

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**  
**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN RECURSOS Y TECNOLOGÍAS AGRARIAS,  
AGROAMBIENTALES Y ALIMENTARIAS

---



**Tratamientos pre-cosecha y post-cosecha con elicitores para la  
mejora de la calidad en limón ecológico**



---

**TESIS DOCTORAL**

**VICENTE SERNA ESCOLANO**

**2021**

**DIRECTOR:**

**DOMINGO JESÚS MARTÍNEZ ROMERO**

**CODIRECTOR:**

**JUAN MIGUEL VALVERDE VERACRUZ**



Esta Tesis Doctoral, titulada “tratamientos precosecha y postcosecha con elicitores para la mejora de la calidad en limón ecológico”, se presenta bajo la modalidad de **tesis por compendio de** las siguientes **publicaciones**:

**Serna-Escolano, V.**, Valverde, J. M., García-Pastor, M. E., Valero, D., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Zapata, P. J., & Serrano, M. (2019). Pre-harvest methyl jasmonate treatments increase antioxidant systems in lemon fruit without affecting yield or other fruit quality parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99: 5035-5043. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9746>

**Serna-Escolano, V.**, Giménez, M. J., Castillo, S., Valverde J. M., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Serrano, M., Valero, D., & Zapata, P. J. (2021). Preharvest treatment with oxalic acid improves postharvest storage of lemon fruit by stimulation of the antioxidant system and phenolic content. *Antioxidants*, 10: 963. <https://doi.org/10.3390/antiox10060963>

**Serna-Escolano, V.**, Serrano, M., Valero, D., Rodríguez-López, M. I., Gabaldón, J. A., Castillo, S., Guillén, F., Zapata, P. J., & Martínez-Romero, D. (2019). Effect of thymol and carvacrol encapsulated in HP- $\beta$ -Cyclodextrin by two inclusion methods against *Geotrichum citri-aurantii*. *Journal of Food Science*, 84: 1513-1521. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14670>

**Serna-Escolano, V.**, Serrano, M., Valero, D., Rodríguez-López, M. I., Gabaldón, J. A., Castillo, S., Valverde, J. M., Zapata, P. J., Guillén, F., & Martínez-Romero, D. (2020). Thymol encapsulated into HP- $\beta$ -Cyclodextrin as an alternative to synthetic fungicides to induce lemon resistance against sour rot decay. *Molecules*, 25: 4348. <https://doi.org/10.3390/molecules25184348>





El Dr. D. *Domingo Jesus Martínez Romero*, director, y el Dr. D. *Juan Miguel Valverde Veracruz*, codirector de la tesis doctoral titulada **“Tratamientos pre-cosecha y post-cosecha con elicitors para la mejora de la calidad en limón ecológico”**

**INFORMAN:**

Que D. *Vicente Serna Escolano* ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado **“Tratamientos pre-cosecha y post-cosecha con elicitors para la mejora de la calidad en limón ecológico”** conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmamos para los efectos oportunos, en Orihuela a 13 de septiembre de 2021

Director de la tesis  
Dr. D. Domingo Jesús Martínez Romero

Codirector  
Dr. D. Juan Miguel Valverde Veracruz

**Dr. Dña. Juana Fernández López**, Catedrática de Universidad y Coordinadora del Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías Agrarias, Agroambientales y Alimentarias (ReTos-AAA) de la Universidad MiguelHernández de Elche (UMH),

**CERTIFICA:**

Que la Tesis Doctoral titulada “**Tratamientos pre-cosecha y post-cosecha conelicitores para la mejora de la calidad en limón ecológico** “ de la que es autor el Licenciado en Biología, D. Vicente Serna Escolano, ha sido realizada bajo la dirección del **Dr. Domingo Jesús Martínez Romero** y la codirección del **Dr. Juan Miguel Valverde Veracruz**, actuando como tutor de la misma el Dr. Pablo Melgarejo Moreno. Considero que la Tesis es conforme, en cuanto a forma y contenido, a los requerimientos del Programa de Doctorado ReTos-AAA, siendo por tanto apta para su exposición y defensa pública.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente certificado en Orihuela a 13 de septiembre de 2021.

Dra. Dña. Juana Fernández López  
Coordinadora del Programa Doctorado ReTos-AAA



---

# **INDICE DE CALIDAD DE LAS PUBLICACIONES**

---





---

**Pre-harvest methyl jasmonate treatments increase antioxidant systems in  
lemon fruit without affecting yield or other fruit quality parameters**

---

**Autores**

Vicente Serna-Escolano, Juan Miguel Valverde, María E García-Pastor, Daniel Valero, Salvador Castillo, Fabián Guillén, Domingo Martínez-Romero, Pedro Javier Zapata y María Serrano

**Revista**

Journal of the Science of Food and Agriculture

**DOI**

10.1002/jsfa.9746

**Editor**

Mark Shepherd and Andrew Waterhouse

**ISSN**

1097-0010

**Ámbito de la publicación (categoría JCR)**

Agriculture, Multidisciplinary

**Cuartil**

Q1

**Factor de impacto**

2.614 (2019)

**Factor de impacto (últimos 5 años)**

2.945

**Rango**

8/58

---

**Pre-harvest treatment with oxalic acid improves postharvest storage of lemon fruit by stimulation of the antioxidant system and phenolic content**

---

**Autores**

Vicente Serna-Escolano, María José Giménez, Salvador Castillo, Juan Miguel Valverde, Domingo Martínez-Romero, Fabián Guillén, María Serrano, Daniel Valero and Pedro Javier Zapata.

**Revista**

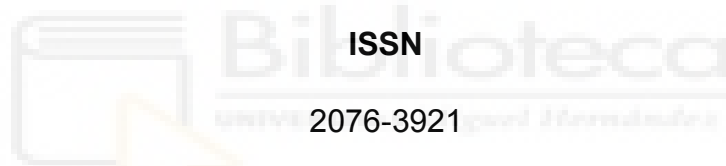
Antioxidants

**DOI**

10.3390/antiox10060963

**Editor**

Prof. Dr. Isabel C.F.R. Ferreira



**Ámbito de la publicación (categoría JCR)**

Food Science & Technology

**Cuartil**

Q1

**Factor de impacto**

5.014 (2019)

**Factor de impacto (últimos 5 años)**

-

**Rango**

10/139

---

**Effect of thymol and carvacrol encapsulated in Hp-B-Cyclodextrin by two inclusion methods against *Geotrichum citri-aurantii***

---

**Autores**

Vicente Serna-Escolano, María Serrano, Daniel Valero, María Isabel Rodríguez-López, José Antonio Gabaldón, Salvador Castillo, Fabián Guillén, Pedro Javier Zapata, Domingo Martínez-Romero

**Revista**

Journal of Food Science

**DOI**

10.1111/1750-3841.14670

**Editor**

Richard W. Hartel

**ISSN**

1750-3841

**Ámbito de la publicación (categoría JCR)**

Food Science & Technology

**Cuartil**

Q2

**Factor de impacto**

2.479 (2019)

**Factor de impacto (últimos 5 años)**

2.694

**Rango**

55/139

---

**Thymol encapsulated into HP- $\beta$ -Cyclodextrin as an alternative to synthetic fungicides to induce lemon resistance against sour rot decay**

---

**Autores**

Vicente Serna-Escolano, María Serrano, Daniel Valero, María Isabel Rodríguez-López, José Antonio Gabaldón, Salvador Castillo, Juan Miguel Valverde, Pedro Javier Zapata, Fabián Guillén y Domingo Martínez-Romero

**Revista**

Molecules

**DOI**

10.3390/molecules25184348

**Editor**

Dr. Derek J. McPhee



**Ámbito de la publicación (categoría JCR)**

Chemistry, Multidisciplinary

**Cuartil**

Q2

**Factor de impacto**

3.267 (2019)

**Factor de impacto (últimos 5 años)**

3.589

**Rango**

70/177





Esta tesis ha sido posible gracias al convenio 25HZ0059PD firmado entre la Universidad Miguel Hernández de Elche y la empresa Mundosol Quality S.L.



# ÍNDICE

---

LISTADO DE ABREVIATURAS.....	19
RESUMEN.....	23
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	32
1.1. LA AGRICULTURA ECOLÓGICA EN ESPAÑA.....	32
1.2. CONTEXTO SOCIOECONÓMICO DEL CULTIVO DE CÍTRICOS .....	33
1.3. CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO .....	35
1.3.1 Origen del limonero .....	35
1.3.2. El limonero .....	36
1.3.3. Portainjerto.....	39
1.3.4. Estructura y composición del limón .....	40
1.3.5. Proceso de maduración del limón .....	43
1.4. LA POST-COSECHA EN CÍTRICOS .....	44
1.4.1. Recolección, procesado y distribución del fruto .....	44
1.4.2. Desverdizado .....	46
1.4.3. Conservación .....	47
1.5. PRINCIPALES FISIOPATÍAS Y DAÑOS POST-COSECHA.....	47
1.5.1. Daños por frío.....	47
1.5.2. Oleocelosis.....	48
1.5.3. Peteca.....	49
1.6. PRINCIPALES HONGOS QUE PRODUCEN PODREDUMBRES EN LIMÓN .....	49
1.7. TECNOLOGÍAS POST-COSECHA PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES .....	52
1.7.1. Plaguicidas tradicionales.....	53
1.7.2. Métodos alternativos de control post-cosecha.....	55
1.8. ACEITES ESENCIALES.....	57
1.9. CICLODEXTRINAS .....	61
1.9.1. Complejación por el método ‘Slurry’ .....	63
1.9.2. Complejación por irradiación por microondas.....	64
1.9.3. Co-precipitación.....	64



1.9.4. Complejación en pasta .....	64
1.9.5. Mezcla húmeda y calefacción .....	65
1.9.6. Mezcla en seco.....	65
1.10. ELICITORES.....	65
1.10.1. Jasmonatos .....	66
1.10.2. Ácido oxálico .....	68
1.10.3. Salicilatos .....	70
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS .....	74
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	79
3.1. MATERIAL VEGETAL Y DISEÑO EXPERIMENTAL DE LOS TRATAMIENTOS PRE-COSECHA.....	79
3.2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS .....	83
3.2.1. Tasa de respiración .....	83
3.2.2. Pérdida de peso .....	84
3.2.3. Color .....	85
3.2.4. Textura.....	85
3.2.5. Procesado de muestras.....	85
3.2.6. Sólidos solubles totales .....	86
3.2.7. Acidez titulable .....	86
3.2.8. Fenoles totales .....	86
3.2.9. Enzimas antioxidantes.....	87
3.2.10. Proteínas.....	89
3.3. MÉTODOS DE ENCAPSULACIÓN .....	89
3.4. CEPAS MICROBIANAS .....	91
3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LOS ENSAYOS <i>IN VITRO</i> .....	94
3.5.1. Ensayos <i>in vitro</i> con Timol y Carvacrol encapsulados en HP- $\beta$ -CDs sobre <i>Geotrichum citri-aurantii</i> .....	94
3.5.2. Estudio <i>in vivo</i> del efecto de Timol encapsulado en HP- $\beta$ -CDs sobre limones inoculados con <i>Geotrichum citri-aurantii</i> .....	96
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	98
CAPÍTULO 4. PUBLICACIONES.....	101

4.1. Pre-harvest methyl jasmonate treatments increase antioxidant systems in lemon fruit without affecting yield or other fruit quality parameters.....	101
4.2. Preharvest treatment with oxalic acid improves postharvest storage of lemon fruit by stimulation of the antioxidant system and phenolic content .....	123
4.3. Effect of thymol and carvacrol encapsulated in HP- $\beta$ -Cyclodextrin by two inclusion methods against <i>Geotrichum citri-aurantii</i> .....	146
4.4. Thymol encapsulated into HP- $\beta$ -Cyclodextrin as an alternative to synthetic fungicides to induce lemon resistance against sour rot decay through increasing phenolic and antioxidant enzymes .....	175
CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	200
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.....	212
CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA.....	216
AGRADECIMIENTOS .....	240



## LISTADO DE ABREVIATURAS

---

$\alpha$ -ALe:  $\alpha$ -linoleico

ABA: ácido abscísico

AEs: aceites esenciales

AJ: ácido jasmónico

AJ-Ile: jasmónico-isoleucina

AO: ácido oxálico

AP: agua de peptona

APD: agar de patata dextrosa

APX: ascorbato peroxidasa

AT: acidez titulable

ATP: adenosin trifosfato

BSA: seroalbúmina bovina

CAECV: comité de agricultura ecológica de la Comunidad Valenciana

CAT: catalasa

CDs: ciclodextrinas

CFT: contenido en fenoles totales

DOUE: diario oficial de la Unión Europea

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FDA: American Food and Drug Administration

