mironescu & Georgescu (2008) determinaron que el AE de menta tiene una baja capacidad inhibitoria para las especies de *Penicillium* spp. y *Alternaria* spp. Por otro lado, El Khetabi et al. (2021), utilizando concentraciones de 100 µl/ml de menta y orégano, redujeron el crecimiento micelial de las especies de *Monilinia* spp. con gran efectividad, siendo estos resultados muy similares a los obtenidos en nuestro ensayo. Cabe destacar que además de estos AEs, otros aceites como *M. officinalis* son capaces de inhibir el desarrollo, sobre todo, de *B. cinerea* y *P. expansum* (el Ouadi et al., 2017), resultado que puede ser de utilidad para futuros ensayos.

#### 6.1.2 Método de dilución de aceites esenciales en medio de cultivo PDA

Dados los resultados obtenidos por la técnica anterior, se decidió aumentar la concentración de AE para descartar aquellos aceites que no mostrasen efecto inhibitorio total por dilución en agar. Los resultados obtenidos por esta técnica mostraron que una concentración del 10 % de AEs inhibió totalmente el crecimiento en todos los hongos (Tabla 2), a excepción del aceite esencial de *S. officinalis*, que solo inhibió totalmente el crecimiento de *M. fructicola*.

**Tabla 2.** Efecto inhibitorio del método de dilución en agar de AEs (10 %) sobre el crecimiento de los hongos tras 96 horas a 21 °C. X: no hay crecimiento. Resultados expresados en mm.

96 h	AE ORI	AE MEN	AE SAL	AE VAL
<i>M. fructicola</i>	X	X	X	X
<i>B. cinerea</i>	X	X	12,58	X
<i>A. alternata</i>	X	X	7,46	X
<i>R. stolonifer</i>	X	X	28,92	X
<i>P. expansum</i>	X	X	10,03	X

Vitoratos et al. (2013) observaron que el AE de orégano es capaz de inhibir tanto la germinación de esporas como el radio de crecimiento de *B. cinerea*, aplicando 0,02 µl/ml (0,002%), concentración mucho más ínfima que nuestro 10% (100 µl/ml), esta diferencia de resultados puede deberse a la técnica aplicada en este ensayo, ya que su procedimiento no resulta claramente explicado. Por el contrario, concentraciones de 500 y 250 µl/ml utilizadas para menta, orégano y salvia por Ozcakmak et al. (2016) frente a *P. verrucosum* son similares a las nuestras y muestran resultados de inhibición parecidos. Otros autores también han demostrado la baja capacidad de salvia frente a microorganismos como *R. stolonifer* a concentraciones incluso más bajas de 0,36 µl/ml (Alizadeh-Salteh et al., 2010). Esto demuestra la mayor eficacia que presentan los AEs aplicados directamente respecto a la técnica anterior.

### 6.1.3 Método de dilución de hidrolatos en medio de cultivo PDA

Se observó que la utilización de hidrolatos a concentraciones del 10 % también proporcionaban una buena inhibición del crecimiento, pero en menor medida que utilizando un 10% de AEs (Tabla 3). El hidrolato de *M. rotundifolia* (MEN), fue el que proporcionó una mayor efectividad inhibiendo casi totalmente el crecimiento de los hongos. Seguidamente nos encontramos con el hidrolato de *O. virens* (ORI), con el que se consiguió inhibir el crecimiento de *M. fructicola* y también reducir el crecimiento en gran medida de *B. cinerea* y *A. alternata*. Por el contrario, *S. officinalis* (SAL) apenas tuvo efectividad frente a los hongos, que incluso tuvieron un desarrollo similar al control negativo o superior. Este último efecto lo podemos observar en *R. stolonifer* y *P. expansum*, donde se apreció una mayor esporulación en salvia respecto a los controles.

**Tabla 3.** Efecto inhibitorio del método de dilución en agar de hidrolatos (10 %) sobre el crecimiento de hongos tras 96 horas a 21 °C. Cont.: Contaminación. X: no hay crecimiento. Resultados expresados en mm.

96 h	C -	H ORI	H MEN	H SAL
<i>R. stolonifer</i>	35	11,91	8,59	35
<i>P. expansum</i>	41,22	44,41	7,23	-
<i>B. cinerea</i>	45,78	9,81	X	36,11
<i>A. alternata</i>	27,56	6,51	X	22,47
<i>M. fructicola</i>	27,14	X	X	Cont.

La aplicación de hidrolatos ya se ha visto comprobada en otros ensayos por parte de Ramírez González et al. (2016), en los cuales se comparaba la capacidad antifúngica de los hidrolatos frente a los AEs de clavo, canela y pimienta. Se puede apreciar que la utilización de un 30 % de cada hidrolato presenta resultados de inhibición diferentes, siendo unos más efectivos que otros, como ocurre en nuestro caso con la aplicación de un 10%. Cabe recalcar que este tipo de ensayos todavía necesitan ser aplicados en más ocasiones para poder tener más referencias.

#### 6.1.4 Método de dilución en caldo PDB

##### Determinación del MIC y MFC de los Aceites Esenciales

Respecto a la concentración mínima inhibitoria (MIC), de forma general, se puede ver (Tabla 4) que la concentración más habitual y efectiva de AEs que consigue inhibir el crecimiento de los hongos es del 0,25%. Pero también cabe destacar que se han observado ciertas excepciones; *M. fructicola* es inhibido a concentraciones del 0,125 % de *O. virens* (ORI) y *M. rotundifolia* (MEN), *B. cinerea* presenta una mayor resistencia, sobre todo frente *S. officinalis*, necesitando un 0,5 % para inhibirlo. Mientras que *A. alternata* es el organismo más resistente de los tres, y se necesitaron concentraciones muy superiores de *O. virens* y *S. officinalis* (1%).

**Tabla 4.** Concentración mínima inhibitoria en medio líquido de AEs. Rojo (-): no presenta crecimiento. Verde (+): presenta crecimiento.

Especie Hongo	A.E.	1 %	0,5 %	0,25 %	0,125 %	0,0625 %	MIC (%)
<i>M. fructicola</i>	ORI	-	-	-	-	+	0,125
	MEN	-	-	-	-	+	0,125
	SAL	-	-	-	+	+	0,25
	VAL	-	-	-	+	+	0,25
<i>B. cinerea</i>	ORI	-	-	-	+	+	0,25
	MEN	-	-	-	+	+	0,25
	SAL	-	-	+	+	+	0,5
	VAL	-	-	-	+	+	0,25
<i>A. alternata</i>	ORI	-	+	+	+	+	1
	MEN	-	-	-	+	+	0,25
	SAL	-	+	+	+	+	1
	VAL	-	-	-	+	+	0,25

En relación a la concentración mínima fungicida (MFC), la tabla 5 indica que las concentraciones que impiden el crecimiento de *M. fructicola* son del 0,25 % para todos los aceites a excepción de *M. rotundifolia* que necesita un porcentaje menor. Asimismo, *B. cinerea* de forma general también necesitaría concentraciones del 0,25 % en la mayoría de los AEs para poder evitar su

crecimiento. Por último, en el caso de *A. alternaria* cabe destacar que las concentraciones necesarias para impedir el crecimiento de este organismo coinciden con el MIC.

**Tabla 5.** Concentración mínima fungicida en medio sólido de AEs. Rojo (-): no presenta crecimiento. Verde (+): presenta crecimiento.

