

ACEITES ESENCIALES: UNA ALTERNATIVA SOSTENIBLE PARA EL CONTROL DE PODREDUMBRES Y LA PROLONGACIÓN DE LA VIDA ÚTIL DE LA MANZANA

Se estudia el uso de aceites esenciales de *Mentha rotundifolia*, *Origanum virens*, *Salvia officinalis* y *Valeriana officinalis* como alternativa a los fungicidas de origen químico

Celia M. Cantín¹, Juliana Navarro², Pedro Gabriel Martínez^{1,2}, Pedro Marco²

¹Grupo NPFC, Estación Experimental de Aula Dei (CSIC), Zaragoza

²Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Zaragoza

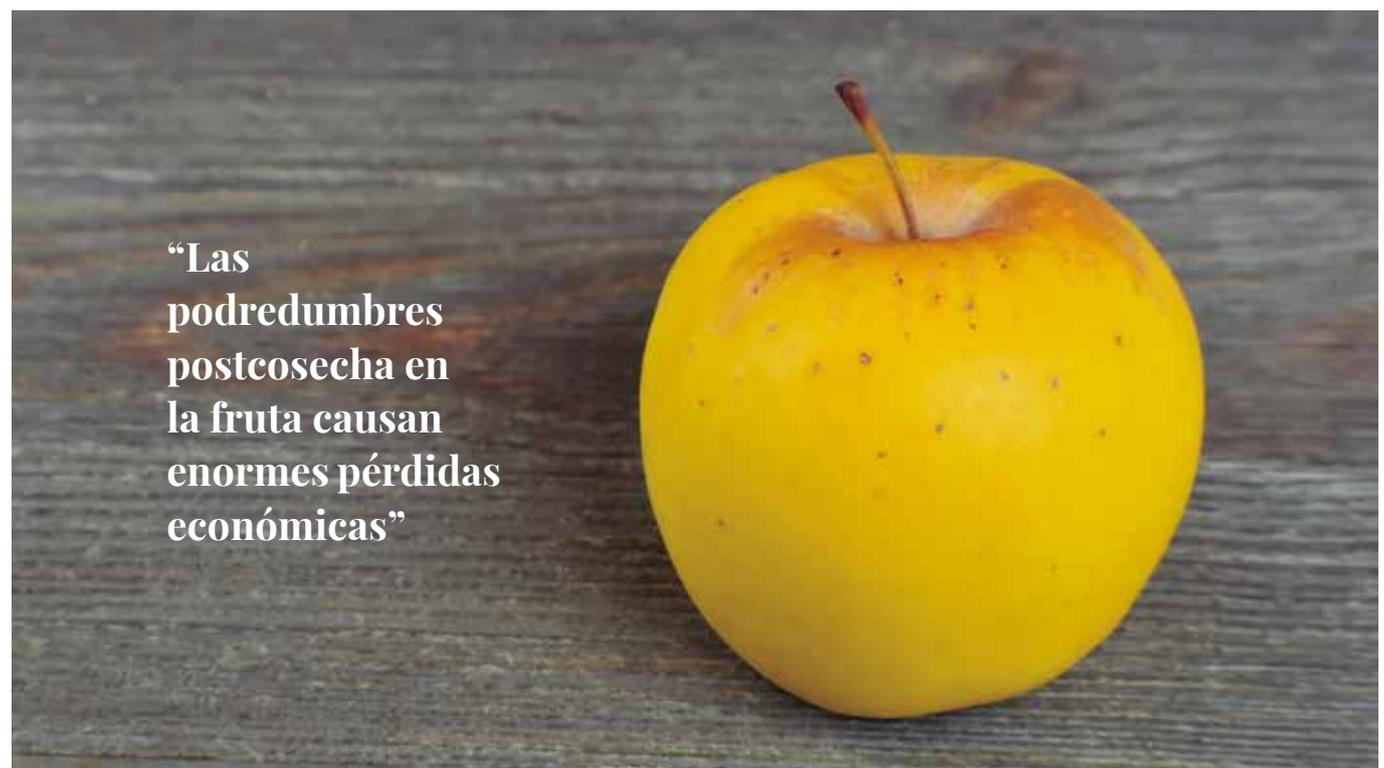
INTRODUCCIÓN

Las podredumbres postcosecha en la fruta causan enormes pérdidas económicas cada año (Elshafie et al., 2015). Estas podredumbres suelen estar causadas en su mayoría por hongos, entre los que podríamos destacar aquellas infecciones causadas por hongos de las especies *Penicillium spp.*, *Alternaria spp.*, *Fusarium spp.*, *Rhizopus spp.*, *Botrytis spp.*, *Monilinia spp.*, *Collectotrichum spp.*, *Fusarium spp.* y *Verticillium spp.*

El modo clásico de lucha contra este tipo de patologías es la utilización de fungicidas de síntesis tanto en

la etapa precosecha como en la postcosecha. Sin embargo, la aparición de cepas resistentes, las limitaciones legales, el detrimento de su efectividad, sus consecuencias negativas en la salud y la naturaleza (El Khetabi et al., 2021; Camele et al., 2012; Venturini et al., 2002) y la concienciación por parte del consumidor en la búsqueda de productos libres de sustancias químicas, ha impulsado la búsqueda de alternativas para la conservación postcosecha de fruta fresca.

Entre las alternativas actualmente estudiadas encontramos la utilización de aceites esenciales



“Las podredumbres postcosecha en la fruta causan enormes pérdidas económicas”

Se evaluó in vivo la eficacia antifúngica de los AEs tras su aplicación sobre manzanas 'Golden Delicious' recién cosechadas.



Valeriana officinalis.