GRAS: compuestos reconocidos como seguros

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno

HP- $\beta$ -CDs: hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrinas

IPP: isopentenil pirofosfato

JaMe: jasmonato de metilo

MAP: atmósfera modificada

MIC: concentración mínima inhibitoria

mM: milimolar

MO: irradiación por microondas

MPD: medio de patata dextrosa

OPDA: 12-oxofitodienoico

PAL: fenilalanina amonio liasa

POD: peroxidasa

PVP: polivinilpirrolidona

ROS: especie reactiva del oxígeno

S: slurry

SOD: superóxido dismutasa

SST: sólidos solubles totales

T: tratamiento

TCD: detector de conductividad térmica

UV: ultravioleta

UV-C: ultravioleta tipo C

VIS: visible



# RESUMEN

---

## ABSTRACT





## RESUMEN

---

El limón (*Citrus limon* (L.) Burm. F) es un fruto muy apreciado por los consumidores de todo el mundo por su apariencia, frescura, sabor y aroma característicos que lo convierten en un ingrediente imprescindible en cocina. Además, es un fruto con un elevado contenido en compuestos bioactivos con actividad antioxidante. Recientemente, se han comenzado a desarrollar diferentes estrategias pre-cosecha que mejoran los atributos de calidad de los limones en el momento de la recolección. El jasmonato de metilo (JaMe) y el ácido oxálico (AO) son compuestos presentes en las plantas de forma natural, los cuales han mostrado que utilizados en pre-cosecha mejoran la calidad post-cosecha de los frutos. Sin embargo, esta estrategia debe ser complementada con otras que mantengan la mejora en la calidad conseguida con los tratamientos pre-cosecha durante las etapas de almacenamiento y comercialización. En este caso, los aceites esenciales (AEs) están formados por un conjunto de compuestos que presentan una actividad antimicrobiana elevada, y que aplicados de forma adecuada son capaces de controlar el crecimiento de los microorganismos, además son reconocidos como sustancias seguras (GRAS) para la salud y el medioambiente. Pero tienen ciertos inconvenientes, como una elevada volatilidad, baja estabilidad y poca solubilidad en agua. Por lo tanto, se han utilizado ciclodextrinas para formar complejos con estos compuestos y corregir las limitaciones mencionadas previamente.

En esta Tesis Doctoral se evaluó el efecto de los tratamientos pre-cosecha con jasmonato de metilo (JaMe) y ácido oxálico (AO) sobre la producción del árbol (kilogramos por árbol, número de frutos por árbol y peso medio de los frutos) y la calidad organoléptica (color y firmeza), nutritiva (contenido en sólidos solubles totales, (SST) y acidez total, (AT)) y funcional (contenido en fenoles totales, (CFT)) de los limones, durante el crecimiento y maduración del fruto en el árbol, en el momento de la recolección y durante 35 días de almacenamiento refrigerado. Además, también se valoró el efecto de los tratamientos pre-cosecha sobre la actividad de las enzimas antioxidantes ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT) y peroxidasa (POD), por su relación con los procesos de maduración y senescencia del fruto. Los ensayos

se realizaron durante cinco años consecutivos, en el periodo 2016-2020, utilizando dos variedades, 'Fino' injertado sobre *Citrus macrophylla* y 'Verna' injertado sobre *Citrus aurantium*.

Por otra parte, se seleccionaron los monoterpenos aromáticos timol y carvacrol, como los compuestos ideales para formar los complejos con hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrinas (HP- $\beta$ -CDs) utilizando dos metodologías de inclusión diferentes microondas (MO) y 'Slurry' (S). Para realizar estos experimentos se escogió el hongo fitopatógeno *Geotrichum citri-aurantii*, debido a su difícil control en las centrales hortofrutícolas por la ausencia de tratamientos efectivos. Se midió el 50 % de la dosis efectiva, la concentración mínima inhibitoria, la concentración mínima fungicida y la concentración necesaria de timol y carvacrol encapsulados en HP- $\beta$ -CDs para reducir el crecimiento de *G. citri-aurantii* un 90 %. Finalmente, también se evaluó el efecto de aplicar timol-HP- $\beta$ -CD antes (preventivo) y después (curativo) de realizar la inoculación con *G. citri-aurantii* en limones de la variedad 'Fino'. Se midió el efecto de este tratamiento sobre las pérdidas de peso e incidencia de podredumbres, además del CFT y la actividad de las enzimas antioxidantes (CAT, POD y APX) en el flavedo del fruto.

En primer lugar se aplicaron los tratamientos pre-cosecha con los elicitores, JaMe y AO a las concentraciones 0,1, 0,5 y 1 mM, mensualmente mediante pulverización, comenzando cuando el árbol presentaba la carga total de frutos y finalizando tres días antes de la recolección en las variedades 'Fino' y 'Verna'. Los resultados mostraron que la mejor concentración para JaMe fue 0,1 mM, incrementando el CFT y la actividad de las enzimas antioxidantes desde el primer tratamiento, este efecto se mantuvo durante toda la etapa de crecimiento y maduración del fruto en el árbol hasta su recolección, incluyendo el almacenamiento refrigerado, sin que la producción del árbol y los parámetros de calidad del fruto se vieran afectados. Mientras, para el AO la mejor concentración fue de 1 mM, como sucedía con JaMe, se observó un aumento del CFT y de la actividad de las enzimas antioxidantes desde el primer tratamiento hasta el final del experimento, además en este caso también se observó un efecto sobre algunos parámetros de calidad del limón en el momento de la recolección y durante el almacenamiento refrigerado,



manteniendo la firmeza, el contenido en SST y la AT más elevada que los frutos que no fueron tratados. Estos efectos se consiguieron sin afectar negativamente a la producción de los árboles.

Al mismo tiempo se iniciaron los experimentos con los monoterpenos aromáticos timol y carvacrol encapsulados en HP- $\beta$ -CDs utilizando dos métodos MO y S, a las concentraciones 0, 2,5, 5, 12, 25 y 50 mM. Se evaluó el efecto sobre el crecimiento del hongo *G. citri-aurantii* y se observó que el método de inclusión más adecuado, independientemente de la concentración utilizada era el de MO, y que timol era más efectivo que carvacrol para controlar el desarrollo de *G. citri-aurantii*. Se pudo concluir que el complejo formado con timol-HP- $\beta$ -CD a concentraciones superiores a 6 mM disminuía el crecimiento del hongo más de un 90 %. Además, se observó que los complejos formados con timol, carvacrol y las ciclodextrinas fueron capaces de mantener su efectividad controlando el crecimiento del hongo durante aproximadamente el doble de tiempo que cuando se aplicaban los compuestos puros.

Tras los resultados observados previamente, se seleccionó el complejo timol-HP- $\beta$ -CD a las concentraciones 25 y 50 mM para iniciar un experimento post-cosecha con limón de la variedad 'Fino'. Los limones fueron tratados con timol-HP- $\beta$ -CD antes (preventivo) y después (curativo) de ser inoculados con *G. citri-aurantii*, además se incorporó un tercer tratamiento con propiconazol, el único compuesto comercial recomendado para el control de *G. citri-aurantii* en aquel momento. Los resultados mostraron que aplicado de forma preventiva, el tratamiento más efectivo para controlar el crecimiento del hongo era timol-HP- $\beta$ -CD a la concentración 50 mM, con una reducción aproximada del 60 % en la incidencia de podredumbres y un 30 % en la severidad de los síntomas respecto a los frutos sin tratamiento. Las menores pérdidas de peso se observaron en los limones tratados con timol-HP- $\beta$ -CD 50 mM, lo que se pudo relacionar con una reducción en la tasa de respiración de aproximadamente un 55 % respecto a los controles. Finalmente, el CFT y la actividad de las enzimas antioxidantes (CAT, POD y APX) también fueron superiores en los limones que habían sido tratados con timol-HP- $\beta$ -CD 50 mM.

Por lo tanto, los tratamientos con JaMe y AO podrían ser aplicados en pre-cosecha con el objetivo de mejorar los parámetros de calidad y las

propiedades antioxidantes de los limones en el momento de la recolección y durante el almacenamiento refrigerado. Al mismo tiempo, si se aplica timol-HP- $\beta$ -CD en post-cosecha se podría mantener ese mejor estado inicial del fruto durante más tiempo, a la vez que se limita el ataque de patógenos de origen fúngico.

Estos resultados se han publicado en Journal of the Science of Food and Agriculture (Serna-Escolano y col., 2019), Journal of Food Science (Serna-Escolano y col., 2019), Molecules (Serna-Escolano y col., 2020) y Antioxidants (Serna-Escolano y col., 2021).



## ABSTRACT

---

Lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. F) is a fruit highly appreciated by consumers around the world for its characteristic such as appearance, freshness, flavor and aroma that make it an essential ingredient for cooking. Besides, it is a fruit with many bioactive compounds and with high antioxidant activity. Recently, different pre-harvest strategies have been developed for improving the quality attributes of lemons at harvest time. Methyl jasmonate (MeJa) and oxalic acid (OA) are compounds naturally present in plants, which improve the post-harvest quality of the fruits when are used in pre-harvest. However, this strategy must be complemented with others that maintain the improvement in quality achieved with the pre-harvest treatments during the storage and commercialization stages. Essential oils (EOs) are made up of a set of compounds that have high antimicrobial activity and that are capable of controlling the growth of microorganisms when are applied properly. But they have certain drawbacks, such as high volatility, low stability and poor solubility in water. Therefore, cyclodextrins have been used to complex these compounds and correct the previously mentioned limitations.

In this Doctoral Thesis, the effect of the pre-harvest treatments with methyl jasmonate (MeJa) and oxalic acid (OA) on the yield of each tree (kilograms per tree, number of fruits per tree and average weight of the fruits) was evaluated. Also, the organoleptic (colour and firmness), nutritional characteristics (total soluble solids, (TSS) and total acidity, (TA)) and functional quality (total phenolics content, (TFC)) of the fruit during 35 days of storage at 10 °C were measured. Besides, it was evaluated the effect of pre-harvest treatments on the activity of the antioxidant enzymes ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) and peroxidase (POD), related to the ripening and senescence processes of the fruit. The experiments were carried out for five consecutive years, in the period 2016-2020, using two varieties: 'Fino' grafted on *Citrus macrophylla* rootstock and 'Verna' grafted on *Citrus aurantium* rootstock.

On the other hand, the aromatic monoterpenes thymol and carvacrol were selected as the best compounds to take part in the complexes with

hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrins (HP- $\beta$ -CDs) using two different inclusion methods: microwave (MW) and 'Slurry' (S). The phytopathogenic fungus *Geotrichum citri-aurantii* was chosen to carry out these experiments due to the lack of effective treatments to control it. In these experiments the 50% of effective dose, the minimum inhibitory concentration, the minimum fungicidal concentration and the necessary concentration of thymol and carvacrol encapsulated in HP- $\beta$ -CDs to reduce the growth of *G. citri-aurantii* by 90% were measured. Finally, the effect of applying thymol-HP- $\beta$ -CD before (preventive) and after (curative) the inoculation with *G. citri-aurantii* in 'Fino' lemon fruits was observed. These effects were evaluated by measuring weight loss and incidence of rotting, functional (CFT) and antioxidant (APX, CAT and POD enzymes) quality of fruit.

The pre-harvest treatments were applied by spraying using the elicitors MeJa and OA at concentrations 0.1, 0.5 and 1 mM, starting when the tree had the final load of fruits (after the physiological drop) and ending three days before harvest in 'Fino' and 'Verna'. The results showed that the best concentration for MeJA was 0.1 mM, increasing the CFT and the activity of the antioxidant enzymes from the first treatment. This effect was maintained throughout the growth and maturation stages on tree including harvesting and the storage period at 10 °C. However for OA the best concentration was 1 mM, increasing the CFT and the activity of the antioxidant enzymes from the first treatment to the end of the experiment. Fruits from OA treated trees had better quality parameters at harvest and during storage at 10 °C, maintaining the firmness, the TSS and the TA higher than the untreated fruits. These effects were achieved without affecting negatively the production of the trees.

The effect of applying the EOs-HP- $\beta$ -CDs at 0, 2.5, 5, 12, 25 and 50 mM on the growth of *G. citri-aurantii* was evaluated. The most effective inclusion method was MW, and thymol was more effective than carvacrol to control the development of *G. citri-aurantii*. It could be concluded that thymol-HP- $\beta$ -CD at concentrations higher than 6 mM decreased the growth of the fungus more than 90 %. Furthermore, it was noted that thymol and carvacrol encapsulated were able to maintain their effectiveness by controlling the growth of the fungus for approximately twice as long as when the pure compounds were applied.

Thymol-HP- $\beta$ -CD was applied by spraying at concentrations of 25 and 50 mM and fruits were treated before (preventive) and after (curative) being inoculated with *G. citri-aurantii*. Furthermore, propiconazole was included in the experiment as a commercial solution for the control of fungi. The results showed that the most effective treatment to control the development of the *G. citri-aurantii* was thymol-HP- $\beta$ -CD at 50 mM, decreasing a 60 % of rot incidence and reducing the severity of symptoms a 30 % compared to the others treatments. The lowest weight losses were observed in fruits treated with thymol-HP- $\beta$ -CD 50 mM, which could be related to a 55 % reduction in respiration rate. Finally, the TFC and the activity of the antioxidant enzymes (CAT, POD and APX) were also higher in the flavedo of fruits treated with thymol-HP- $\beta$ -CD 50 mM.