Especie Hongo	A.E.	1 %	0,5 %	0,25 %	0,125 %	0,0625 %	MFC (%)
<i>M. fructicola</i>	ORI	-	-	-	+	+	0,25
	MEN	-	-	-	-	+	0,125
	SAL	-	-	-	+	+	0,25
	VAL	-	-	-	+	+	0,25
<i>B. cinerea</i>	ORI	-	-	-	+	+	0,25
	MEN	-	-	-	+	+	0,25
	SAL	-	-	+	+	+	0,5
	VAL	-	-	-	+	+	0,25
<i>A. alternaria</i>	ORI	-	+	+	+	+	1
	MEN	-	-	-	+	+	0,25
	SAL	-	+	+	+	+	1
	VAL	-	-	-	+	+	0,25

De acuerdo con Vitoratos et al. (2013) y Đorđević et al. (2011), los AEs de orégano y menta son capaces de inhibir el crecimiento micelial por un lado de *B. cinerea* con un MIC de 0,02 µl/ml; y por otro lado de *A. alternata* a concentraciones de 0,3 µl/ml. En nuestro caso, se necesitaron 2,5 µl/ml (0,25%) para inhibir o impedir el crecimiento, siendo resultados poco similares a los de estos ensayos. Por otro lado, la menta también es capaz de inhibir completamente el crecimiento de *M. fructicola*, *B. cinerea* y *A. alternata* a concentraciones de 0,05 µg/ml, 3 µl/ml y 0,4 µl/ml respectivamente (Kalemba & Synowiec, 2019), resultados algo más cercanos a los obtenidos en nuestro ensayo (1,25, 2,5 y 3 µl/ml). Incluso, autores como Venturini, Blanco y Oria, (2002) han podido establecer el MIC de componentes activos como el timol, eugenol y citral, algo que también puede ser aplicado en un futuro. Esto nos indica una vez más que, aunque concentraciones inferiores a las utilizadas permiten inhibir el desarrollo de los hongos eficazmente, esto depende fundamentalmente del AE empleado y sus componentes.

#### **Determinación del MIC y MFC de los Hidrolatos**

En la determinación del MIC (Tabla 6), únicamente se observó cierta inhibición de los tres hongos frente a el hidrolato de *M. rotundifolia* utilizado a concentraciones muy elevadas, del 100 % para *R. stolonifer* y *P. expansum*; y del 50 % para *M. fructicola*.

**Tabla 6.** Concentración mínima inhibitoria en medio líquido de hidrolatos. Rojo (-): no presenta crecimiento. Verde (+): presenta crecimiento.

Especie Hongo	H	100 %	50 %	25 %	MIC (%)
<i>M. fructicola</i>	ORI	+	+	+	0
	MEN	-	-	+	50
	SAL	+	+	+	0
<i>P. expansum</i>	ORI	+	+	+	0
	MEN	-	+	+	100
	SAL	+	+	+	0
<i>R. stolonifer</i>	ORI	+	+	+	0
	MEN	-	+	+	100
	SAL	+	+	+	0

Respecto al resultado de MFC (Tabla 7), únicamente impidió el crecimiento de *M. fructicola* *O. virens* a una concentración del 100%, y *M. rotundifolia* al 50%; *P. expansum* fue inhibido por *M. rotundifolia* a una concentración del 100 %; y no hubo ningún hidrolato que inhibiese el crecimiento de *R. stolonifer*.

**Tabla 7.** Concentración mínima fungicida en medio sólido de hidrolatos. Rojo (-): no presenta crecimiento. Verde (+): presenta crecimiento.

Especie Hongo	H	100 %	50 %	25 %	MFC (%)
<i>M. fructicola</i>	ORI	-	+	+	100
	MEN	-	-	+	50
	SAL	+	+	+	0
<i>P. expansum</i>	ORI	+	+	+	0
	MEN	-	+	+	100
	SAL	+	+	+	0
<i>R. stolonifer</i>	ORI	+	+	+	0
	MEN	+	+	+	0
	SAL	+	+	+	0

Marino et al. (2020) han observado actividad antibacteriana y antifúngica del hidrolato de *Coridothymus capitatus* frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Además, otros hidrolatos como el de *Satureja hortensis*, *Thymus capitatus* y *Daucus carota* mostraron efecto inhibitorio sobre *Alternaria mali*, *P. italicum* y *P. expansum* y *B. cinerea*, respectivamente (Aćimović et al., 2020). Saha & Basak (2020) también observaron actividades antibacterianas y fungicidas, lo que hace visible la gran capacidad que tienen estos extractos frente a una amplia variedad de microorganismos.

### 6.1.5 Método de actividad volátil

La Tabla 8 presenta los resultados obtenidos en este ensayo. *M. fructicola* fue inhibida por los cuatro AEs, mientras que *B. cinerea* y *A. alternata* únicamente fueron inhibidas por *O. virens* (ORI) y *M. rotundifolia* (MEN), aunque el resto de los aceites esenciales ralentizaron su desarrollo. Por último, *R. stolonifer* y *P. expansum* se desarrollaron sin dificultad en presencia de todos los AEs a excepción de *M. rotundifolia*; *Rhizopus* presentó una ligera inhibición, y *Penicillium* fue inhibido completamente.

**Tabla 8.** Efecto inhibitorio del Método de Actividad Volátil tras 144 horas a 21 °C. Cont.: Contaminación. X: no hay crecimiento. Marrón y azul: hay esporulación. Blanco/a: no hay esporulación. Resultados expresados en mm.

144 horas	C-	AE ORI	AE MEN	AE SAL	AE VAL
<i>M. fructicola</i>	Cont.	X	X	X	X
<i>B. cinerea</i>	52 (Marrón)	39	X	52 (Blanca)	52 (Blanca)
<i>A. alternaria</i>	41,85	10,65	2	21,99	24,17
<i>R. stolonifer</i>	52	17,02	26,1	52	52
<i>P. expansum</i>	52 (Azul)	41 (Azul)	X	40 (Blanco)	36 (Blanco)

El efecto inhibitorio de los compuestos volátiles ya ha sido observado anteriormente por otros autores como Alizadeh-Salteh et al. (2010), en cuyo caso utilizaron el AE de salvia para comprobar su efectividad frente a *R. stolonifer*, obteniendo una inhibición total del crecimiento. En otros ensayos se han utilizado hasta tres discos con 3 µl cada uno de los AEs de menta y orégano frente al mismo organismo, siendo la menta la más eficaz (Yan et al., 2020). Asimismo, la fracción volátil de aceites esenciales como *M. officinalis* también han mostrado inhibición total del crecimiento frente a *B. cinerea* (40 µl/disco), *P. expansum* (80 µl/disco) y *R. stolonifer* (160 µl/disco) (el Ouadi et al., 2017), lo que puede servir de orientación para futuros ensayos tanto por las concentraciones utilizadas, como por el aceite esencial empleado. Incluso, otros autores como Venturini, Blanco y Oria, (2002) han aplicado esta metodología utilizando compuestos bioactivos como el timol, eugenol y citral, con resultados inhibitorios no muy significativos, resultado relevante en el diseño de futuros ensayos.

### 6.1.6 Germinación de esporas en cultivo DRBC

Los resultados obtenidos tras 96 horas de incubación mostraron que *B. cinerea* fue inhibido con concentraciones del 1 % para *O. virens* y *M. rotundifolia* (Tablas 9 y 10).

**Tabla 9.** Recuentos expresados en Log UFC de *M. fructicola*, *B. cinerea* y *A. alternata* tras 96 horas de incubación en cultivo DRBC en presencia de *O. virens*.

96 h [ORI]	C -	1 %	0,5 %	0,1 %	0,01 %
<i>M. fructicola</i>	2,6	3,0	2,7	3,2	2,8
<i>B. cinerea</i>	4,5	2,3	4,1	4,2	4,1
<i>A. alternata</i>	4,4	4,0	4,2	4,4	4,1

**Tabla 10.** Recuentos expresados en Log UFC de *M. fructicola*, *B. cinerea* y *A. alternata* tras 96 horas de incubación en cultivo DRBC en presencia de *M. rotundifolia*. (-): nulo.

96 h [MEN]	C -	1 %	0,5 %	0,1 %	0,01 %
<i>M. fructicola</i>	2,6	2,3	-	3,2	3,0
<i>B. cinerea</i>	4,5	2,7	4,5	4,6	4,2
<i>A. alternata</i>	4,4	-	4,4	4,7	4,2

Los otros dos aceites esenciales no presentaron diferencias destacables a ninguna concentración comparados con el control negativo (Tablas 11 y 12). *M. fructicola* podría presentar inhibición frente a concentraciones del 0,5 %, ó 1 %, pero se necesitaría realizar más ensayos para obtener resultados concluyentes; en este caso el resultado del control negativo no es coherente dado que presenta recuentos menores que las concentraciones de AEs a 0,1% y 0,01%.

**Tabla 11.** Recuentos expresados en Log UFC de *M. fructicola*, *B. cinerea* y *A. alternata* tras 96 horas de incubación en cultivo DRBC en presencia de *S. officinalis*. (-): nulo.