(AEs) extraídos de plantas aromáticas. Los AEs son líquidos oleosos, volátiles y olorosos con propiedades antimicrobianas. Son considerados compuestos GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (Yan et al., 2020), seguros para el consumo alimentario y que no dejan ningún residuo en el fruto. Suelen tener composiciones muy complejas, y en ellas destacan distintos compuestos activos como linalol, eugenol, timol, carvacrol, citral y eucaliptol. Algunos de los AEs que más se están estudiando para su utilización en la postcosecha de distintas frutas son los obtenidos del orégano, la canela, el tomillo, la menta, el romero, el clavo, la lavanda y la salvia.

En el trabajo que presentamos, nuestro objetivo fue la utilización de AEs de plantas aromáticas provenientes de Aragón (Fig. 1) como alternativa a los fungicidas de origen químico para la conservación de manzana fresca. Para ello llevamos a cabo una parte de ensayos

in vitro y otra *in vivo*, en las cuales se trabajó con AEs de *Mentha rotundifolia*, *Origanum virens*, *Salvia officinalis* y *Valeriana officinalis*, para los que se evaluó su capacidad antifúngica frente a los hongos *Monilinia fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Rhizopus stolonifer* y *Penicillium expansum*.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio *in vitro* consistió en evaluar la eficacia antifúngica de los AEs obtenidos de *M. rotundifolia*, *O. virens*, *S. officinalis* y *V. officinalis* frente a los hongos *M. fructicola*, *B. cinerea*, *A. alternata*, *P. expansum* y *R. stolonifer* (Fig. 2). Se utilizaron diferentes métodos para la evaluación de esta capacidad antifúngica como la difusión de AEs en disco, la dilución de AEs en agar patata dextrosa (PDA), la dilución de AEs en caldo de patata dextrosa (PBD) y la generación de esporas en agar dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBD).



Figura 1: Cultivo de orégano (*Origanum virens*) para la extracción de su aceite esencial en Aragón. Foto: Estación Experimental de Aula Dei (CSIC) y CITA Zaragoza.