MeJA and OA treatments could be applied in pre-harvest in order to improve the quality parameters and antioxidant properties of fruit at harvest and during storage. On the other hand, thymol-HP- $\beta$ -CD applied in post-harvest, could be an effective strategy to maintain the quality of fruit for a longer period, reducing the incidence of phytopathogenic fungi.

These results have been published in the Journal of the Science of Food and Agriculture (Serna-Escolano et al., 2019), Journal of Food Science (Serna-Escolano et al., 2019), Molecules (Serna-Escolano et al., 2020) and Antioxidants (Serna-Escolano et al., 2021).

---

# CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

---





# **CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1. LA AGRICULTURA ECOLÓGICA EN ESPAÑA**

La agricultura es un sector clave en la economía de muchos países desarrollados, la cual se encuentra en un constante proceso de cambio y modernización que garantice su viabilidad a largo plazo (Tsvetkkov y col., 2017). Según el Comité de Agricultura Ecológica de la Comunidad Valenciana (CAECV, 2020), la Agricultura Ecológica se define como un sistema de producción y elaboración que tiene como objetivo la obtención de alimentos de óptima calidad, libres de residuos y que garantice al mínimo el impacto sobre el medio ambiente. Para conseguirlo, se promueve la utilización sostenible de los recursos naturales, asumiendo que la naturaleza y el medio ambiente no son una fuente inagotable de recursos, lo que contribuye a preservar la biodiversidad vegetal y animal. Además, se fomenta una producción basada en el aprovechamiento de los ecosistemas, sin que estos sean sometidos a un proceso de sobreexplotación (Tsvetkkov y col., 2017). Adquiriere una especial importancia el manejo de la biodiversidad y de los ciclos biológicos locales, por lo tanto, es necesario un desarrollo científico que dote al sistema del conocimiento y de las herramientas adecuadas para su optimización (Smith y col., 2019). Por lo tanto, la Agricultura Ecológica combina la tradición con la innovación con el objetivo de favorecer no sólo una mayor sostenibilidad sino promover unas relaciones más equitativas en toda la cadena de producción y consumo.

La Agricultura Ecológica es un modelo de producción con unas bases técnicas y una normativa única. En la actualidad la producción ecológica está regulada por el Reglamento (CE) 834/2007 y por el Reglamento (CE) 889/2008, los cuales establecen las principales disposiciones de aplicación respecto a la producción ecológica, su etiquetado y control, además el Reglamento (CE) 1235/2008 complementa los requisitos sobre las importaciones de productos ecológicos procedentes de terceros países. Además, el 14 de junio se publicó en el Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE) el Reglamento (UE) 848/2018 del Parlamento Europeo sobre producción ecológica y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el Reglamento (CE) 834/2007 del



Consejo el cual entrará en vigor el 1 de enero de 2021. Sin embargo, ante la magnitud de la pandemia de COVID-19 y la crisis de salud pública acontecida la aplicación del Reglamento (UE) 848/2018 ha sido aplazado un año hasta el 1 de enero de 2022. También se prórroga hasta el 1 de febrero de 2021 las excepciones temporales a los Reglamentos (CE) 889/2008 y 1235/2008.

## 1.2. CONTEXTO SOCIOECONÓMICO DEL CULTIVO DE CÍTRICOS

Según la Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura los principales cítricos producidos y comercializados por orden de importancia son las naranjas, mandarinas, limones, limas y pomelos con una superficie plantada de 8.7 millones de hectáreas y una producción anual de 124 millones de toneladas, aproximadamente en todo el mundo (FAOSTAT, 2019). En España se destina una superficie de 0.3 millones de hectáreas al cultivo de cítricos, con una producción de 6.2 millones de toneladas en 2019 (MAPA, 2019), posicionándose como uno de los países productores más importantes a nivel mundial. La naranja representa el 50 % de la producción, seguida de la mandarina con un 25 % y el limón con un 20 %, finalmente pomelos y otros frutos cítricos minoritarios representan alrededor del 5 % como se puede apreciar en la Tabla 1.1.

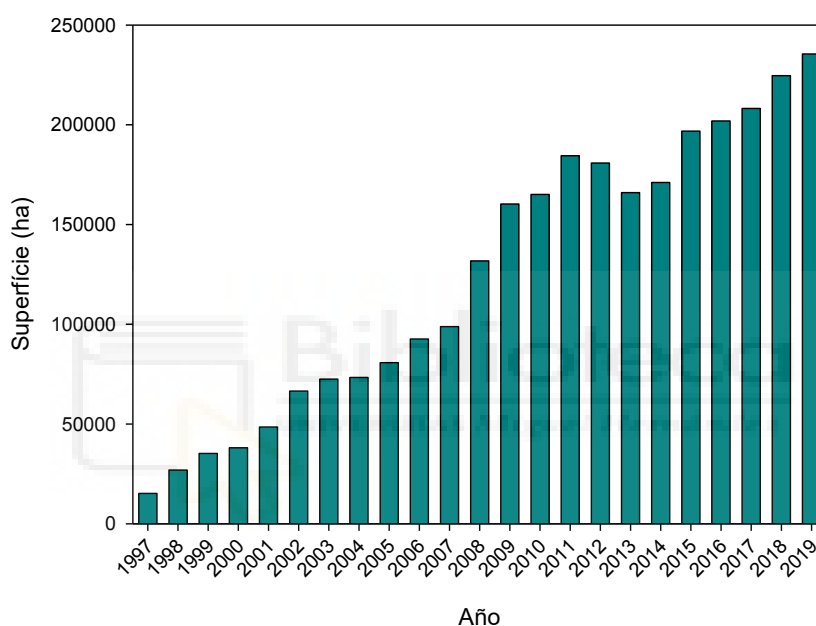
**Tabla 1.1.** Posición de España en la producción mundial de cítricos. Fuente: FAO, 2019.

Naranjas		Mandarinas		Limones/Limas		Pomelos	
País	miles tons	País	miles tons	País	miles tons	País	miles tons
1. Brasil	14350	1. China	19000	1. India	2613	1. China	4300
2. China	7000	<b>2. España</b>	2222	2. China	2405	2. EEUU	735
3. India	6850	3. Japón	1115	3. Mexico	2270	3. Vietnam	480
4. EEUU	5471	4. Marruecos	1065	4. Argentina	1500	4. Indonesia	460
<b>5. España</b>	3641	5. Turquía	1040	<b>6. España</b>	1050	<b>10. España</b>	85

En el mundo el cultivo ecológico de cítricos representa el 0,9 % de la superficie total dedicada a la producción de cítricos. La naranja se mantiene como el fruto mayoritario con un 48 % de la producción total, seguida de limones y limas con un 21%, pomelos un 5 % y mandarinas un 3 %, siendo el 23 % restante desconocido. Más de la mitad de la superficie de cítricos

ecológicos en el mundo se localiza en Europa, con una extensión de 55.081 ha, siendo los países productores principales Italia y España con 40.000 ha y 17.000 ha, respectivamente (EUROSTAT, 2019).

La evolución de la producción ecológica en España mostró un incremento sostenido desde el año 1997 hasta 2010, sin embargo, la velocidad de crecimiento se ralentizó hasta 2015, momento en el que se inició de nuevo un periodo de crecimiento hasta la actualidad tal y como se puede apreciar en la figura 1.1.



**Figura 1.1.** Evolución de la superficie dedicada a producción ecológica en el período 1997-2019 en España. Fuente: MAPA, 2019.

El cultivo de frutos cítricos representa el 2,8 % de la superficie total dedicada a producción ecológica en España, con un aumento interanual del 19 % desde 2018. En cuanto al limón, las comunidades autónomas con mayor superficie plantada por orden de importancia son la Región de Murcia con 2800 ha, seguida de Andalucía con 2200 ha y la Comunidad Valenciana con 1800 ha, lo que representa una producción conjunta aproximada de 120.000 toneladas (MAPA, 2019). En los últimos 10 años, de 2010 a 2020, el limón convencional ha tenido un precio medio de 0,25 €/ Kg, siendo ligeramente superior para el limón ecológico con una cotización media de 0,40 €/ Kg (Ailimpo, 2020).

## 1.3. CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO

### 1.3.1 Origen del limonero

Los cítricos actuales se originaron en el sureste asiático, a partir de cinco especies ancestrales; *Citrus medica*, *Citrus micrantha*, *Citrus máxima*, *Citrus reticulata* y *Fortunella* sp como se puede observar en la Figura 1.2. A través del estudio de los marcadores cloroplásticos y nucleares se estableció que los limoneros modernos surgieron a partir del cruce directo entre *Citrus medica* y *C. aurantium* (García-Lor y col., 2013; Wu y col., 2018). El limonero fue introducido en Europa a través de Grecia a finales del siglo IV a. C, sin embargo, a España llegó por el Norte de África con los árabes al mismo tiempo que el naranjo amargo, siendo los primeros escritos que lo mencionan del siglo XII (Zech-Matterne y Fiorentino., 2014). Su producción fue ornamental hasta que en el siglo XVIII se comenzaron a recolectar las primeras plantaciones en la región mediterránea, por lo tanto, se considera un cultivo con una tradición destacada (García-Lidón y col., 2003). Cuyo fruto, el limón, es muy apreciado por los consumidores de todo el mundo debido a sus propiedades sensoriales, nutricionales y las relacionadas con la medicina tradicional (Klimek-Szczykutowicz y col., 2020).



**Figura 1.2.** Distribución de las especies ancestrales que dieron lugar a los cítricos actuales. Fuente: López-García y col., 2017.

### 1.3.2. El limonero

El limonero (*Citrus limon* (L.) Burm. f) pertenece a la división *Magnoliophyta*, clase *Magnoliopsoda*, orden *Sapindales*, familia *Rutaceae*, subfamilia *Aurantioideae*, tribu *Citreae*, subtribu *Citrinae*, y al género *Citrus*, dentro de los cítricos verdaderos (García-Lor., 2013). Según Soler-Aznar y Soler-Fayos (2006), es un árbol de hoja perenne cuya altura oscila de los 3 a los 6 metros de forma general, presenta ramas con espinas duras y gruesas, siendo copa es amplia y redondeada. Las hojas son una estructura importante ya que se pueden utilizar para diferenciar las especies de cítricos. En el caso del limonero son de aspecto lanceolado, con el margen aserrado y el ápice agudo, el limbo es grueso con los nervios marcados en tanto en el haz y como en el envés, presentan un peciolo corto y redondeado, sin alar y articulado con el limbo, sus brotaciones son de color morado (Soler-Aznar., 1999). Las flores suelen aparecer de forma solitaria, aunque en ocasiones pueden estar agrupadas en racimos, presentan 5 sépalos cóncavos, cáliz verde con 5 pétalos blancos en su parte exterior, con cierta olor aunque más ligero que en el caso del naranjo. El fruto que produce es el limón, el cual tiene forma ovalada con una longitud de 7 a 12 cm, con colores que van del verde durante las primeras etapas del desarrollo del fruto debido a la presencia de clorofilas, hasta el amarillo final, resultado de la degradación de las clorofilas, lo que deja visible la capa inferior formada por carotenoides (Conesa y col., 2019).

Para que el limonero se pueda desarrollar de una forma adecuada se precisan climas templados, aunque sea una planta algo más resistente a heladas que el resto (Agustí-Fonfria y col., 2000). El peculiar sistema radicular de los limoneros hace que los mejores suelos para su cultivo sean los profundos. En los primeros 50 centímetros están presentes el 50 % de sus raíces, cuya estructura principal es la bardada, responsable de la absorción de agua y nutrientes, y sobre la cual las micorrizas realizan su función mejorando la absorción de micronutrientes. Son recomendables suelos francos con altos porcentajes en arena (sobre el 50 %) y el resto en mezcla de limos y arcillas al 50 %. Son preferibles suelos con un contenido en materia orgánica del 2 al 3 % en los primeros 20 centímetros y con buena retención de agua (Amorós, 1995)

Por ello, las principales regiones productoras están situadas en la franja tropical y subtropical del sur de California, Sicilia, Levante y sur de España, noroeste de Argentina, sur de Grecia y sur de Turquía como se puede apreciar en la Figura 1.3 (FAO, 2017).