96 h [SAL]	C -	1 %	0,5 %	0,1 %	0,01 %
<i>M. fructicola</i>	2,6	2,5	3,4	3,8	3,9
<i>B. cinerea</i>	4,5	4,7	3,9	4,7	4,7
<i>A. alternata</i>	4,4	4,2	4,2	4,1	3,7

**Tabla 12.** Recuentos expresados en Log UFC de *M. fructicola*, *B. cinerea* y *A. alternata* tras 96 horas de incubación en cultivo DRBC en presencia de *V. officinalis*.

96 h [VAL]	C -	1 %	0,5 %	0,1 %	0,01 %
<i>M. fructicola</i>	2,6	2,3	2,0	3,9	3,8
<i>B. cinerea</i>	4,5	4,7	4,7	4,4	3,4
<i>A. alternata</i>	4,4	4,4	4,3	4,3	4,0

Por último, *A. alternata* no tuvo una inhibición significativa en la inactivación de esporas por parte de ningún AE. Generalmente, con este tipo de técnicas se utilizan utensilios como la cámara de Neubauer para el recuento de las esporas germinadas. Basak (2018) aplicó el AE de betel a concentraciones de 0,5-0,6 µl/ml consiguiendo una inhibición total de la germinación de esporas en los hongos *P. expansum* y *Aspergillus flavus*. Otro estudio realizado anteriormente también por Basak & Guha (2017), aplicado a los mismos microorganismos y usando el mismo aceite, muestra inhibición de germinación de esporas con 15 µl de AE por ml. Las concentraciones de AEs utilizadas en este TFG han sido más elevadas, no consiguiéndose resultados tan efectivos. La búsqueda de AEs de otras plantas alternativas de fuera de Aragón podría plantearse para futuros ensayos.

## 6.2 Determinación de la capacidad antifúngica de los compuestos activos de los aceites esenciales

### 6.2.1 Determinación quimiotípica de aceites esenciales

Los resultados obtenidos de la determinación de quimiotipos por GC-MS se muestran en los Anexos. El método ha sido capaz de detectar entre 14 y 40 moléculas distintas en los 3 AEs analizados; el listado de compuestos de AE de *V. officinalis* presentado, venía determinado directamente por la propia casa comercial.

*O. virens* presentó como compuestos mayoritarios Carvacrol (65 %),  $\gamma$ -Terpineno (5,86%),  $\rho$ -Cimeno (3,63%), Sabineno (2,75%) y Timol (2,32%). De entre los cuales, Carvacrol y Timol son aquellos que han demostrado en diferentes estudios una gran capacidad antifúngica frente a las especies *Monilinia* y *B. cinerea*, y podrían ser alternativas a los fungicidas convencionales (Elshafie et al., 2015; Zhang et al., 2019). Incluso, otros autores también han demostrado que el Carvacrol tiene una gran eficacia frente a *R. stolonifer*, algo de gran importancia debido a su gran persistencia (Zhou et al., 2019). Sin embargo, Marei y Abdelgaleil (2018) han estudiado la actividad de monoterpenos como el  $\rho$ -Cimeno, mostrando que a pesar de que tiene cierta efectividad antifúngica, necesita una mayor proporción para conseguirla en microorganismos como *B. cinerea*.

Respecto a *S. officinalis*, su quimiotipo (Anexo I) ha mostrado que los compuestos mayoritarios de este AE son  $\alpha$ -Tuyona (27,3%), 1,8-Cineol (13,5%) y Viridiflorol (8,77%); sin embargo, existen otros componentes en menor proporción como son el  $\beta$ -Pino (3,9%), con el que otros autores han indicado que en mayores proporciones puede ser bastante efectivos en condiciones in vitro frente a *B. cinerea* y *R. stolonifer* (Hadian et al., 2008).

En el caso de *V. officinalis*, al haber sido adquirido comercialmente, existe una menor cantidad de moléculas en su quimiotipo, siendo los compuestos mayoritarios Acetato de bornilo (36,38%), Canfeno (26,65%) y  $\alpha$ -Pino (6,83%).  $\alpha$ -Pino (principalmente) y Acetato de bornilo tienen la mayor actividad antifúngica reduciendo la capacidad de germinación de esporas, e incluso, alteran las membranas celulares y la morfología de microorganismos como *B. cinerea* (Rguez et al., 2020).

Por último, el quimiotipo de *M. rotundifolia* destaca por estar compuesto principalmente por Piperitenona (53,39%), Oxido de piperitenona (22,83%) y Limoneno (5,60%). Sin embargo, aunque el primero suponga más del 50% de la composición total de la menta, se ha comprobado que no tiene una actividad antifúngica significativa frente a microorganismos como *B. cinerea* y

*P. digitatum*; al contrario que el Limoneno y Linalool, cuya concentración es de 1,21% en el ensayo de este TFG, que si han demostrado inhibir la germinación de esporas en microorganismos como *P. chrysogenum* (Umagiliyage et al., 2017).

Por todo ello, algunas de las moléculas de estos quimiotipos han sido seleccionadas para utilizarse en nuestro ensayo sobre capacidad antimicrobiana, y que pueden verse reflejadas en la tabla 13.

### 6.6.2. Determinación de la capacidad antifúngica de moléculas activas por difusión en agar

El análisis de quimiotipos de los AEs ha determinado que moléculas son más abundantes, y la búsqueda bibliográfica ha permitido determinar cuáles de ellas poseen una capacidad antifúngica significativa. En base a ello, se han seleccionado las moléculas utilizadas en este ensayo. La Tabla 13 presenta los resultados obtenidos en otros estudios de algunas de las moléculas más importantes que conforman los distintos AEs empleados en este TFG.

**Tabla 13.** Resultado de la búsqueda bibliográfica para la selección de moléculas con capacidad antifúngica.

Compuesto	Microorganismo	Concentración	% inhibición	Referencia
Timol	<i>M. fructicola</i>	100 ppm	100 %	(Camele et al., 2012; Tsao & Zhou, 2000; Perina et al., 2014)
	<i>B. cinerea</i>	100 ppm	100 %	
	<i>A. alternata</i>	250 ppm	96 %	
	<i>P. expansum</i>	250 ppm	88,3 %	
Carvacrol	<i>M. fructicola</i>	100 ppm	100%	(Tsao & Zhou, 2000)
	<i>B. cinerea</i>			
$\beta$ -Pinoeno	<i>P. expansum</i>	150 ppm	42 %	(Camele et al., 2012)
	<i>B. cinerea</i>		50 %	
Acetato de bornilo	<i>B. cinerea</i>	500 ppm	100%	(Rguez et al., 2020)
Canfeno	<i>B. cinerea</i>	150 ppm	47%	(Camele et al., 2012)
	<i>P. expansum</i>	250 ppm	29,42%	
	<i>R. stolonifer</i>	250 ppm	15 %	
Linalool	<i>B. cinerea</i>	250 ppm	83%	(Tsao & Zhou, 2000; Marei et al., 2012)
	<i>P. digitatum</i>	136,7 ppm	50 %	

A una concentración de 50 ppm, el efecto de inhibición de crecimiento (Tabla 14) fue muy reducido para casi todos los compuestos, con excepción del timol y  $\beta$ -pinoeno que sí obtuvieron cierto efecto inhibitorio. Para todos los casos, sí se detectó que aunque no hubiera una inhibición total aparente, sí se ralentizó la velocidad del crecimiento.

**Tabla 14.** Efecto inhibitorio de compuestos activos a una concentración de 50 ppm tras 96 horas a 21 °C. Cont.: Contaminación. X: no hay crecimiento. (Azul): hay esporulación. (Blanco): no hay esporulación. Resultados expresados en mm.

96 h	C-	Canfeno	Timol	B-pinoeno
<i>M. fructicola</i>	29,04	Cont.	X	X
<i>B. cinerea</i>	52	13,12	X	9,43
<i>A. alternaria</i>	27,43	12,78	X	14,54
<i>R. stolonifer</i>	52	21,14	6,07	7,35
<i>P. expansum</i>	52 (Azul)	52 (Blanco)	5,74	8,91

Al aumentar la dosis a 100 ppm, los compuestos que presentaron mejores resultados fueron carvacrol y linalool, dando lugar a una inhibición total del crecimiento. Por el contrario, el canfeno fue el único donde se presentó crecimiento por parte de todos los hongos. Además la cinética de crecimiento también se vio especialmente afectada (Tabla 15).