Figura 2: Cepas de *Monilinia fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Rhizopus stolonifer* y *Penicillium expansum* (de izqda. a dcha. y de arriba abajo) utilizadas en este estudio. Foto: Estación Experimental de Aula Dei (CSIC) y CITA Zaragoza.

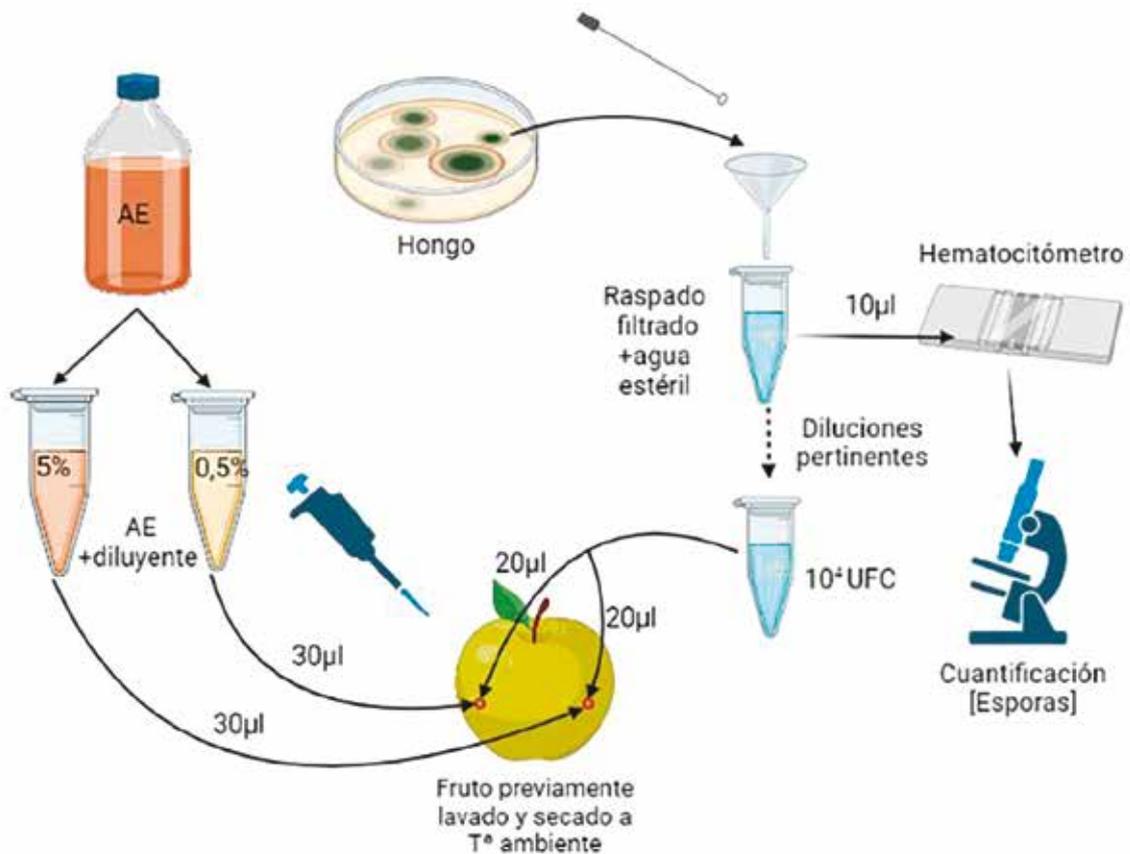
Created in BioRender.com 

Figura 3. Esquema del ensayo *in vivo* llevado a cabo en este trabajo. AE: Aceite Esencial. UFC: Unidades Formadoras de Colonias. [Esporas]: Concentración de esporas de la suspensión del raspado del hongo. Foto: Estación Experimental de Aula Dei (CSIC) y CITA Zaragoza.