**Figura 1.3.** Distribución de la producción de limón en el mundo. Fuente: FAO, 2019.

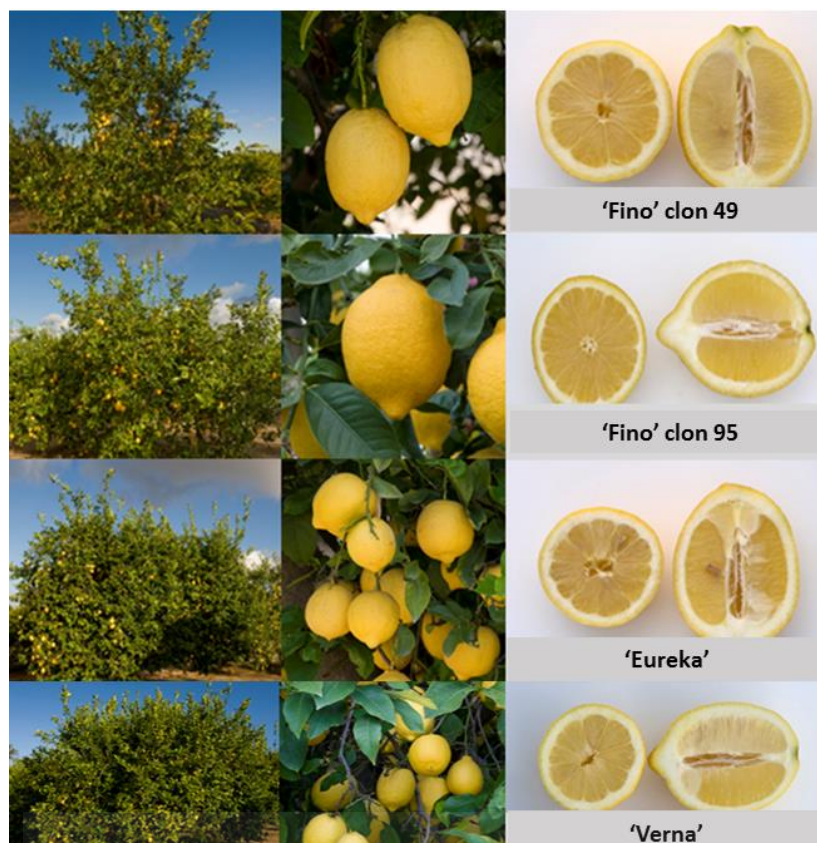
La variedad de limonero con la mayor distribución a nivel mundial es la ‘Eureka’, originaria de California y plantada en países como Australia, Sudáfrica, Argentina e Israel, presenta frutos con un tamaño intermedio, con un contenido en zumo excelente y elevado grado de acidez. La variedad ‘Femminello’ representa la mayor parte de la producción en Italia, cuyos frutos tienen una cantidad de zumo relativamente baja y una alta acidez (Inglese y Sortino, 2019). En cuanto a España, las principales variedades de limonero son la ‘Primaflori’, también conocida como ‘Fino’, la ‘Verna’ y la ‘Eureka’ (Figura 1.4), las cuales representan el 95 % de la superficie de cultivo (García-Lidón y col., 2003). La variedad ‘Fino’ se divide, de forma mayoritaria, en dos clones 95 y 49 (Aznar-Soler, 1999).

**Tabla 1.2.** Calendario de producción del limón en España. Fuente: MAPA, 2019.

	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
Fino	■	■	■	■						■	■	■
Verna				■	■	■	■					
Eureka	■	■								■	■	■

La variedad con la producción más temprana es la 'Fino' clon 95 (Figura 1.4), siendo su cotización y productividad muy elevada (García-Lidón y col., 2003). Florece una vez al año (abril-mayo), aunque puede darse una segunda floración, más escasa, que da lugar a limones con una piel más rugosa, conocidos como rodrejos. El periodo de recolección para esta variedad suele extenderse de finales de septiembre a mediados de enero. Le sigue en importancia la variedad 'Fino' 49 (Figura 1.4), la cual produce frutos con un alto contenido en zumo y una elevada acidez, pero con una vida útil sensiblemente menor. La recolección de esta variedad se extiende desde finales de diciembre hasta el mes de abril. La producción de la variedad 'Fino' se complementa con la entrada en producción de la variedad 'Eureka' (Figura 1.4), por lo tanto se controla la floración para que se ajuste a la de la variedad 'Fino', es necesaria esta producción extra para cumplir con la demanda de los mercados (Legua y col., 2018). Finalmente, la variedad 'Verna' (Figura 1.4) es considerada la segunda más importante cultivada en España, la entrada en producción ocurre en dos momentos, hay limoneros con una con una producción más temprana, en abril, y otra más tardía en junio (Aznar-Soler, 1999). La variedad 'Verna' presentan una floración de marzo a mayo más intensa que la variedad 'Fino', dependiente de los factores climáticos, localización de la plantación y estado fisiológico del árbol. Debido a una floración tan larga, el desarrollo de los frutos que dan lugar a la carga final del árbol es muy desigual. Al igual que en la variedad 'Fino', en verano suele ocurrir de forma natural o mediante técnicas de forzado agronómico otra floración, cuyos frutos también se denominan rodrejos y se recolectan en los meses de agosto y septiembre del año siguiente (Agustí-Fonfria y col., 2000). Finalmente, otra floración en primavera o en verano puede dar lugar a otra pequeña producción de frutos llamados segundos, aunque estos por su aspecto rugoso tienen poca aceptación por parte de los mercados para su comercialización en fresco. (García-Lidón y col., 2003). Por lo tanto, debido al manejo que se realizan de las distintas variedades cultivadas en España, el ciclo de producción del limón se puede extender durante aproximadamente 10 meses al año (Tabla 1.2).





**Figura 1.4.** Variedades de limón cultivado en España. Fuente: Siebert y Karp, 2001.

### 1.3.3. Portainjerto

Los limoneros pueden ser propagados de forma asexual utilizando un pie o portainjerto con un sistema radicular desarrollado, el cual se usa para injertar una yema o esqueje de otra planta. Este proceso favorece una entrada en producción más rápida que si la planta tuviera que desarrollarse a partir de una semilla (Martínez-Cuenca y col., 2016). En el proceso se presta una especial atención a la afinidad entre la yema o esqueje (que formará la parte aérea) y el portainjerto. Una forma sencilla de determinar el grado de compatibilidad es observar la diferencia de diámetro entre el portainjerto y el tronco de la copa, cuanto mayor sea la diferencia, menor el grado de compatibilidad, aunque no siempre se observa con facilidad (Castle., 1995). La correcta selección del portainjerto es fundamental, ya que influye en características tan importantes como el vigor y tamaño de la planta, la productividad, la tolerancia al frío, o en la adaptación a las condiciones del

suelo, tales como salinidad, acidez y tolerancia a enfermedades (Legua y col., 2018). La elección del portainjerto debería estar basada en los factores limitantes para la producción de la zona donde se va a desarrollar la plantación. Los principales portainjertos utilizados en España son:

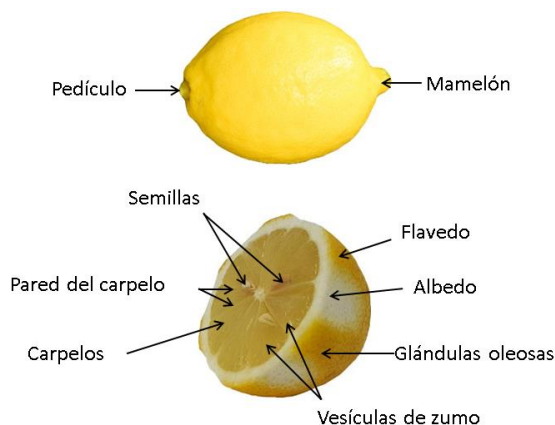
- **Naranja amarga** (*C. aurantium*), es el más utilizado en todo el mundo, sin embargo, en zonas de producción donde el virus de la tristeza (*Closteroviridae*) está muy extendido, como en Argentina, se ha restringido su uso por la elevada susceptibilidad (Castle., 2010). En el mundo se utiliza como portainjerto de la variedad 'Eureka' principalmente, pero en España se utiliza tanto para 'Fino' como para 'Verna'. Por encima de la zona de unión entre el portainjerto y la yema se forma un sobrecrecimiento muy característico del tronco conocido como miriñaque. Se suele utilizar en suelos con una fertilidad media o baja, salinos y con un drenaje pobre, debido a su tolerancia a *Phytophthora* (Martínez-Cuenca y col., 2016).
- **Macrophylla** (*C. macrophylla*), las variedades injertadas sobre este portainjerto son vigorosas, grandes y muy productivas, además presentan una gran cantidad de espinas, las cuales suelen producir graves daños en los frutos cuando las condiciones climatológicas son adversas. Tiene buena tolerancia a suelos arenosos y salinos, son resistentes al virus de la tristeza y presentan una tolerancia elevada a la sequía, por lo tanto, es una elección adecuada para climas secos y cálidos (García-Lidón y col., 2003). Tienen buena compatibilidad con las principales variedades "Fino" y "Verna".

#### **1.3.4. Estructura y composición del limón**

El limón es un fruto comestible con forma esférica, redondeada u ovoide de color amarillo. Destaca el pedículo (cáliz) cuya ausencia supone un grave problema durante la comercialización, y la parte opuesta, conocida como mamelón, origen de multitud de problemas de calidad por su exposición a daños mecánicos (Ancillo-Antón y col., 2015). La piel del limón está constituida por una capa cerosa externa, que protege al flavedo, de aspecto moteado por la presencia de glándulas oleosas, también se encuentran los pigmentos,



clorofilas o carotenoides, según el estado de madurez del fruto (Agustí-Fonfria y col., 2000). A continuación, se ubica el albedo, de color blanco, formado principalmente por fibra. Finalmente, se encuentra una segmentación formada por los carpelos llamada hesperidio, en los cuales se almacena el jugo, y entre ellos se localizan las semillas como se puede observar en la figura 1.5.



**Figura 1.5.** Descripción de las partes principales que componen un limón. Fuente: Ancillo-Antón y col., 2015.

El limón es un fruto con un valor calórico muy bajo y con un contenido en agua elevado, del 70 al 80 % en el flavedo y en el albedo, pero que en la pulpa supera el 90 % (Tabla 1.3). Según el Reglamento (UE) 543/2011 que regula los criterios para la comercialización del limón, el parámetro más importante es el porcentaje de zumo, el cual deberá de ser superior a un 25 % en el caso del limón 'Fino' y un 30 % en el limón 'Verna' (Pardo y col., 2015). En cuanto al contenido en azúcares, cuando está maduro, la materia seca se compone de un 44 % de azúcares, 33% celulosas (ligninas) y un 20 % de pectinas y glucósidos. Finalmente, el ácido orgánico mayoritario es el ácido cítrico, componente principal del endocarpio y representa del 70 al 90 % de la acidez total del fruto, seguido del ácido málico y el ácido oxálico. El pH en el zumo de limón se encuentra entre las 2 o 3 unidades de pH, durante la maduración varían muy poco debido a que el ácido cítrico es un ácido débil (Lado y col., 2014).

**Tabla 1.3.** Composición nutricional del limón por cada 100 g de la pulpa. Fuente: USDA, 2019.

NUTRIENTES		
Agua	88.98	g
Energía	29	Kcal
Proteínas	1.1	g
Lípidos totales	0.3	g
Carbohidratos	9.32	g
Fibra	2.8	g
Azúcares	2.5	
MINERALES		
Calcio	26	mg
Hierro	0.60	mg
Magnesio	8	mg
Fosforo	16	mg
Potasio	138	mg
Sodio	2	mg
Zinc	0.06	mg
Cobre	0.037	mg
Manganeso	0.030	mg
Selenio	0.4	µg
VITAMINAS		
Ácido ascórbico	53	mg
Tiamina	0.040	mg
Riboflavina	0.020	mg
Niacina	0.100	mg
Vitamina B6	0.080	mg
Folato	11	µg
Vitamina A	1	µg
Vitamina E	0.15	mg

En su composición el limón presenta una serie de compuestos a los cuales se les atribuyen importantes propiedades bioactivas que representan un beneficio para la salud. En este sentido las pectinas, presentes principalmente en el albedo y la pulpa, y que constituyen aproximadamente el 20 % del peso seco del fruto, están relacionadas con una mejor regulación del metabolismo de la glucosa y del colesterol en sangre (Liu y col., 2016). Por otra parte, flavononas como la hesperidina, mayoritaria en la piel y el zumo del limón, destaca por su actividad antiinflamatoria (Mahmoud y col., 2019). Además, el ácido ascórbico interviene en la formación de colágeno, de glóbulos rojos y favorece la resistencia a infecciones, efectos favorecidos por la presencia de

ácido cítrico (Martí y col., 2009). Por lo tanto, el limón se puede considerar como una opción para cumplir con las recomendaciones de la Sociedad Española de Nutrición, sobre alimentación saludable.