**Tabla 15.** Efecto inhibitorio de compuestos activos a una concentración de 100 ppm tras 96 horas a 21 °C. Cont.: Contaminación. X: no hay crecimiento. (Azul): hay esporulación. (Blanco): no hay esporulación. Resultados expresados en mm.

96 h	C-	Linalool	B-pineno	Timol	Acetato de bornilo	Canfeno	Carvacrol
<i>M. fructicola</i>	52	X	X	X	X	26,45	X
<i>B. cinerea</i>	52	X	6,26	X	X	46,98	X
<i>A. alternaria</i>	43,7	X	10,1	X	X	25,78	X
<i>R. stolonifer</i>	43	X	18	3,99	8,7	52	X
<i>P. expansum</i>	52	X	13	11,75	15,2	52 (Azul)	X

Finalmente, con una concentración de 300 ppm, los efectos de inhibición total se observaron principalmente en linalool y timol, aunque con  $\beta$ -pineno también se consiguieron buenos resultados. A diferencia de estos, con el canfeno se siguió viendo un crecimiento elevado de los hongos, incluso a concentraciones elevadas, indicando una baja capacidad antifúngica de este compuesto (Tabla 16).

**Tabla 16.** Efecto inhibitorio de compuestos activos a una concentración de 300 ppm tras 96 horas a 21 °C. Cont.: Contaminación. X: no hay crecimiento. (Azul): hay esporulación. (Blanco): no hay esporulación. Resultados expresados en mm.

96 h	C-	B-pineno	Linalool	Timol	Canfeno
<i>M. fructicola</i>	29,04	X	X	X	21,97
<i>B. cinerea</i>	52	X	X	X	52
<i>A. alternaria</i>	27,43	11,47	X	X	31,52
<i>R. stolonifer</i>	52	X	X	X	52
<i>P. expansum</i>	52 (Azul)	9,44	X	X	52 (Azul)

Otros estudios también han comprobado la capacidad antifúngica de carvacrol, timol y linalool a concentraciones de 50, 150 y 250 ppm, mostrando una gran actividad frente a *Monilinia* spp (Elshafie et al., 2015), Igualmente, Zhang et al. (2019), Camele et al. (2012) y Perina et al. (2014) también han observado que carvacrol y timol, a concentraciones similares, inhiben el crecimiento micelial de *B. cinerea*, *P. expansum*, *R. stolonifer* y *A. alternata*, mostrando similitudes con los resultados en este TFG. También cabe destacar que otros compuestos como  $\alpha$ -Pineno y Piperitenona también tienen potencial para ser utilizados en futuros proyectos debido a la actividad antifúngica frente a *B. cinerea* y *P. digitatum*, respectivamente, descrita en trabajos previos (Rguez et al., 2020; Romagnoli et al., 2005).

## 7 CONCLUSIONES

1. Las siete técnicas empleadas para evaluar la capacidad antifúngica de AEs e hidrolatos mostraron, en mayor o menor medida, cierto grado de inhibición en el crecimiento de los hongos. Los resultados más satisfactorios fueron proporcionados por el método de difusión de AEs y el método de difusión de compuestos activos en PDA. Por tanto, el contacto directo de AEs sería la técnica más efectiva para alargar la conservación postcosecha de manzanas.
2. Todos los AEs utilizados en este trabajo mostraron tener mayor efectividad frente a *M. fructicola*, que mostró una gran sensibilidad en todas las pruebas realizadas. Por el contrario, *R. stolonifer* y *P. expansum* mostraron una gran resistencia en la mayoría de los ensayos.
3. Una concentración del 10 % de los AEs utilizados produjo una inhibición total de todos los hongos, siendo una dosis excesiva. Sin embargo, esto no describe el efecto que tiene *S. officinalis* sobre las cepas fúngicas, sugiriendo una baja capacidad antifúngica por parte de este AE.
4. El uso de hidrolatos demostró ser una alternativa de bajo coste muy interesante para ralentizar el crecimiento fúngico en la fruta. Su uso permitiría, además, valorizar y obtener rendimiento económico de residuos de destilación, con la consiguiente protección del medio ambiente.
5. Los compuestos activos que presentaron una mayor capacidad antifúngica fueron carvacrol (65 %) y timol (2,32%) presentes en los AES de *O. virens*, Linalool (6,45%) de *M. rotundifolia* y  $\beta$ -pineno (3,9%) de *S. officinalis*.
6. Los aceites esenciales que mostraron la mayor actividad antifúngica en todos los procedimientos realizados fueron *O. virens* y *M. rotundifolia*, posiblemente debido a la presencia de compuestos como el carvacrol, timol y linalool, con gran capacidad inhibitoria.
7. La aplicación de aceites esenciales es una alternativa eficaz para una conservación de la fruta de forma más natural y ecológica frente a los tratamientos tradicionales de conservación, principalmente a través de recubrimientos comestibles.

## CONCLUSIONS

1. All seven techniques employed showed to a greater or lesser extent some degree of inhibition of fungal growth, but the most satisfactory results were provided by the diffusion of AEs and the diffusion of active compounds in PDA. This means that direct contact would be one of the most useful ways of preserving apples.
2. All essential oils were found to be most effective against *M. fructicola*, which showed high sensitivity in all tests. In contrast, *R. stolonifer* and *P. expansum* showed high resistance in most of the tests.
3. A concentration of 10 % of the essential oils produces a total inhibition of all fungi, which even seems to indicate an excessive amount. However, this does not seem to describe the effect of *S. officinalis* on the strains, which may also suggest a low antifungal capacity of this oil.
4. The use of hydrolates proved to be a very interesting low-cost technique to slow down fungal growth on fruit, which also prevents waste production and protects the environment to a large extent.
5. The active compounds with the highest antifungal capacity were carvacrol (65 %) and thymol (2.32 %) present in the EOs from *O. virens*, Linalool (6.45 %) from *M. rotundifolia* and  $\beta$ -pinene (3.9 %) from *S. officinalis*.
6. The essential oils that showed the highest antifungal activity in all the procedures performed were those from *O. virens* and *M. rotundifolia*, possibly due to the presence of compounds such as carvacrol, thymol and linalool, with high inhibitory capacity.
7. The application of essential oils is an effective alternative to traditional preservation treatments, mainly through edible coatings, for preserving fruit in a more natural and environmentally friendly way.

NOTA: Este trabajo se ha presentado en el III Congreso Cyta-CESIA Junior 2022 en formato poster que se encuentra reflejado en los Anexos. Pedro Gabriel Martínez Aznar (Coautor), Claudia Corchero Medina (Coautor), Celia M. Cantin<sup>3</sup>, Juliana Navarro<sup>1,2</sup>, Pedro Marco<sup>1,2</sup>. Utilización de aceites esenciales para la conservación postcosecha de fruta de pepita. Congreso III Cyta-CESIA. disponible en: <https://www.cyta-cesia2022.com/>. Anexos.