Posteriormente, se evaluó *in vivo* la eficacia antifúngica de los AEs procedentes de *M. rotundifolia*, *O. virens* y *V. officinalis* frente los mismos hongos, determinado su capacidad antifúngica postcosecha tras su aplicación sobre manzanas 'Golden Delicious' recién cosechadas. Previamente a comenzar el ensayo, se desecharon aquellos frutos afectados con cualquier tipo de herida, golpe o abrasión superficial. Posteriormente, la superficie de los frutos se desinfectó sumergiendo las manzanas en agua con un 1 % de hipoclorito de sodio durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras un aclarado exhaustivo con agua, se dejaron secar totalmente a 20°C antes del ensayo.

En la zona ecuatorial de cada uno de los frutos, se realizaron dos heridas de unos 2 mm de diámetro, perforando la pulpa del fruto con una aguja estéril (Fig. 3). Para cada uno de los tratamientos con AEs, se inocularon 30 µL de la suspensión al 0,5 % del AE correspondiente en la herida de la izquierda; y 30 µL de la disolución al 5 % del mismo aceite en la herida de la derecha. Se mantuvieron a temperatura ambiente

durante 1 hora y seguidamente se inocularon 20 µL de la suspensión del microorganismo correspondiente en cada una de las heridas. Tras la inoculación, las manzanas fueron almacenadas en arcones de plástico herméticos con papel humedecido en su interior con el fin de mantener una alta humedad relativa y facilitar el crecimiento del hongo. Tras 3, 7 y 10 días, se midió el diámetro del daño generado por el hongo.

Los AEs de *M. rotundifolia*, *O. virens* y *S. officinalis* fueron obtenidos en el Laboratorio de Plantas Aromáticas del CITA en una planta de destilación semi industrial mediante destilación por arrastre de vapor. Esta extracción fue realizada en un rango de presión de

“Estas podredumbres suelen estar causadas por hongos de diversas especies”

vapor de 0,5 a 1 bar. El AE de *V. officinalis* fue adquirido comercialmente. A partir de estos AEs se realizaron suspensiones de concentración 0,5 % y 5 %, utilizando Tween 80 como diluyente (0,05 %) y etanol (3 %) junto a agua estéril (Venturini et al., 2002).

“Los AEs son líquidos oleosos, volátiles y olorosos con propiedades antimicrobianas”

La cepa de *M. fructicola* fue cedida por el grupo de Patología Postosecha del Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (IRTA). Las cepas de *B. cinerea*, *A. alternata*, *P. expansum* y *R. stolonifer* fueron obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Estas cepas se reislaron en placas de Petri con PDA para verificar que se trataba de cultivo puro, y obtener un stock de referencia suficiente para los ensayos a realizar. Las cepas de referencia y su stock se mantuvieron en una estufa a 24°C. El inóculo de cada uno de los hongos se obtuvo mediante raspado superficial, con asa de siembra estéril, de placas Petri con PDA cuyo grado de esporulación estaba en un estado avanzado. Las esporas y micelio obtenidos se

depositaron en un tubo con agua destilada estéril, y se ajustaron las concentraciones a 104 esporas/mL. Esta suspensión final se repartió en alícuotas de 1,5 mL que se mantuvieron en refrigeración hasta su utilización.

“Los AEs tienen compuestos activos como linalol, eugenol, timol, carvacrol, citral y eucaliptol”

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación *in vitro*

En el ensayo de difusión de AEs en disco, todos los AEs fueron efectivos, en mayor o menor medida, frente a *A. alternata* y *M. fructicola*. *B. cinerea* únicamente fue inhibido por *S. officinalis*, mientras que *R. stolonifer* mostró una alta resistencia, no siendo afectado por ninguno de los AEs ensayados.