### **1.3.5. Proceso de maduración del limón**

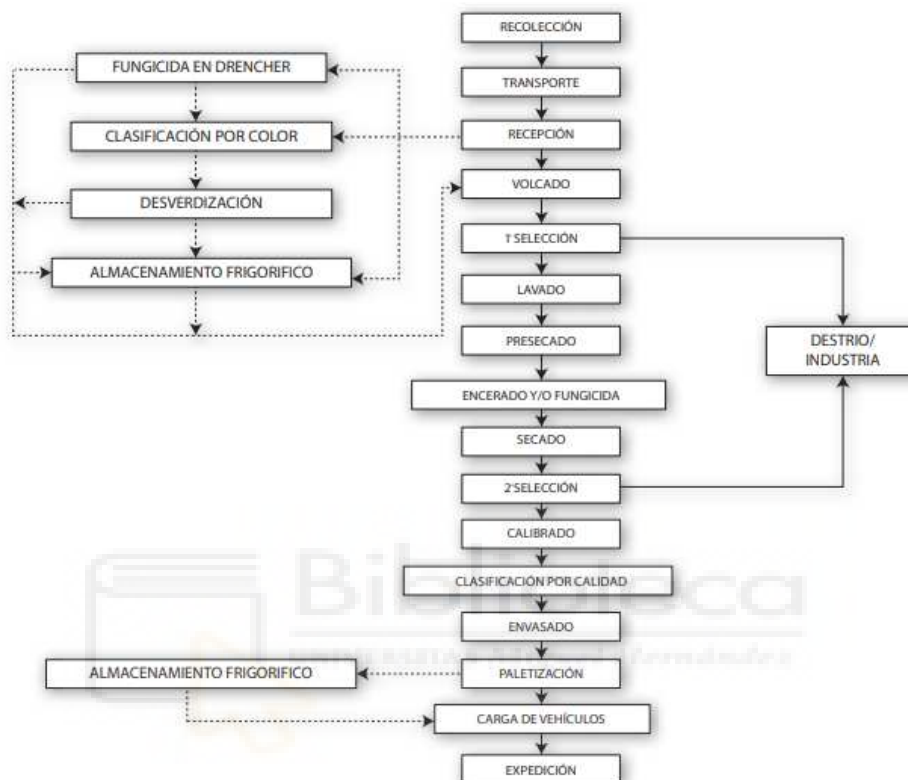
La maduración del limón es un proceso fisiológico genéticamente programado que abarca una serie de cambios bioquímicos, los cuales modifican las propiedades físicas, químicas, nutricionales y funcionales (Lado y col., 2014). Se trasladan como cambios en la textura, por debilitamiento de las paredes celulares al solubilizarse las pectinas, cambios de color por la degradación de las clorofilas que dejan visibles la capa de carotenoides, y cambios en el contenido de azúcares solubles y acidez (Lado y col., 2018). Sin embargo, no sólo intervienen procesos fisiológicos internos, si no que diferencias en las prácticas agronómicas y en las condiciones climáticas, pueden provocar diferencias durante el proceso de maduración (García-Lidón y col., 2003). El limón, como el resto de cítricos, son frutos no climatéricos, por lo que durante el proceso de maduración no muestran incrementos significativos en la tasa respiratoria ni en la producción de etileno. Sin embargo, estudios recientes en uvas parecen mostrar la importancia de hormonas como el ácido abscísico (ABA), auxinas, giberelinas o el etileno durante el desarrollo del fruto en el árbol y la senescencia (Fuentes y col., 2019). Para el control de la maduración del limón durante la etapa post-cosecha se aplican técnicas de frío que conservan el fruto a una temperatura de 10 a 12 °C (Sun y col., 2019).

La calidad de un producto implica el grado de excelencia para un uso concreto, lo que depende de la sociedad, la cultura de los consumidores, del alimento y del contexto (Kader y col., 2002). Abarca un gran número de características y propiedades organolépticas, sensoriales, nutritivas y funcionales. Para el limón los requisitos mínimos en todas las categorías son, que los frutos se encuentren enteros, y sin daños ocasionados por las plagas o las condiciones ambientales. En cuanto a la madurez se valora el contenido en zumo y la coloración de la piel, que dependerá del momento de la recolección (Agustí-Fonfria y col., 2000).

## 1.4. LA POST-COSECHA EN CÍTRICOS

### 1.4.1. Recolección, procesado y distribución del fruto

La manipulación de cítricos sigue los procedimientos descritos por Salvador y col., (2012), en el diagrama representado en la Figura 1.6.



**Figura 1.6.** Diagrama de la manipulación de cítricos. Fuente: Salvador y col., 2012.

La recolección de los limones se inicia cuando el calibre del fruto es adecuado, de acuerdo con los criterios expuestos en el Reglamento (UE) 543/2011. Se debe realizar de forma cuidadosa con la ayuda de tijeras para cortar el pedúnculo limpiamente sin romper el pedículo (Agustí-Fonfria y col., 2000). Luego son depositados en una capaza acolchada de 15 Kg, ya que los daños producidos en la piel por un manejo inadecuado pueden desencadenar una serie de desórdenes fisiológicos que reduzcan la vida útil del fruto e incrementen la incidencia de podredumbres causadas por microorganismos. Es un punto especialmente crítico cuando el fruto es recolectado de color verde, ya que debido a la turgencia de la piel las glándulas con aceites esenciales están más expuestas y se rompen con una gran facilidad (Li y col., 2011).

El primer paso en la central hortofrutícola es que los frutos en sus cajas suelen pasar por una zona de lavado, la cual recibe el nombre de drencher y tiene la forma que puede observarse en la Figura 1.7A, que elimina el exceso de tierra, barro o piedras que puedan haber caído durante la recolección. Además, en este paso se suele aplicar un tratamiento desinfectante que reduce la carga microbiana superficial del fruto. A continuación, los frutos pueden ser almacenados en cámara hasta su utilización en la siguiente confección o ser volcados a línea, donde serán de nuevo sometidos a un proceso de lavado, abrillantamiento y secado (Figura 1.7B). Este limón es clasificado en un calibrador automático (Figura 1.7C) según su diámetro, color y desperfectos en la piel, asignándole una categoría de calidad, extra (sin defectos), categoría I (ligeros defectos de forma y coloración), categoría II (defectos de forma, coloración, corteza rugosa y alteraciones en epidermis cicatrizadas) (Salvador y col., 2012). Finalmente este limón puede ser de nuevo almacenado en cámara para una post-erior confección o en cambio puede ser directamente envasado y enviado al punto de venta.



**Figura 1.7.** A) Drencher con el caldo de para el lavado y desinfección de limón recién recolectado. B) Zona de cepillado, encerado y secado de limón. C) Calibrador automático de 6 calles para la clasificación del fruto. Fuente: Propia.

#### **1.4.2. Desverdizado**

En cítricos es habitual que en el momento de la recolección no coincida la madurez fisiológica con la madurez requerida para su comercialización. Hay variedades tempranas que producen limones con un calibre y un porcentaje de zumo adecuado para su recolección, pero que aún no han alcanzado el color deseado. Es un parámetro que depende de bajas temperaturas y alta humedad en la zona de cultivo, lo que promueve la degradación de las clorofilas en la piel del limón de forma natural, finalizando el proceso en el mes de diciembre, lo que retrasaría el inicio de la recolección tres meses (García-Lidón y col., 2003). Sin embargo, este proceso puede acelerarse en fruta recién recolectada con tratamientos de etileno a una concentración de 1 a 5 ppm, a una temperatura de 20 a 25 °C) y a una humedad relativa del 90 % (Ladiniya, 2008). El análisis del transcriptoma ha revelado que la temperatura es fundamental para que se lleve a cabo el desverdizado, mostrando que la regulación por parte del etileno es independiente (Mitalo y col., 2020).

En Producción Ecológica según recoge el Reglamento (CE) 354/2014 que modifica o corrige el Reglamento (CE) 889/2008 por el que se establecen las disposiciones para la producción y etiquetado de productos ecológicos, el uso de etileno se encuentra restringido, salvo para el tratamiento de la mosca de la fruta cuando su incidencia sea muy elevada. Por lo tanto, en producción ecológica el tiempo dedicado a desverdizar es mayor que en la producción convencional, ya que se induce el proceso controlando sólo temperatura y humedad relativa. Además, es esencial la renovación del aire en la sala, controlando la concentración de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, lo que minimiza el ablandamiento de la piel (Mayuoni, 2011). Dadas las condiciones ambientales que se inducen durante el proceso de desverdizado la incidencia de podredumbres causadas por *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* o *Geotrichum citri-aurantii* incrementan notablemente (Ritenour y col., 2016).

### **1.4.3. Conservación**

El proceso de maduración continúa durante la post-recolección, de una forma más o menos acelerada dependiendo de la variedad y del estado de madurez en el cual se ha recolectado el fruto. Por lo tanto, este proceso provoca que se produzca una sobremaduración que disminuya la calidad y la vida útil. Así, la aplicación de frío contribuye en relentizar el metabolismo, reducir la transpiración, y por consiguiente, retardar la senescencia (Lado y col., 2014). Las bajas temperaturas también permiten que otra de las causas que determinan la pérdida de calidad durante la post-recolección, como es la aparición y proliferación de microorganismos se reduzca (Schreuder y col., 2018). Sin embargo, aplicar bajas temperaturas de forma incorrecta puede afectar negativamente al fruto, favoreciendo la aparición de manchas en la piel o la deshidratación (Lafuente y col., 2005).

Según las condiciones óptimas de conservación recomendadas por Kader y col., (2002), la temperatura más adecuada para el almacenamiento refrigerado del limón oscila entre los 10 y los 13 °C. Aunque las temperaturas bajas son fundamentales para mantener la calidad del fruto, se hace necesario realizar tratamientos adicionales que colaboren en mejorar los resultados, ya que las estrategias de frío por sí solas no detienen lo suficiente los procesos metabólicos que determinan la maduración y la senescencia, o el ataque de microorganismos patógenos (Schreuder y col., 2018).

## **1.5. PRINCIPALES FISIOPATÍAS Y DAÑOS POST-COSECHA**

### **1.5.1. Daños por frío**

Los daños por frío se suelen producir cuando se mantienen los frutos durante un largo período de tiempo a temperaturas inferiores a 15 °C. El daño puede variar según la especie, técnicas agronómicas aplicadas en el cultivo y las condiciones climatológicas (Lo'ay y Dawood., 2019). Los daños provocados por la exposición continuada a unas condiciones de frío pueden provocar unos síntomas parecidos a la congelación, sin embargo, el daño se desarrolla en un período de tiempo más largo, y normalmente, se suelen observar cuando los frutos se llevan a temperaturas más cálidas (Lafuente y col., 2005).



Entre los cítricos, generalmente, los limones, limas y pomelos son más sensibles a daños por frío que naranjas y mandarinas. El síntoma más característico es una serie de depresiones en la piel (Golding, 2019), que puede conducir al colapso final del tejido, en limones la zona afectada suele tener un color marrón, como se puede observar en la Figura 1.8A y Figura 1.8B. El desarrollo de estas lesiones pueden estar causadas por cambios en las propiedades físicas de los lípidos o proteínas estructurales que forman las membranas, además de la actividad de enzimas expresadas durante el proceso (Rey y col., 2020).



**Figura 1.8.** A) Limón con pronunciadas depresiones desarrolladas durante la conservación en cámara. B) Limones con oleocelosis. Fuente: Propia.

### 1.5.2. Oleocelosis

La oleocelosis es una alteración que ocurre en todos los frutos cítricos, pero cuando el fruto es recolectado de color verde es más sensible (Knight y col., 2002). Se evita, por lo tanto, la recolección a horas tempranas del día, cuando el rocío es muy abundante o después de lluvias, ya que debido a la hidratación de la piel las glándulas con el aceite están más expuestas (Scherrer-Montero y col., 2011). Las manchas están causadas por la liberación del aceite esencial, el cual tiene un efecto tóxico sobre las células circundantes, dando lugar a una zona necrotizada de color marrón y aspecto irregular como se puede observar en la Figura 1.8B. A nivel bioquímico y fisiológico parece que el desarrollo de la oleocelosis está ligeramente influenciado por la actividad



antioxidante de ciertos compuestos presentes en el flavedo, como los carotenoides (Yongqiang y col., 2010).