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación del Grupo de Cooperación FrutAE del Programa de Desarrollo Rural para Aragón 2014-2020 (Convocatoria 2021)

## 8 BIBLIOGRAFÍA

- Aćimović, M.G., Tešević, V.V., Smiljanić, K.T., Cvetković, M.T., Stanković, J.M., Kiproovski, B.M. and Sikora, V.S. (2020). "Hydrolates – by-products of essential oil distillation: chemical composition, biological activity and potential uses". *Advances technologies*, 9 (2), pp. 54-70.
- Alins, G., Alegre, S., Avilla, J., Batllori, L., Blázquez, M.D., Carbó, J., Dapena, E., Escudero Colomar, L.A., Iglesias, I., Lordan, J., Miñarro, M., Vilajeliu, M. y Villardell, P. (2010). "Producción de manzana en agricultura ecológica: control de plagas y enfermedades". *Revista de Fruticultura*, 7, pp. 4-17.
- Alizadeh Salteh, S., Arzani, K., Omidbeigi, R. and Safaie, N. (2010). "Essential Oils Inhibit Mycelial Growth of *Rhizopus stolonifer*". *European Journal of Horticultural Science*, 75 (6), pp. 278 - 282.
- Alomar, E. (2009). Hongos y Líquenes. Disponible en: [Penicillium cf. expansum Link 1809 - 8021 - Biodiversidad Virtual / Hongos y Líquenes](#) [Consultado 24/08/2022].
- Andrews, J.M. (2001). "Determination of minimum inhibitory concentrations". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 (1), pp. 5-16. DOI: [10.1093/jac/48.suppl\\_1.5](https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5)
- Antezana Ruiz, B.F. (2017). Obtención de aceite esencial e hidrolato de hierbabuena (*Mentha spicata*) mediante el proceso de destilación por arrastre con vapor. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Mayor de San Andrés.
- Bautista Baños, S., Bosquez Molina, E. y Barrera Necha, L.L. (2014). "Chapter 1 - *Rhizopus stolonifer* (Soft Rot)". *Postharvest Decay*, 2014, pp. 1-44.
- Basak, S. (2018). "Modelling the effect of betel leaf essential oil on germination time of *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* spore population". *LWT-Food Science and Technology*, 95, pp. 361-366. DOI: [10.1016/j.lwt.2018.05.015](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.015)
- Basak, S. and Guha, P. (2017). "Use of predictive model to describe sporicidal and cell viability efficacy of betel leaf (*Piper betle* L.) essential oil on *Aspergillus Flavus* and *Penicillium expansum* and its antifungal activity in raw apple juice". *LWT*, 80, pp. 510-516. DOI: [10.1016/j.lwt.2017.03.024](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.024)
- Benavides, M.E., Fernández Pinto, V. y Pose, G. (2019). "Especies de *Alternaria* asociadas a cultivos de manzana y pera en la región del alto valle del río negro, Argentina". *Cultura Científica*, 17, pp. 18-31. DOI: [10.38017/1657463X.592](https://doi.org/10.38017/1657463X.592)
- Calvo, H., Marco, P., Blanco, D., Oria, R. and Venturini, M.E. (2017). "Potencial of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases". *Food Microbiology*, 63, pp. 101-110. DOI: [10.1016/j.fm.2016.11.004](https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.004)

- Camele, I., Altieri, L., De Martino, L., De Feo, V., Mancini, E. and Rana, G.L. (2012). "In Vitro Control of Post-Harvest Fruit Rot Fungi by Some Plant Essential Oils Components". *International Journal of Molecular Sciences*, 13, pp. 2290 - 2300. DOI: 10.3390/ijms13022290
- Di Francesco, A., Aprea, E., Gasperi, F., Parenti, A., Placi, N., Rigosi, F. and Baraldi, E. (2022). "Apple pathogens: Organic essential oils as an alternative solution". *Scientia Horticulturae*, 300, pp. 1-8. DOI: 10.1016/j.scienta.2022.111075
- Directiva 91/414/CEE del consejo de 15 de julio de 1991 relativa a la comercialización de productos fitosanitarios. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. L 230 / 1
- Dorđević, M., Šević, M., Mijatović, M., Todorović, G. and Kostić, M. (2011). "In vitro effectiveness of different essential oils in control of *Alternaria Alternata*". *Zaštita bilja*, 62 (3), pp. 155-204.
- Dugaheh, M.A., Meisami, F., Torabian, Z. and Sharififar, F. (2013). "Antioxidant effect and study of bioactive components of *Valeriana sisymbriifolia* and *Nardostachys jatamansii* in comparison to *Valeriana officinalis*". *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26 (1), pp. 53-58.
- El Arch, M., Satrani, B., Farah, A., Bennani, I., Boriky, D., Fechtal, M. Blaghen, M. and Talbi, M. (2003). "Composition chimique et activités antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* du Maroc". *Acta Botanica Gallica*, 150 (3), pp. 267-274.
- El Khetabi, A., Ezrari, S., El Ghadraoui, L., Tahiri, A., Ait Haddou, L., Belabess, Z., Merah, O. and Lahlali, R. (2021) "In Vitro and In Vivo Antifungal Activities of Nine Commercial Essential Oils against Brown Rot in Apples". *Horticulturae*, 7 (12), pp. 1-18.
- El Ouadi, Y., Manssouri, M., Bouyanzer, A., Majidi, L., Bendaif, H., Elmsellem, H., Shariati, M.A., Melhaoui, A. and Hammouti, B. (2017). "Essential oil composition and antifungal activity of *Melissa officinalis* originating from north-Est Morocco, against postharvest phytopathogenic fungi in apples". *Microbial Pathogenesis*, 107, pp. 321-326.
- Elshafie, H.S., Mancini, E., Sakr, S., De Martino, L., Andrea Mattia, C., De Feo, V., and Camele, I. (2015). "Antifungal Activity of Some Constituents of *Origanum vulgare* L. Essential Oil Against Postharvest Disease of Peach Fruit". *Journal of medicinal food*, 18 (8), pp. 1 - 6.
- European Commission (2022). "Green Deal: pioneering proposals to restore Europe's nature by 2050 and halve pesticide use by 2030". Brussels: European Commission.
- European Food Safety Authority (EFSA). "EFSA Guidance Document on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees)". *EFSA Journal*, 11 (7), pp. 1-268. DOI: 10.2903/j.efsa.2013.3295
- García Pérez, E., Castro Álvarez, F.F., Gutiérrez Uribe, J.A. and García Lara, S. (2012). "Revisión de la producción, composición fitoquímica y propiedades nutraceuticas del orégano mexicano". *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3 (2), pp. 339 - 353.
- Gorinstein, S., Martin Belloso, O., Lojek, A., Číž, M., Soliva Fortuny, R., Park, Y.S., Caspi, A., Libman, I. and Trakhtenberg, S. (2002). "Comparative content of some phytochemicals in Spanish apples, peaches and pears". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, pp. 1166-1170. DOI: 10.1002/jsfa.1178
- Hadian, J., Ghasemnezhad, M., Ranjbar, H., Frazane, M. and Ghorbanpour, M. (2008). "Antifungal Potency of Some Essential Oils in Control of Postharvest Decay of Strawberry Caused by *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger*". *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11 (5), pp. 553-562. DOI: 10.1080/0972060X.2008.10643666
- Hernández-Agero, T.O., Carretero Accame, M.E. y Villar del Fresno, A.M. (2002). "Salvia. Fitoquímica, farmacología y terapéutica". *Farmacía Profesional*, 16 (7), pp. 59-64.
- Inteligencia de Negocios Técnicos Agrícolas (2012). "Patógenos en peras y manzanas en cámara frigorífica". Inteligencia de Negocios Técnicos Agrícolas [Blog]. 30 de enero.