En el ensayo de dilución de AEs en medio de cultivo PDA, todos los hongos fueron inhibidos frente a los AEs al 10 % de concentración, con la excepción del

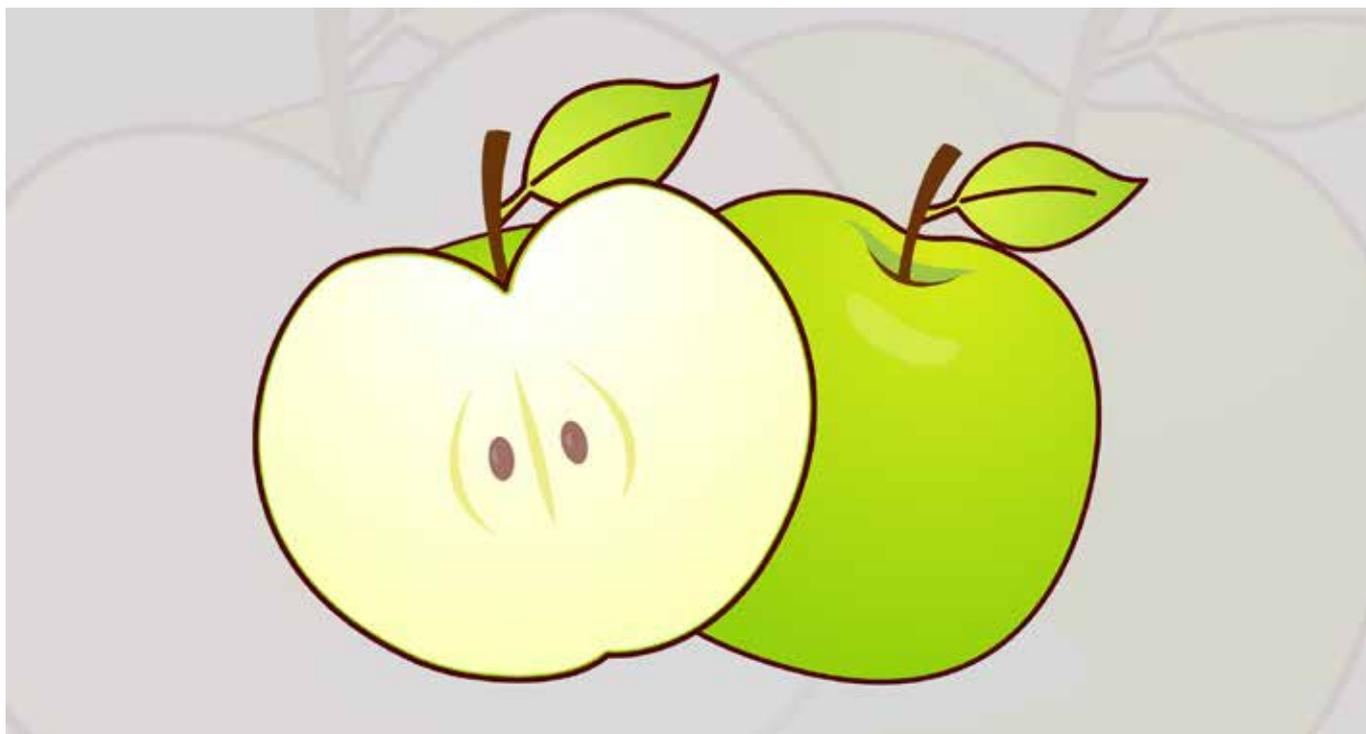




Figura 4. Progresión de la herida tras 10 días en manzanas inoculadas con *P. expansum*; y AE de *M. rotundifolia* al 0,5% (herida de la izquierda) o de *M. rotundifolia* al 5% (herida de la derecha). Foto: Estación Experimental de Aula Dei (CSIC) y CITA Zaragoza.

AE de *S. officinalis*, en cuyas placas se podía visualizar crecimiento de todos los hongos a excepción de *M. fructicola*.