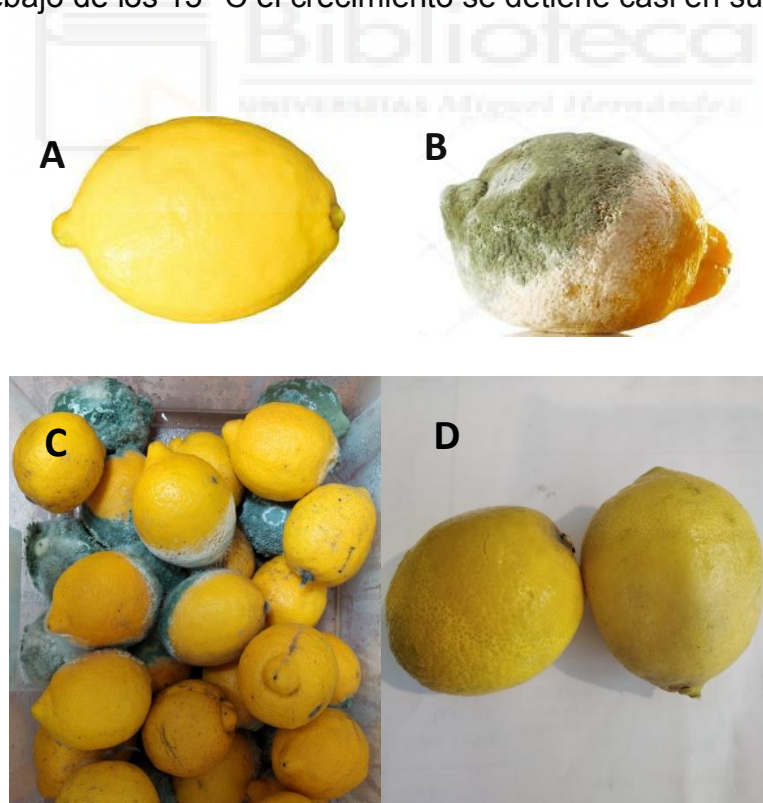
### **1.5.3. Peteca**

La peteca es un trastorno fisiológico asociado al colapso de las células de la piel, y cuyos síntomas más característicos son las picaduras, el hundimiento u oscurecimiento de la piel, que puede empeorar si las glándulas que contienen los aceites esenciales se rompen (Cronjé, 2015). La incidencia puede variar con la climatología, condiciones frías antes de la cosecha influyen en la aparición de peteca. Además, se ha demostrado que desequilibrios nutricionales contribuyen a que el trastorno aumente, por ejemplo, con unos niveles altos de calcio y bajos de potasio (Undurra-Martínez y col., 2006). Utilizar recubrimientos comestibles con una permeabilidad a la humedad baja incrementa la aparición de peteca. Sin embargo, los mecanismos causales y los factores que influyen en la susceptibilidad de los frutos están lejos de ser comprendidos (Cronjé, 2015).

## **1.6. PRINCIPALES HONGOS QUE PRODUCEN PODREDUMBRES EN LIMÓN**

Los principales microorganismos que desarrollan las podredumbres en cítricos son hongos, dado que el bajo pH impide la proliferación de otros microorganismos (Eckert y Eaks, 1989). Habitualmente son hongos filamentosos y heterótrofos, es decir, absorben nutrientes obtenidos a partir de la liberación de enzimas extracelulares. Las hifas forman la estructura vegetativa de los hongos, crecen de modo apical y se ramifican dando lugar a un aspecto algodonoso (Palou, 2014). Para que se desarrolle la enfermedad de forma efectiva la cantidad de inóculo es decisivo, pero también intervienen otros factores como la susceptibilidad del propio fruto o las condiciones ambientales. La mayor parte de los hongos que causan enfermedades en el limón proceden de una inoculación producida en el campo, sin embargo, hay algunas especies que su desarrollo está asociado con la post-osecha, siendo las principales:

***Penicillium digitatum*** (moho verde), la característica principal del hongo *P. digitatum* que da lugar a una identificación visual relativamente sencilla, radica en la coloración verde oliva de las esporas que produce cuando infecta a un fruto, como se puede observar en la Figura 1.9B. *P. digitatum* es el principal hongo patógeno de los frutos cítricos, la infección se puede iniciar en diferentes puntos durante el procesado del limón, sin embargo, lo más habitual es que ocurra durante su estancia en la central hortofrutícola (Palou, 2014). La infección suele ocurrir a través de heridas donde hay nutrientes disponibles que estimulan el crecimiento del hongo y la producción de esporas (Vilanova y col., 2012). Los estados iniciales de la enfermedad se presentan como una mancha blanca, acuosa y blanda debido a la degradación de las pectinas, pero conforme avanza se comienza a observar el micelio (blanco) y las características esporas (Barkai-Golan y Karadavid, 1991). Estas esporas pueden propagarse e infectar frutos adyacentes. El hongo se desarrolla rápidamente a temperaturas próximas a los 24 °C, pero por encima de los 30 °C y por debajo de los 15 °C el crecimiento se detiene casi en su totalidad.



**Figura 1.9.** A) Limón sano. B) Limón infectado por *Penicillium digitatum*. C) 'Nido' de limones infectados con *Penicillium italicum*. D) Limón infectado por *Geotrichum citri-aurantii*. Fuente: Propia.

***Penicillium italicum* (moho azul)**, el moho azul causado por el hongo patógeno *P. italicum* es el segundo que más incidencia representa. Infecta los frutos a través de lesiones en la piel, como ocurre con *P. digitatum*, pero su desarrollo es más lento, por lo tanto, es común observar varios patógenos desarrollándose a la vez en la misma superficie del fruto (Palou, 2014). El aspecto que lo diferencia de forma más clara es la coloración de las esporas, que en este caso son de color azul claro, normalmente rodeadas por una estrecha banda de micelio blanco. Otra característica particular del moho azul es que en condiciones refrigeradas (10 °C) se desarrolla mejor que el moho verde (Palou y col., 2008) creando nidos de fruta podrida como se puede observar en la Figura 1.9C, es una podredumbre típica en las cámaras donde se conserva la fruta en las centrales hortofrutícolas.

***Geotrichum citri-aurantii* (podredumbre ácida)**, el tercer hongo patógeno con mayor incidencia durante el procesado del limón en las centrales hortofrutícolas es *G. citri-aurantii*. Aunque en períodos de alta humedad en campo su incidencia puede sobrepasar a los mohos verde y azul (Nazerian y Alian, 2013). Es un hongo que está presente en los suelos de las plantaciones y tras las lluvias, debido a las salpicaduras, su carga en la superficie del fruto aumenta drásticamente (Suprpta y col., 1995). El hongo, al igual que los anteriores infecta a través de lesiones en la piel, pero su crecimiento se localiza en capas más profundas de la piel del limón, concretamente debajo del albedo. Los síntomas iniciales son lesiones acuosas y transparentes como se pueden observar en la Figura 1.9D, estas derivan en la ruptura de la piel por los gases producidos durante la infección y finaliza con el pelado. Durante la infección se aprecia un característico olor amargo en los frutos afectados, lo que atrae a moscas que colaboran en la propagación de la enfermedad (Pompeo-Ferraz., 2016). Es un patógeno que se desarrolla rápidamente a temperaturas cálidas, con un óptimo a los 27 °C, pero a temperaturas por debajo de 10 °C se suprime su desarrollo (Plaza y col., 2004).

Hay otras especies de hongos que afectan a la calidad del limón, pero que los daños se desarrollan principalmente durante la pre-cosecha, siendo su incidencia en las centrales hortofrutícolas minoritaria, entre los más representativos se encuentran:

***Colletotrichum gloesporoides***, desarrollada la enfermedad conocida como antracnosis, es un hongo saprófito que crece en la madera de los limoneros, el agua transporta sus esporas hasta la superficie de los frutos, donde desarrolla un apresorio y permanecen en estado latente hasta que el fruto es recolectado. El etileno induce la germinación del apresorio y comienza la infección. En etapas tempranas la lesión tiene un aspecto grisáceo sin ablandamiento de la zona, sin embargo a medida que avanza la infección la piel se ablanda, en el limón es considerado como un patógeno menor (Guerreiro-Lima y col., 2011).

***Phytophthora spp***, puede desarrollarse tanto en pre-cosecha como en post-cosecha. Se propaga a través de las salpicaduras producidas por la lluvia, ya que sus esporas están presentes en el suelo, produciéndose la mayor parte de las infecciones en el campo (Graham y Feichtenberger, 2015). Los primeros síntomas se muestran con una decoloración de la superficie del fruto, que a medida que avanza desarrolla una lesión de color marrón y de aspecto firme, desprendiendo el área afectada un característico olor rancio (Ramallo y col., 2019). En limón se ha reducido mucho su incidencia a la introducción de variedades resistentes.

***Alternaria alternata***, en campo puede desarrollarse la enfermedad en el extremo donde se encuentra el pedículo unido al tallo, ocasionando la caída temprana del fruto. Sin embargo, el patógeno suele establecerse bajo el cáliz, quedando latente. En post-cosecha, suele desarrollarse la enfermedad conforme avanza el proceso de senescencia del fruto (Timmer y col., 2003). Es un problema de gran importancia cuando la fruta queda almacenada por largo períodos de tiempo, aunque las pérdidas económicas acusadas por este patógeno no suelen ser muy significativas.

## **1.7. TECNOLOGÍAS POST-COSECHA PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES**

Durante los últimos 30 años se ha realizado un gran esfuerzo para identificar alternativas seguras y efectivas que colaboren en reducir las pérdidas durante la post-cosecha. La mayor dificultad se ha encontrado en la

búsqueda de enfoques que aborden los problemas de una amplia gama de productos y condiciones, que sean aceptados por la industria, por los consumidores y que su comercialización sea viable (Sanzani y col., 2016). Ya que para que las empresas inviertan en nuevas tecnologías se debe tener en cuenta que la relación entre la inversión y las ganancias sea claramente positiva. Para intentar controlar una patología durante la post-cosecha de frutas y verduras se requieren multitud de intervenciones en diferentes puntos del proceso. Por lo tanto, se ha pasado de aplicar altas concentraciones de un único agente de control biológico a utilizar una amplia gama de alternativas técnicas (físicas, químicas y biológicas) e integrarlas en la cadena de producción para conseguir los mejores resultados (Wisniewski y col., 2015).

### **1.7.1. Plaguicidas tradicionales.**

Según el Real Decreto 3349/1983 los plaguicidas se definen como sustancias o ingredientes activos, así como formulaciones o preparados que contengan uno o varios de ellos destinados a combatir los agentes nocivos y hacerlos inofensivos, destruyéndolos o previniendo su acción. Estos se pueden clasificar según su origen, uso, especie sobre la que tienen efecto o características químicas. Aunque son efectivos, actualmente existe una gran sensibilidad social sobre su utilización y la seguridad alimentaria (Wisniewski y col., 2014). La normativa es cada vez más exigente con el límite máximo de residuos (LMR), reduciéndose cada vez más las concentraciones permitidas, llegando al concepto de “residuo cero”. Existe una clara tendencia a la prohibición de muchos de los compuestos utilizados en la producción convencional, como ha sido el caso reciente del propiconazol (EFSA, 2017). Los principales plaguicidas aplicados en post-cosecha para el control de hongos son conocidos como fungicidas, los cuales representan el método principal para el control de enfermedades en frutas y hortalizas convencionales, mientras que en Agricultura Ecológica de forma general se encuentran prohibidos. Se aplican principalmente a través de duchas o ceras, sumergiendo el fruto en la disolución con la concentración adecuada de fungicida o rociándolo con aerosoles, también se pueden aplicar con gas, pero su uso está menos extendido (Romanazzi y col., 2016a). Para disminuir la incidencia de los

hongos patógenos durante la producción y post-cosecha de limones convencionales están permitidos los siguientes fungicidas en la Unión Europea:

**Imazalil** o 1-( $\beta$ -aliloxi-2,4-diclorofenil)-imidazol (IUPAC), es un fungicida sistémico que controla un amplio espectro de hongos alterando la función de la membrana en frutos, vegetales y plantas ornamentales. En cítricos es el principal tratamiento post-cosecha ya que es muy eficaz inhibiendo el crecimiento de *P. digitatum* (Ismail and Zhang 2004), aunque cuando es dosificado de forma incorrecta o la central hortofrutícola presenta unos protocolos de limpieza y desinfección deficientes pueden aparecer hongos del género *Penicillium* resistentes (Palou y col, 2008).

**Pirimetanil** o 4,6-dimetil-N-fenilpirimidin-2-amina (IUPAC), al igual que el imazalil es un fungicida ampliamente utilizado en frutos, vegetales y plantas ornamentales. Es muy efectivo para el control de *Botrytis cinerea*. Actúa inhibiendo la proteína que sintetiza metionina (Kanetis y col., 2007). Se suele utilizar en combinación con imazalil, ya que presentan un efecto sinérgico, por lo que se puede disminuir la concentración de imazalil, reduciendo el LMR en la piel.

**Tiabendazol** o 2-(tiazol-4-yl) benzimidazol (IUPAC), es un fungicida sistémico con un amplio rango de aplicación que controla gran cantidad de enfermedades como, *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Botrytis* sp, *Cladosporium* sp o *Fusarium*. Actúa comprometiendo la integridad del citoesqueleto de la célula mediante una interacción selectiva con la  $\beta$ -tubulina (D'Aquino y col., 2013).

**Ortofenilfenol** o bifenil-2-ol (IUPAC), es un fungicida utilizado normalmente en combinación con ceras o recubrimientos comestibles, que protege a una gran variedad de frutos durante los períodos de almacenamiento refrigerado. Es un fungicida de amplio espectro que realiza su función por contacto, actúa como un desinfectante (Maurizio, 2011).

Estos compuestos están prohibidos en producción ecológica en base al Reglamento (CE) 834/2007 y Reglamento (CE) 889/2008 los cuales establecen las disposiciones de aplicación respecto a la producción ecológica, su

etiquetado y control, por lo tanto, el control de los hongos patógenos es menos eficiente y causa más pérdidas.