- Inteligencia de Negocios Técnicos Agrícolas (2012). "Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control". Inteligencia de Negocios Técnicos Agrícolas [Blog]. 6 de septiembre.
- Julio Torres, L.F. (2017). "Producción y optimización de bioplaguicidas de *Artemisia absinthium* y *Lavandula luisieri*". Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Kalemba, D. and Synowiec, A. (2019). "Agrobiological Interactions of Essential Oils of Two Menthol Mints: *Mentha piperita* and *Mentha arvensis*". *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 25(1), pp. 1-33. DOI: 10.3390/molecules25010059
- Lasheras Blanco, J. (2013). Proyecto de mejora de calidad de manzana Golden mediante la incorporación de mallas antigranizo, en Calatorao (Zaragoza). Trabajo de Fin de Grado. Universidad de Valladolid.
- Lolas, M. (2020). "Sarna y pudriciones de la manzana: conocimiento y eliminación de sus fuentes de inóculo". *Boletín Técnico de Pomáceas*, 111, pp. 8-12.
- López-Carreras, N., Miguel, M. and Aleixandre, A. (2012). "Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud". *Nutrición clínica y Dietética Hospitalaria*, 32 (3), pp. 81 - 91.
- Marei, G. and Abdelgaleil, S. (2018). "Antifungal Potential and Biochemical Effects of Monoterpenes and Phenylpropenes on Plant Pathogenic Fungi". *Plant Protection Science*, 54 (1), pp. 9-16. DOI: 10.17221/9/2017-PPS
- Marei, G., Abdel Rasoul, M.A. and Abdelgaleil, S. (2012). "Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi". *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103 (1), pp. 56-61. DOI: 10.1016/j.pestbp.2012.03.004
- Marino, A., Nostro, A., Mandras, N., Roana, J., Ginestra, G., Miceli, N., Taviano, M.F., Gelmini, F., Beretta, G. and Tullio, V. (2020). "Evaluation of antimicrobial activity of the hydrolate of *Coridothymus capitatus* (L.) Reichenb. fil. (*Lamiaceae*) alone and in combination with antimicrobial agents". *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20 (89), pp. 1-11.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2021). Base de datos de consumo en hogares de frutas frescas. Madrid: MAPAMA
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2022). Informe de campañas 2017-2022 de fruta de pepita. Madrid: MAPAMA
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2018). La alimentación española. Características nutricionales de los principales alimentos en nuestra dieta. Madrid: MAPAMA.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2022). Lista comunitaria de sustancias activas aprobadas, excluidas y en evaluación comunitaria, sustancias de bajo riesgo, sustancias candidatas a sustitución y lista de sustancias básicas. Madrid: MAPAMA
- Mohammadi, A., Hashemi, M. and Hosseini, S.M. (2015). "Nanoencapsulation of *Zataria multiflora* essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mould Disease". *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 28, pp. 73-80. DOI: 10.1016/j.ifset.2014.12.011
- Mironescu, M. and Georgescu, C. (2008). "Preliminary researches on the effect of essential oils on moulds isolated from surfaces". *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 14, pp. 30-33.
- Moumni, M., Romanazzi, G., Najar, B., Pistelli, L., Ben Amara, H., Mezrioui, K., Karous, O., Chaieb, I. and Allagui, M.B. (2021). "Antifungal Activity and Chemical Composition of Seven Essential Oils to Control the Main Seedborne Fungi of Cucurbits". *MDPI*, 10 (2), pp. 1 - 16.
- Ozcakmak, S., Gul, O., Dervisoglu, M., Yilmaz, A., Sagdic, O. and Arici, M. (2016). "Comparison of the Effect of Some Essential Oils on the Growth of *Penicillium verrucosum* and its Ochratoxin

- a Production: Inhibition of *P. verrucosum* by Essential Oils". *Journal of Food Processing and Preservation*, 41 (1), pp. 1-9.
- Pavón Moreno, M.A., González Alonso, I., Martín de Santos, R. y García Lacarra, T. (2012). "Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas". *Nutrición Hospitalaria*, 27 (6), pp. 1772-1781.
- Perina, F. J., Amaral, D. C., Fernandes, R. S., Labory, C. R.G., Teixeira, G. A. and Alves, E. (2014). "Thymus vulgaris essential oil and thymol against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler: effects on growth, viability, early infection and cellular mode of action". *Pest Management Science*, 71 (10), pp. 1371 - 1378. DOI: 10.1002/ps.3933
- Poniatowska, A., Michalecka, M. and Bielenin, A. (2013). "Characteristic of *Monilinia* spp. fungi causing brown rot of pome and stone fruits in Poland". *European Journal of Plant Pathology*, 135, pp. 855-865. DOI: 10.1007/s10658-012-0130-2
- Ramírez González, S.I., López Báez, O., Espinosa Zaragoza, S. y Wong Villarreal, A. (2016). "Actividad antifúngica de hidrodestilados y aceites sobre *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum gloesporioides*". *REMEXCA*, 7 (8), pp. 1879-1891. DOI: [10.29312/remexca.v7i8.99](https://doi.org/10.29312/remexca.v7i8.99)
- Reglamento (CE) nº 1107/2009 del parlamento europeo y del consejo de 21 de octubre de 2009 relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y por el que se derogan las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea. L 309/1
- Rguez, S., Ben Slimene, I., Abid, G., Hammemi, M., Kefi, A., Elkahoui, S., Ksouri, R., Hamrouni Sellami, I. and Djéballi, N. (2020). "Tetraclinis articulata essential oil reduces *Botrytis cinerea* infections on tomato". *Scientia Horticulturae*, 266, pp. 109291.
- Riahi, L., Elferchichi, M., Ghazghazi, H., Jebali, J., Ziadi, S., Aouadhi, C., Chograni, H., Zaoualif, Y., Zoghalmi, N. and Mliki, A. (2013). "Phytochemistry, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of *Mentha rotundifolia* L. in Tunisia". *Industrial Crops and Products*, 49, pp. 883-889. DOI: [10.1016/j.indcrop.2013.06.032](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.032)
- Roldan Fau, L.M. (2005). "Estadísticas de los frutales de pepita en Aragón". *Surcos de Aragón*, 95, pp. 38-43.
- Romagnoli, C., Bruni, R., Andreotti, E., Rai, M.K., Vicentini, C.B. and Mares, D. (2005). "Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetes patula* L". *Protoplasma*, 225(1-2), pp. 57-65. DOI: 10.1007/s00709-005-0084-8.
- Sajid, A., Irshad, G., Naz, F., Ghuffar, S., Hassan, I., Mahmood, N., Rani, K., Faizan Manzoor, M., Meesam, A., Hamzah, A.M. and Karamt, M.Z. (2020). "In vitro evaluation of plant essential oils against *Alternaria alternata* causing fruit rot of grapes". *Asian journal of agriculture and biology*, 8(2), pp. 168 - 173. DOI: 10.35495/ajab.2019.11.532
- Servicio Agrícola y Ganadero (2015). *Monilinia fructicola*. Chile: SAG.
- Ticha, A., Salejda, A.M., Hyšpler, R., Matejicek, A., Paprstein, F. and Zadak, Z. (2015). "Sugar composition of apple cultivars and its relationship to sensory evaluation". *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 4(101), pp. 137-150. DOI: 10.15193/ZNTJ/2015/101/062
- Tomás Barberán, F.A. and Clifford, F.A. (2000). "Review. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones nature, occurrence and dietary burden". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (7), pp. 1073-1080.
- Tsao, R. and Zhou, T. (2000). "Antifungal Activity of Monoterpenoids against Postharvest Pathogens *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructicola*". *Journal of Essential Oil Research*, 12 (1), pp. 113 - 121. DOI: 10.1080/10412905.2000.9712057
- Tzunúm Saquic, V.R. (2014). "Proceso de cosecha y comercialización de la manzana (*Malus comunis*, *Rosaceae*), variedades Red Delicious, Jonathan y Juárez y su impacto sobre la