En el ensayo de dilución en caldo PDB se determinó la MIC (concentración mínima inhibitoria) de los AEs frente a cada hongo. El MIC más habitual de los AEs contra los patógenos ensayados fue 0,25 %. Frente a *M. fructicola*, el MIC de *O. virens* y *M. rotundifolia* fue de 0,125 %. *A. alternata* mostró tener una mayor resistencia frente a los AEs con unos valores de MIC de *O. virens* y *S. officinalis* del 1 %.

En el ensayo de germinación de esporas en cultivo DRBC, *M. fructicola* fue inhibido por todos los AEs a concentraciones del 1 y 0,5 %. En el caso de *B. cinérea*, hubo efecto inhibitorio por parte del AE de *O. virens* y *M. rotundifolia* al 1% de concentración. *A. alternata* no

presentó inhibición en la generación de esporas frente a ninguno de los 4 AEs.

“Para el estudio in vitro se usaron diferentes métodos, como la difusión de AEs en disco”

Evaluación in vivo

Los ensayos in vivo determinaron que los AEs de plantas aromáticas tienen un potencial como tratamiento frente a la actividad antifúngica de los hongos más comunes en postcosecha. Sin embargo, y como se esperaba, el efecto antifúngico a las concentraciones estudiadas (entre 0.5 % y 5 %) es

menor que el efecto antifúngico de los tratamientos realizados con fungicidas de síntesis.

“El tratamiento con AE de *M. rotundifolia* al 5 % fue uno de los más efectivos”

El tratamiento con AE de *M. rotundifolia* al 5 % fue uno de los más efectivos entre los AEs probados, especialmente frente a las infecciones de *A. alternata* y *P. expansum* (Fig. 4). El tratamiento con *O. virens* al 5 % y el de *V. officinalis* al 5 % también mostró un control de la infección de *M. fructicola*. Por otro lado, el AE de *S. officinalis* presentó una capacidad antifúngica menor que el resto de los AEs. Sin embargo, *R. stolonifer* resultó ser el hongo más resistente siendo el menos afectado por los AEs ensayados como control postcosecha.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo demostraron que los AEs de *M. rotundifolia* y *O. virens* al 5 % pueden ser una alternativa frente a los fungicidas químicos para el control de algunas de las podredumbres postcosecha más comunes en manzana. Por el contrario, el AE de *S. officinalis* demostró la menor capacidad antifúngica entre los AEs estudiados.

Los resultados de este trabajo mostraron también que la capacidad antifúngica de los AEs de plantas aromáticas, a las concentraciones a las que se puede trabajar con ellos sin tener efectos secundarios negativos en la fruta, es menor que la de los fungicidas de síntesis utilizados convencionalmente.

A pesar de ello, este trabajo demuestra que la utilización de AEs es actualmente una línea de investigación con un gran interés y potencial para su aplicación inmediata en la industria agroalimentaria por tratarse de un tratamiento natural, sin residuos, respetuoso con el medio ambiente y con la salud del consumidor, y perfectamente compatible con agricultura ecológica, la economía circular y la utilización de subproductos.

“La capacidad antifúngica de los AEs de plantas aromáticas es menor que la de los fungicidas de síntesis”

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). ■

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Elshafie, H.S., Mancini, E., Sakr, S., De Martino, L., Mattia, C.A., De Feo, V., 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. 929-934. doi:10.1089/jmf.2014.0167.
- (2) El Khetabi, A., Ezrari, S., El Ghadraoui, L., Tahiri, A., Ait Haddou, L., Belabess, Z., Merah, O., Lahlali, R. (2021). In vitro and in vivo antifungal activities of nine commercial essential oils against brown rot in apples. *Horticulturae*, 7(12), pp. 545-563. doi:10.3390/horticulturae7120545.
- (3) Camele, I., Altieri, L., De Martino, L., De Feo, V., Mancini, E., Rana, G.L. (2012). In vitro control of post-harvest fruit rot fungus by some

plant essential oil components. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2), pp. 2290-2300. doi:10.3390/ijms13022290.

- (4) Venturini, M.E., Blanco, D., 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.

- (5) 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.