### **1.7.2. Métodos alternativos de control post-cosecha**

En la actualidad hay un interés creciente por aplicar productos post-cosecha cada vez menos tóxicos y que tengan un menor impacto medioambiental, pero sin renunciar a conseguir frutos de buena calidad y aspecto (Droby y col., 2009). Por lo tanto, se están desarrollando estrategias con productos que garanticen una eficiencia similar a la de los fungicidas tradicionales a un coste razonable.

**Tratamientos físicos con calor:** se encuentra entre las estrategias más innovadoras aplicar tratamientos físicos con calor en baños o a través del aire, consiguiendo una inhibición del crecimiento de los hongos patógenos muy significativo. Especialmente sensibles son los hongos del género *Penicillium*, que a temperaturas superiores a 30 °C detienen su crecimiento (Palou, 2014). Sin embargo, se tienen que utilizar condiciones de alta humedad para que la deshidratación no afecte negativamente a la calidad del fruto.

**Luz ultravioleta-C (UV-C):** se aplica luz a una longitud de onda de 254 nm, la cual tiene un efecto nocivo sobre las células de los hongos patógenos modificando la membrana, y si la exposición es lo suficientemente prolongada, provoca mutaciones en el material genético que afectan a su crecimiento y propagación (Gündüz y col., 2015). También se ha estudiado cómo la luz UV-C modifica el perfil fenólico y antioxidante de la piel, aumentando la vida útil de frutos tropicales como el lichi, longan o el rambután (Li y col., 2017).

**Atmósferas modificadas (MAP):** se define como el envasado de alimentos en un recipiente cuya atmósfera ha sido alterada para aumentar la vida útil y mantener la calidad. Para las frutas y hortalizas se puede modificar la composición de los gases O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>, que son esenciales para su respiración. El único gas con un efecto sobre el crecimiento microbiano es el CO<sub>2</sub>, el cual a ciertas concentraciones puede inhibirlo (Jawandha y col., 2014). En el envase las atmósferas son modificadas utilizando películas poliméricas que seleccionan los gases que difunden a través del material. Además, estos



films pueden contener sustancias antimicrobianas que difundan a la atmósfera del envase y colaboren en la conservación óptima del producto (Bodbodak y Moshfeghifar, 2016).

**Tratamientos con ozono (O<sub>3</sub>):** los tratamientos con O<sub>3</sub> pueden ser una opción interesante, ya que es un potente agente oxidante, se descompone rápidamente en oxígeno, no produce compuestos halogenados (tóxicos) y su acción es rápida y eficaz contra una amplia gama de microorganismos. Sin embargo, su manejo en ocasiones es difícil, puesto que su efectividad depende de multitud de variables como el tipo de microorganismo, cantidad, materia orgánica presente, temperatura, pH, concentración de O<sub>3</sub> y tiempo de contacto (Miller y col., 2013). Por lo tanto, esta tecnología requiere de una optimización particular para cada fruto y / o vegetal, para que el efecto sobre los microorganismos y el control de las pudriciones sea el adecuado. El desarrollo de tratamientos combinados de O<sub>3</sub> con otros agentes desinfectantes o conservantes también podría ser una alternativa para maximizar el efecto de este tratamiento (García-Martín y col., 2018).

**Sales inorgánicas:** son sustancias químicas con una toxicidad muy baja, siendo la mayoría de ellas reconocidas como compuestos seguros (GRAS). Se han obtenido buenos resultados utilizando sales de carbono y bicarbonato por inmersión al 2-3 % para reducir la incidencia de podredumbres en cítricos (Youseff y col., 2016). También se han obtenido resultados prometedores en investigación al aplicar baños de sorbato potásico (SP) al 3 % o combinándolos con tratamientos de calor (Montesinos-Herrero y Palou, 2016). El modo de acción de las sales sobre los hongos patógenos es complejo, ya que presenta un efecto directo inhibiendo la formación de esporas, e indirecto estimulando los mecanismos de defensa en los frutos (Deliopoulos y col., 2010).

**Microorganismos antagonistas:** se utilizan microorganismos inocuos para el fruto que compiten con los patógenos inhibiendo su crecimiento. *Pantoea agglomerans* y *Pseudomonas syringae* son microorganismos que han demostrado su eficacia en el control de *P. digitatum* y *P. italicum* en cítricos (Janisiewicz y Bors, 1995; Plaza y col., 2004).



**Recubrimientos comestibles:** es una práctica común durante el procesado de cítricos utilizar recubrimientos comestibles, debido a que durante el proceso de lavado y manipulación los frutos pueden perder la capa cerosa externa que los protege. Normalmente son microemulsiones aniónicas que contienen resinas y / o ceras, tales como goma laca, cera de carnauba, cera de abejas, polietileno o ceras de petróleo. Siendo su objetivo principal reducir las pérdidas de peso, lo que mejora el aspecto de la fruta, reduce la incidencia de daños por frío y podredumbres (Pérez-Gago, 2010). Sin embargo, los recubrimientos pueden afectar negativamente si se restringe en exceso el intercambio gaseoso, lo que puede provocar una sobreproducción de volátiles que afecten al sabor. Además, los recubrimientos pueden ser modificados con compuestos con actividad fungicida como imazalil, tiabendazol, pirimetanil (Pérez-Gago y col., 2015). El uso de aceites esenciales o geles con diferentes especies de *Aloe vera* también se han mostrado efectivos reduciendo la incidencia de podredumbres y controlando la senescencia en cítricos y granadas (Martínez-Romero y col., 2013; (Castillo y col., 2014). El uso de quitosano como barrera protectora de frutas y verduras está aumentando, presenta una serie de grupos amino que interactúan con las paredes de las células microbianas causando la lisis celular. Además, también ejerce un control sobre la tasa de respiración, lo que se refleja en unas menores pérdidas de peso (El Guilli y col., 2016).

## 1.8. ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales (AE) son líquidos aceitosos aromáticos sintetizados y almacenados por diferentes partes de una planta (flores, hojas, semillas o frutos). Las principales plantas con AE pertenecen a las familias de las *Lamiaceae* y *Mirtaceae*, desde la antigüedad se han utilizado las esencias de las plantas como agentes antimicrobianos (laurel, cilantro, menta, romero, orégano, etc). La composición de los AE es heterogénea, variando según el origen y el método de extracción aplicado, sin embargo, se pueden agrupar dependiendo de la vía de síntesis en terpenos y fenilpropanos (Hyldgaard y col., 2012). Los terpenos se sintetizan a partir de isopentenilpirofosfato (IPP), que es el precursor de la estructura base del compuesto, el isopreno ( $C_5$ ),

formando cadenas C<sub>10</sub> (monoterpenos), C<sub>15</sub> (sesquiterpenos), etc., por polimerización. A partir de reacciones de óxido-reducción se forman los alcoholes, fenoles y cetonas que constituyen la gran diversidad de compuestos presentes en los AE (Perricone, 2015). En cuanto a los compuestos aromáticos, la mayoría derivan del fenilpropano y son resultado del metabolismo del ácido sikímico, que por isomerización forma los diferentes compuestos, son menos abundantes que los terpenos (Santos-Sánchez y col., 2018).

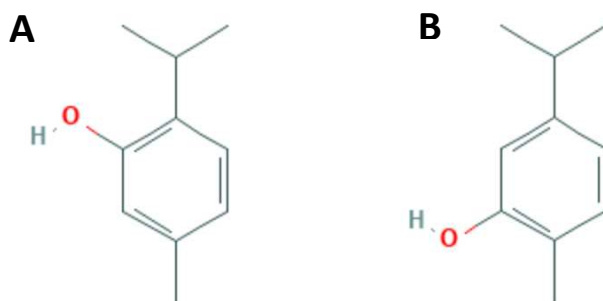
La mayor parte de los AE son obtenidos por síntesis química, o pueden obtenerse directamente o aplicando diferentes protocolos de extracción, sometiendo los tejidos a hidrodestilación, secado, fermentación e hidrólisis y procesos más avanzados utilizando fluidos supercríticos y presurizados. Luego se deben analizar los extractos para identificar los compuestos que forman los AE, para ello se utiliza la cromatografía de gases asociado a un detector de masas (Abdul-Aziz y col., 2018). Este factor posibilita el uso de aceites esenciales en producción ecológica, ya que pueden ser extraídos de plantas cultivadas en ecológico, y por lo tanto, se ajustaría a la legislación vigente.

Los AEs podrían utilizarse como alternativa a los fungicidas de síntesis, ya que resultados recientes muestran cómo al tratar limones con timol y carvacrol aumenta la vida útil del fruto y reduciendo la incidencia de podredumbres (Castillo y col., 2014), resultados parecidos se obtuvieron en uva de mesa al utilizar eugenol, mentol y timol en atmósferas modificadas (Valverde y col., 2006). Además, son compuestos con baja toxicidad para los mamíferos, ningún efecto negativo para el medio ambiente y son biodegradables (Sivakumar y Bautista-Baños, 2014). Son reconocidos como seguros (GRAS), lo que favorece su aplicación como plaguicidas para prevenir el crecimiento microbiano (FDA, 2014). Socialmente se encuentran más aceptados porque son de uso habitual por parte de los consumidores durante sus prácticas culinarias, por ejemplo.

El modo de acción en el que los AE realizan su función antimicrobiana podría deberse a su efecto sobre la parte lipídica y proteica de la membrana, desestabilizándola y provocando un aumento de la solubilidad, lo que puede provocar la salida del contenido citoplasmático y la inhibición de enzimas

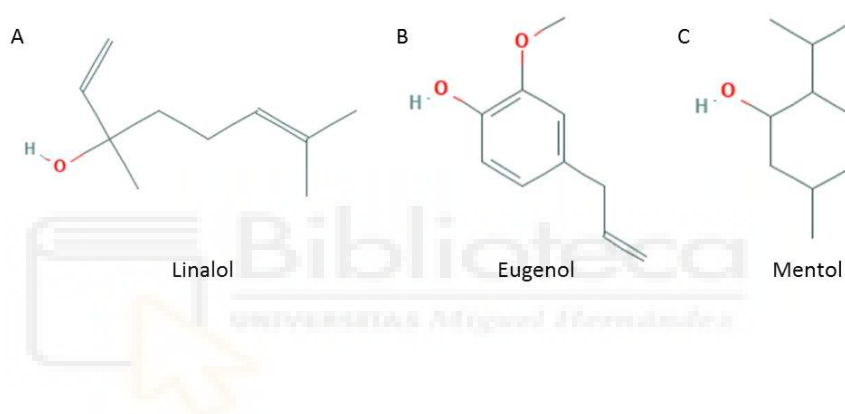
implicadas en la detoxificación de radicales libres (Hyldgaard y col., 2012). Parece que este efecto está relacionado con la inhibición de diferentes proteínas implicadas en la síntesis de ergosterol, lo que junto a la inhibición simultánea de proteínas transportadoras desestabiliza la membrana de los hongos, provocando un aumento de la permeabilidad celular y permitiendo el paso de timol al interior celular lo que provoca una reacción sinérgica (Dias de Castro y col., 2015). Se ha post-ulado también que la posición relativa de los grupos hidroxilo están relacionados con la toxicidad de los compuestos que forman los AE frente a los microorganismos, debido a las diferencias observadas en la efectividad de aplicar timol o carvacrol para controlar el crecimiento de bacterias gram positivas y negativas (Sivakumar y Bautista-Baños, 2014).

**Timol** (2-isopropil-5-metilfenol), es un compuesto extraído de la planta llamada comúnmente como tomillo (*Thymus sp*), su estructura química se puede observar en la Figura 1.10A. El Timol también puede ser sintetizado químicamente a partir de  $\gamma$ -terpineno (Poulose y Croteau, 1978), aunque su solubilidad en agua es menor. Se utiliza de forma tradicional como especia y conservante de alimentos, además de como remedio curativo para algunas dolencias, ya que presenta importantes propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y analgésicas (Nagoor-Meeran y col., 2017). Se ha estudiado ampliamente su efecto en uvas, limones y mangos consiguiendo alargar la vida útil de los frutos y reduciendo significativamente la incidencia de podredumbres (Valverde y col., 2006; Castillo y col., 2014; Chillet y col., 2020).



**Figura 1.10.** A) Estructura química del timol. B) Estructura química del carvacrol. Fuente: timol (CID 6989) y carvacrol (CID 10364), NCBI, 2021.

**Carvacrol** (5-isopropil-2-metilfenol), es un terpenoisómero del timol, siendo uno de los AE principales del orégano y del romero, su estructura química se puede observar en la figura 1.10B. Puede ser sintetizado de forma química a partir de la alcalinización de o-cresol (Suntres y col., 2015). Se ha demostrado su eficacia sobre hongos como *B. cinérea* (Martínez-Romero y col., 2007), sin embargo, ha sido recientemente cuando se ha avanzado en la comprensión de los efectos 'in vitro' de la utilización de carvacrol a pequeñas dosis, demostrando su capacidad antioxidante y antifúngica (Suntres y col., 2015). El efecto de Carvacrol sobre *Colletotrichum fructicola*, fue debido a la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) a través de la peroxidación de los lípidos de la membrana (Pei y col., 2020).