- rentabilidad en la asociación nacional de productores de frutales deciduos región Chichicastenango, periodo de 2005 a 2009” Trabajo de Fin de Grado. Universidad Rafael Landívar.
- Umagiliyage, A.L., Becerra Mora, N., Kohli, P., Fisher, D.J. and Choudharya, R. (2017). “Antimicrobial efficacy of liposomes containing D-limonene and its effect on the storage life of blueberries”. *Postharvest Biology and Technology*, 128, pp. 130-137.
- Urbina Vallejo, V. (2007). Daños por granizo en frutales. Sintomatología y evaluación. Trabajo de Fin de Grado. Universidad de Lleida.
- Valle Algabarra, F.M. (2010). “Evaluación del peligro potencial y real de la presencia de ocratoxina A, tricotecenos B y patulina en trigo y manzana mediante técnicas microbiológicas y cromatográficas”. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- Venturini, M.E., Blanco, D. and Oria, R. (2002). “In Vitro Antifungal Activity of Several Antimicrobial Compounds against *Penicillium expansum*”. *Journal of Food Protection*, 65 (5), pp. 834 - 839. DOI: 10.4315/0362-028x-65.5.834
- Villar del Fresno, A.M y Carretero Accame, M.E. (2001). “*Valeriana officinalis*. Fitoquímica, farmacología y terapéutica”. *Farmacia Profesional*, 15 (9), pp. 98 - 106.
- Viñas Almenar, I. (2005). “Evaluación y control de los posibles peligros químicos y microbiológicos durante la producción y procesado de manzanas”. Proyecto de Investigación. Universidad de Lleida.
- Vitoratos, A., Bilalis, D. Karkanis, A. and Efthimiadou, A. (2013). “Antifungal Activity of Plant Essential Oils Against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*”. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*, 41 (1), pp. 86-92. DOI: [10.15835/nbha4118931](https://doi.org/10.15835/nbha4118931)
- Yan, J., Wu, H., Shi, F., Wang, H., Chen, K., Feng, J. and Jia, W. (2020). “Antifungal activity screening for mint and thyme essential oils against *Rhizopus stolonifer* and their application in postharvest preservation of strawberry and peach fruits”. *Journal of Applied Microbiology*, 130 (6), pp. 1993 - 2007. DOI: 10.1111/jam.14932
- Yang, X. and Jiang, X. (2015). “Antifungal activity and mechanism of tea polyphenols against *Rhizopus stolonifer*”. *Biotechnology Letters*, 37, pp. 1463 - 1472. DOI: 10.1007/s10529-015-1820-6
- Yu, L., Qiao, N., Zhao, J., Zhang, H., Tian, F., Zhai, Q. and Chen, W. (2020). “Postharvest control of *Penicillium expansum* in fruits: A review”. *Food Bioscience*, 36 (4), pp. 1-11.
- Zhang, J., Ma, S., Du, S., Chen, S. and Sun, H. (2019). “Antifungal activity of thymol and carvacrol against postharvest pathogens *Botrytis cinerea*”. *Journal of Food Science and Technology*, 56 (5), pp. 2611–2620. DOI: 10.1007/s13197-019-03747-0
- Zhou, L., Zhang, Z., Wei, M., Xie, Y., He, S., Shi, H. and Lin, Z. (2019). “Evaluation of the antifungal activity of individual and combined monoterpenes against *Rhizopus stolonifer* and *Absidia coerulea*”. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, pp. 7804-7809.

9 ANEXOS

## Utilización de aceites esenciales para la conservación postcosecha de fruta de pepita

C. Corchero<sup>1,2,4</sup>, P. G. Martínez<sup>1,2,4</sup>, C.M. Canfán<sup>3</sup>, J. Navarro<sup>1,2</sup>, P. Marco<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Departamento de Ciencia Vegetal, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Avda. Montañana, 50059, Zaragoza, España.  
<sup>2</sup>Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Zaragoza, España.  
<sup>3</sup>Departamento de Pomología, Estación Experimental Aula Dei (EEAD-CSIC), Instituto Agroalimentario de Aragón - IA2 (EEAD-CSIC-Universidad de Zaragoza), Zaragoza, España.  
<sup>4</sup>Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España.

**INTRODUCCIÓN**

La manzana (*Malus domestica*), se trata de una de las frutas más producidas en España (Venturini *et al.*, 2002), siendo este el 5º productor con 600.000 t/año. Las grandes pérdidas económicas postcosecha son ocasionadas por las especies de hongos (El Ouadi *et al.*, 2017; Poniatowska *et al.*, 2012):

- *Monilinia fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Penicillium expansum* y *Rhizopus stolonifer*.

Por todo ello, frente a fungicidas convencionales se han planteado alternativas mediante el uso de:

- Aceites esenciales (AEs): *Origanum virens*, *Salvia officinalis*, *Valeriana officinalis* y *Mertha rotundifolia*.
- Hidrolatos de cada AE, subproducto de la destilación del AE.

**OBJETIVO**

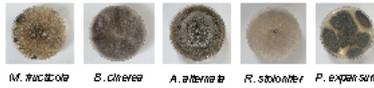
El objetivo de este trabajo es determinar la capacidad inhibitoria de AEs obtenidos de plantas aromáticas de cultivo de Aragón frente a los principales hongos alterantes post-cosecha de la manzana.

**MATERIALES Y MÉTODOS**

Material de partida:

- **AEs:** *O. virens* (600) - *M. rotundifolia* (473) - *S. officinalis* (719) - *V. officinalis* (VAL) y sus hidrolatos.

- **Cepas fúngicas**



Los ensayos realizados fueron (Venturini *et al.*, 2002):

- **Método de difusión en Agar**

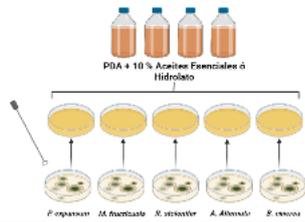


Figura 1 Representación del método de difusión de los aceites AEs en el medio de cultivo Agar (Malá De la Cruz (FDA) Graduada a doctorado)

- **Determinación del MIC y MFC**

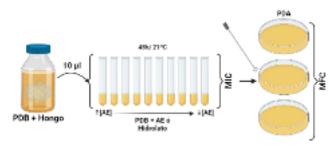


Figura 2 Representación del método de determinación del MIC y MFC de cada AE e hidrolato en los hongos mediante resultados de óptica y FDS con 10 microlitros de AE (100%, 30%, 20%, 10%, 0,3%, 0,2%, 0,125%, 0,0625%, 0,03125%, 0,0156% y 0) y agua (100%, 30%, 20%, 10%, 0,3%, 0,2%, 0,125%, 0,0625%, 0,03125% y 0) en los tubos que se observan crecimiento se sirven para FDS. Graduada a doctorado

**RESULTADOS**

- Los AEs tuvieron mayor efecto inhibitorio que los hidrolatos a una misma concentración (Figura 3 y 4).
- *S. officinalis* y *V. officinalis* fueron los que menor efecto tuvieron.
- *O. virens* y *M. rotundifolia* presentaron una gran capacidad antifúngica, afectando a la velocidad de crecimiento.
- Se obtuvieron los MIC y MFC para conocer los rangos efectivos de concentración de cada AE (Tabla 1 y 2).

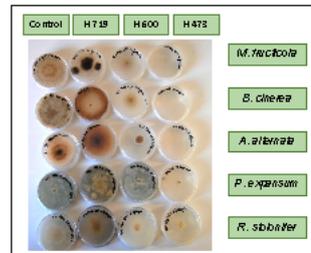
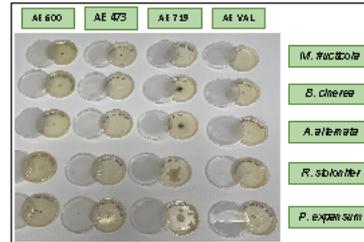


Figura 3 y 4 Efecto de retención de los AEs (Figura 3) al 100%, 30%, 20%, 10% y 0,3%, 0,2%, 0,125% y 0,0625% y los hidrolatos (Figura 4) al 100%, 30%, 20% y 10% sobre el crecimiento de los hongos mediante difusión de AEs e hidrolatos en FDS (Figura 1)

TUBOS	AE	1%	0,5%	0,25%	0,125%	0,0625%	MIC (%)
M. fructicola	600	-	-	-	-	-	0,25
	473	-	-	-	-	-	0,125
	719	-	-	-	-	-	0,25
	VAL	-	-	-	-	-	0,25
BOTYIS	600	-	-	-	-	-	0,25
	473	-	-	-	-	-	0,25
	719	-	-	-	-	-	0,1
	VAL	-	-	-	-	-	0,25
ALTERNARIA	600	-	-	-	-	-	1
	473	-	-	-	-	-	0,25
	719	-	-	-	-	-	1
	VAL	-	-	-	-	-	0,35
PLACAS	600	-	-	-	-	-	MFC (%)
	473	-	-	-	-	-	0,125
	719	-	-	-	-	-	0,25
	VAL	-	-	-	-	-	0,25
M. fructicola	600	-	-	-	-	-	0,25
	473	-	-	-	-	-	0,25
	719	-	-	-	-	-	0,1
	VAL	-	-	-	-	-	0,25
BOTYIS	600	-	-	-	-	-	0,25
	473	-	-	-	-	-	0,25
	719	-	-	-	-	-	0,1
	VAL	-	-	-	-	-	0,25
ALTERNARIA	600	-	-	-	-	-	1
	473	-	-	-	-	-	0,25
	719	-	-	-	-	-	1
	VAL	-	-	-	-	-	0,25
PLACAS	600	-	-	-	-	-	MFC (%)
	473	-	-	-	-	-	100
	719	-	-	-	-	-	50
	VAL	-	-	-	-	-	0
M. fructicola	600	-	-	-	-	-	0
	473	-	-	-	-	-	100
	719	-	-	-	-	-	0
	VAL	-	-	-	-	-	0
BOTYIS	600	-	-	-	-	-	0
	473	-	-	-	-	-	100
	719	-	-	-	-	-	0
	VAL	-	-	-	-	-	0
ALTERNARIA	600	-	-	-	-	-	0
	473	-	-	-	-	-	0
	719	-	-	-	-	-	0
	VAL	-	-	-	-	-	0

Tabla 1 y 2. Valores MIC (%) y MFC (%) de los AEs e hidrolatos para M. fructicola, B. cinerea, A. alternata, P. expansum y R. stolonifer obtenidos mediante el método de la figura 2. (B) (-) no para la concentración (0) para la concentración

**CONCLUSIONES**

1. Los AEs en general, y los de *O. virens* y *M. rotundifolia* en particular, mostraron capacidad antifúngica *in vitro*, principalmente frente a *M. fructicola*, *B. cinerea* y *A. alternata*.
2. La capacidad antifúngica es notable a bajas concentraciones de AEs, sin embargo son necesarias altas concentraciones de hidrolatos.
3. El uso de hidrolatos puede ser una interesante alternativa de bajo coste para inhibir o ralentizar el crecimiento fúngico en fruta.

**REFERENCIAS** Venturini *et al.*, 2002. Journal of Food Protection 65: 534-539. doi: 10.4315/0392-0033-65-534  
 Poniatowska *et al.*, 2012. Eur J Plant Pathol 126: 269-285. doi:10.1007/s10263-012-0332-2  
 El Ouadi *et al.*, 2017. Microbial Pathogenesis 107: 321-326. doi: 10.1016/j.mpa.2017.04.004

**AGRADECIMIENTOS** Este trabajo ha sido financiado en el marco del Grupo de Cooperación CITA-IA2 (9118) FRUITAG, Gobierno de Aragón. Los autores agradecen al grupo de Patología Postcosecha del IITA la cédula de cede de M. fructicola.

**CONTACTO**  
 Claudia Corchero: claudia.corchero@gmail.com  
 Pedro G. Martínez: pedrogmatinez@gmail.com



**Figura S1.** Poster presentado en el III Congreso Cyta- CESIA Junior “Utilización de aceites esenciales para la conservación postcosecha de fruta de pepita”.

**Tabla S1.** Quimiotipo del AE de *O. virens* obtenido a través de una cromatografía gases con espectrometría de masas.

Nombre	Nº CAS	%
Triciclano	508-32-7	0,1
<i>alfa</i> -Tuyeno	28167-05-2	0,1
<i>alfa</i> -Pino	80-56-8	7,2
Canfeno	79-92-5	2,7
Sabineno	3387-41-5	0,1
<i>beta</i> -Pino	127-91-3	3,9
Mirceno	123-35-3	0,7
3-Octanol	589-98-0	0
<i>alfa</i> -Felandreno	99-83-2	0,1
<i>alfa</i> -Terpineno	99-86-5	0,3
<i>p</i> -Cimeno	99-87-6	1
Limoneno	138-86-3	1,5
1,8-Cineol	470-82-6	13,5
(Z)- <i>b eta</i> -Ocimeno	3338-55-4	0,5
(E)- <i>b eta</i> -Ocimeno	3779-61-1	0,1
<i>gamma</i> -Terpineno	99-85-4	0,4
Sabineno hidrato	546-79-2	0,1
Terpinoleno	586-62-9	0,2
Linalol	78-70-6	0,1
<i>alfa</i> -Tuyona	546-80-5	27,3
<i>beta</i> -Tuyona	471-15-8	5,6
Alcanfor	76-22-2	5,63
Borneol	464-45-9	5,87
Terpinen-4-ol	562-74-3	0,43
<i>alfa</i> -Terpineol	482-56-1	0,31
Mirtenol	515-00-4	0,27
Acetato de linalilo	115-95-7	0,05
Acetato de bornilo	76-49-3	0,8
Timol	89-83-8	0,04
Carvacrol	499-75-2	0,15
<i>alfa</i> -Copaeno	3856-25-5	0,09
<i>beta</i> -Cariofileno	87-44-5	5,26
<i>alfa</i> -Humuleno	6753-98-6	5,45
Viridifloreno	21747-46-6	0,19
<i>delta</i> -Cadieno	483-76-1	0,21
Espatulenol	77171-55-2	0,11
Óxido de cariofileno	1139-30-6	0,7
Viridifrorol	552-02-3	8,77

**Tabla S2.** Quimiotipo del AE de *S. officinalis* obtenido a través de una cromatografía gases con espectrometría de masas.

Nombre	Nº CAS	%
Triciclano	508-32-7	0,1
<i>alfa</i> -Tuyeno	28167-05-2	0,1
<i>alfa</i> -Pino	80-56-8	7,2
Canfeno	79-92-5	2,7
Sabineno	3387-41-5	0,1
<i>beta</i> -Pino	127-91-3	3,9
Mirceno	123-35-3	0,7
3-Octanol	589-98-0	0
<i>alfa</i> -Felandreno	99-83-2	0,1
<i>alfa</i> -Terpineno	99-86-5	0,3
<i>p</i> -Cimeno	99-87-6	1
Limoneno	138-86-3	1,5
1,8-Cineol	470-82-6	13,5
(Z)- <i>b eta</i> -Ocimeno	3338-55-4	0,5
(E)- <i>b eta</i> -Ocimeno	3779-61-1	0,1
<i>gamma</i> -Terpineno	99-85-4	0,4
Sabineno hidrato	546-79-2	0,1
Terpinoleno	586-62-9	0,2
Linalol	78-70-6	0,1
<i>alfa</i> -Tuyona	546-80-5	27,3
<i>beta</i> -Tuyona	471-15-8	5,6
Alcanfor	76-22-2	5,63
Borneol	464-45-9	5,87
Terpinen-4-ol	562-74-3	0,43
<i>alfa</i> -Terpineol	482-56-1	0,31
Mirtenol	515-00-4	0,27
Acetato de linalilo	115-95-7	0,05
Acetato de bornilo	76-49-3	0,8
Timol	89-83-8	0,04
Carvacrol	499-75-2	0,15
<i>alfa</i> -Copaeno	3856-25-5	0,09
<i>beta</i> -Cariofileno	87-44-5	5,26
<i>alfa</i> -Humuleno	6753-98-6	5,45
Viridifloreno	21747-46-6	0,19
<i>delta</i> -Cadieno	483-76-1	0,21
Espatulenol	77171-55-2	0,11
Óxido de cariofileno	1139-30-6	0,7
Viridifrorol	552-02-3	8,77

**Tabla S3.** Quimiotipo del AE de *V. officinalis* obtenido a través de una cromatografía de gases con espectrometría de masas.

Nombre	Nº CAS	%
<i>alfa</i> -Pinoeno	80-56-8	6,83
<i>alfa</i> -Fencheno	471-84-1	2,07
Canfeno	79-92-5	26,65
<i>beta</i> -Pinoeno	127-91-3	4,66
Limoneno	138-86-3	1,97
<i>p</i> -Cimeno	99-87-6	0,97
Acetato de bornilo	76-49-3	36,38
Ácido isovalérico	503-74-2	0,58
Acetato de mirtelino	35670-93-0	3,79
Borneol	464-45-9	1,56
Valerenal	4176-16-3	2,3

**Tabla S4.** Quimiotipo del AE de *M. rotundifolia* obtenido a través de una cromatografía de gases con espectrometría de masas.

Nombre	Nº CAS	%
<i>alfa</i> -Pipeno	80-56-8	1.06
<i>beta</i> -Pinoeno	127-91-3	1.08
<i>beta</i> -Mirceno	123-35-3	1.09
Limoneno	138-86-3	1.10
1,8-Cineol	470-82-6	1.11
Linalool	78-70-6	1.12
Alcanfor	76-22-2	1.13
Endo-borneol	507-70-0	1.14
Piperitenona	491-09-8	1.16
Oxido de Piperitenona	35178-55-3	1.17
Cis-Jasmona	488-10-8	1.18
Trans-Cariofileno	87-44-5	1.19
Germacreno-D	23986-74-5	1.20
Viridiflorol	552-02-3	1.21