**Figura 1.11.** A) Estructura química linalol. B) Estructura química eugenol. C) Estructura química mentol. Fuente: linalool (CID 6549), eugenol (CID 3314) y mentol (CID 1254), NCBI, 2021.

**Linalol** (3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol), es un monoterpene alcohólico cuya estructura química está representada en la Figura 1.11A. Está presente en especies del género *Lavandula*, en el cilantro, laurel o canela. Puede ser sintetizado a partir de  $\alpha$ ,  $\beta$ -pineno, generándose impurezas en el proceso (Paroul y col, 2009). El linalol se utiliza principalmente en la industria alimentaria como sabor o aroma, aunque también se le considera un intermediario importante en la síntesis de vitamina E, vitamina A o farnesol (Kamatou y Vilojen, 2008).

**Eugenol** (4-alil-2-metoxifenol) (Figura 1.11B), es el compuesto polifenólico mayoritario en las plantas de la familia *Myrtaceae*. Estudios

recientes realizados con el aceite esencial de clavo (*Syzygium aromaticum*), en cuya composición la concentración de eugenol es bastante elevada (9381,7 y 14650,0 mg por 100 g de material vegetal fresco), relacionan su presencia con una destacada actividad antimicrobiana (Marchese y col., 2017).

**Mentol** (2-isopropil-5-metilciclohexanol), es un componente importante en plantas del género *Mentha* y cuya estructura química aparece representada en la Figura 1.11C. Tiene multitud de usos en la industria farmacéutica y cosmética, en alimentación se utiliza como sabor, aroma y conservante. Se le han atribuido importantes efectos antimicrobianos y analgésicos. Popularmente se ha utilizado como fumigante o repelente de insectos (Kamatou y col., 2013).

## 1.9. CICLODEXTRINAS

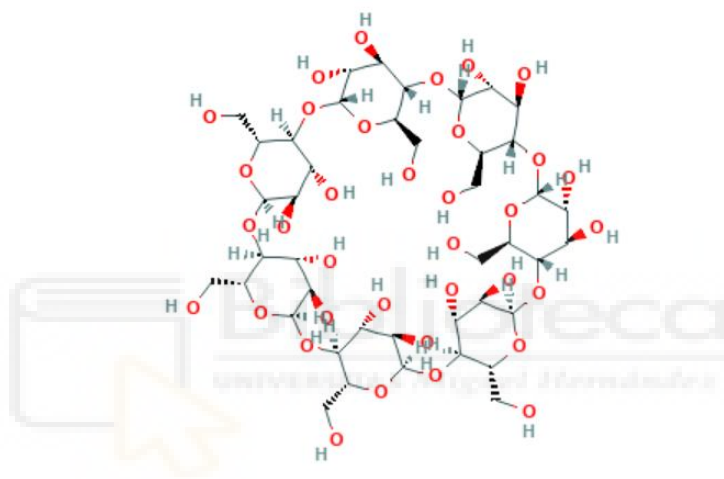
Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos formados por seis ( $\alpha$ -CDs), siete ( $\beta$ -CDs) u ocho ( $\gamma$ -CDs) unidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$  (1-4), cuyas propiedades se resumen en la Tabla 1.5. Se sintetizan cuando el almidón es degradado por la enzima ciclodextrina glucanotransferasa (CGTasa) de *Bacillus macerans* (Szejtli, 1998), son denominadas como CDs naturales.

**Tabla 1.5.** Propiedades de las ciclodextrinas naturales. Fuente: (Brewster y Loftsson, 2007; Loftsson y Brewster, 2011).

Propiedades	$\alpha$ -CDs	$\beta$ -CDs	$\gamma$ -CDs
Unidades de glucosa	6	7	8
Fórmula	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
Peso molecular ( <i>uma</i> )	972	1135	1297
Solubilidad en agua a 25 °C (% w / v)	14.5	1.85	23.2
Hidrólisis por amilasa intestinal	Muy baja	Lenta	Rápida

Una de las características que define a las CDs es su naturaleza anfifílica, ya que presenta una superficie interna ligeramente hidrófoba, lo que

facilita la formación de complejos de inclusión con moléculas insolubles en agua, y al mismo tiempo una superficie externa hidrofílica formada por grupos hidroxilo que la hace soluble en medio acuoso (Brewster y Loftsson, 2007). Las CDs naturales pueden ser modificadas utilizando reacciones de acilación o esterificación. La mayor parte de las modificaciones en las CDs afectan al volumen de la cavidad hidrofóbica, lo que puede mejorar su solubilidad en agua, y su estabilidad frente a la luz y oxígeno, además de mejorar la actividad del compuesto encapsulado (Al-Rawashdeh y col., 2013). Por su facilidad de síntesis y propiedades las hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrinas (HP- $\beta$ -CDs) son las más utilizadas, y cuya estructura molecular se muestra en la Figura 1.12.



**Figura 1.12.** Estructura de una ciclodextrina modificada HP- $\beta$ -CD. Fuente: CID 444041, NCBI, 2021.

Se ha revisado en profundidad la seguridad y toxicología del uso de CDs, ya que en farmacología son ampliamente utilizadas (Kurkov y Loftsson, 2013). Diversos autores han demostrado que las CDs naturales administradas por vía oral son inócuas, ya que se comportan de manera similar a cómo lo hace el almidón, y por lo tanto están permitidas como aditivos alimentarios (E-457, E-458 y E-459). Sin embargo, las CDs modificadas aunque se comportan de forma similar no está permitido su uso (Kurkov y Loftsson, 2013). La Comisión Europea ha publicado una guía para su uso (EMA, 2017), ya que si las CDs se administran de forma inadecuada pueden generar problemas gastrointestinales como diarrea o falta de absorción de algunos nutrientes.

La formación de los complejos de inclusión se desarrolla en las siguientes etapas (Kfoury y col., 2016):

- I. La molécula huésped se acerca a la CD provocando la salida de las moléculas de agua de la cavidad. Alcanzan un nivel de energía que les proporciona cierta libertad, disminuyendo las fuerzas de Van der Waals y los puentes de hidrógeno.
- II. El huésped también se libera de las moléculas de agua, al alcanzar el mismo estado energético.
- III. La parte apolar del huésped entra en la cavidad, donde se producen interacciones de Van der Waals y / o puentes de hidrógeno que conduce a la estabilización del complejo de inclusión.
- IV. Las moléculas de agua liberadas del huésped y la CD se reorganizan formando puentes de hidrógeno.
- V. La zona de la molécula huésped que queda fuera de la CD se hidrata al interactuar con las moléculas de agua.

Tradicionalmente la complejación con CDs se ha utilizado como método para estabilizar compuestos. Sin embargo, en estos últimos años se ha visto complementado con nuevas vías de aplicación tal como, prebióticos, en envases activos o recubrimientos comestibles que mejoran la conservación de alimentos al retrasar el crecimiento microbiano, en la formación de nanopartículas para alimentos funcionales o para mejorar la extracción y manejo de compuestos bioactivos (Matencio y col., 2020; Muñoz-Sugulí y col., 2021).

### **1.9.1. Complejación por el método 'Slurry'**

En el método de complejación 'slurry' se utiliza una concentración saturada de CDs, lo que significa una concentración de sólidos solubles cercanos al 50 o 60 %. Esta solución se mantiene en agitación hasta que los complejos formados entre la CD y la molécula huésped saturan la fase acuosa, entonces se produce un proceso de precipitación. El complejo precipitado se separa mediante decantación, centrifugación o filtración, siendo recomendable el lavado con agua u otro solvente como alcohol etílico, metanol o acetona dependiendo del complejo formado (Chaudhary y Patel, 2013). El tiempo requerido para que se forme el complejo es variable, siendo un proceso que se lleva a cabo a temperatura ambiente. La principal ventaja respecto a otros

métodos es la reducción del tamaño del reactor y la cantidad de agua necesaria.

### **1.9.2. Complejación por irradiación por microondas**

Es un método con una preparación rápida y que presenta buen rendimiento, básicamente, la molécula huésped y la CD se disuelven en agua u otro disolvente orgánico, a continuación se introduce la disolución en un horno con una potencia máxima de 150 W durante 2 minutos. Tras este proceso la parte que no ha formado el complejo se elimina con el disolvente, y el precipitado se seca a 400 °C (Deepthi-Priya y col, 2011). Los parámetros previamente descritos pueden modificarse en función de las propiedades de la molécula huésped.

### **1.9.3. Co-precipitación**

Las CDs se disuelven en agua caliente, el analito se añade mientras la disolución de CDs se encuentra en agitación. Para que se produzca la precipitación de los complejos se mantiene la disolución en agitación mientras se enfría. El precipitado se separa mediante decantación, centrifugación o filtración (Rodríguez-López, 2017). La principal desventaja de este método está causada por la baja solubilidad de las CDs, pudiendo requerir elevadas cantidades de agua, además del encarecimiento del proceso por la energía necesaria para calentar y el proceso. Los complejos formados por las CDs y el analito ionizado son más estables, por lo tanto, a la disolución se le puede añadir amoníaco (Biswas y Ghosh, 2011).

### **1.9.4. Complejación en pasta**

Para realizar este método se añade una pequeña cantidad de agua a la mezcla de compuesto y CD, lo necesario para formar una pasta. En un mortero se agita con movimientos circulares el tiempo necesario, según el analito a complejar (Chaudhary y Patel, 2013). La pasta resultante se lava con una pequeña cantidad de agua y los complejos formados se recuperan por filtración o centrifugación.



### **1.9.5. Mezcla húmeda y calefacción**

En este método se requiere poca hidratación (20-25 %) o ausencia de agua. Las CDs y el analito se mezclan en un recipiente hermético que se calienta a 100 °C, secando después los complejos. Las variables que intervienen en este método tienen que optimizarse previamente para cada analito (Bai y col., 2017).

### **1.9.6. Mezcla en seco**

Según los analitos se pueden formar complejos de forma directa con las CDs, esto suele ocurrir cuando los analitos son líquidos. Este método se lleva a cabo a temperatura ambiente, siendo la principal ventaja que no se utiliza agua en el proceso. No obstante, se suelen formar aglomerados, disminuyendo la homogeneidad del analito y la CD en la mezcla, lo que provoca que la formación de complejos no sea completa (Chaudhary y Patel, 2013).

## **1.10. ELICITORES**

La calidad de frutas y hortalizas es el resultado de la interacción entre diferentes factores, como el manejo de los cultivos, la climatología y la ubicación de la plantación, pero el genotipo determina en gran medida el proceso de maduración, senescencia y modula la respuesta ante situaciones de estrés (Valero y Serrano, 2010). Los elicitores son moléculas que se sintetizan de forma natural en las plantas y cuya función reguladora es muy importante, ya que median en la respuesta fisiológica, bioquímica y molecular que la planta produce cuando es expuesta a situaciones de estrés abiótico y biótico. Inducen la biosíntesis de gran variedad de metabolitos, entre ellos una amplia gama de compuestos bioactivos (Ruíz-García y Gómez-Plaza, 2013), que sirven no sólo como moléculas funcionales que colaboran en la adaptación de la planta, sino que también pueden ser beneficiosas para la salud humana si estas frutas y hortalizas son consumidas (Klimek-Szczykutowicz y col., 2020).

Estudios recientes muestran cómo el uso de elicitores químicos durante la pre-cosecha pueden colaborar en el control de las enfermedades durante la post-cosecha (Valero y Serrano, 2010). Se induce una resistencia local, que

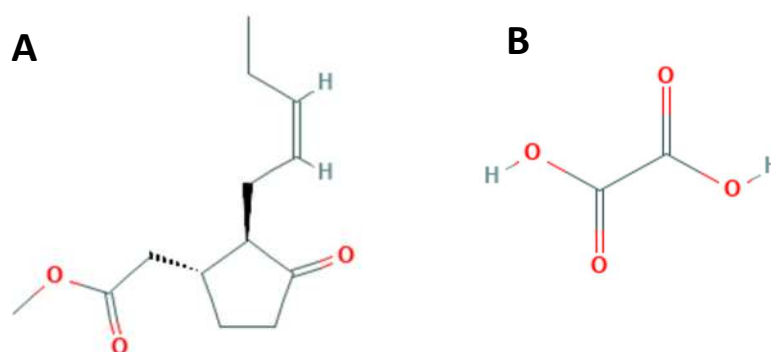
inicia una respuesta directa en el lugar donde se está produciendo el estrés, y otra sistémica, que induce la respuesta desde una parte no infectada a toda la planta (Bi y col., 2007). La resistencia sistémica puede clasificarse en la resistencia sistémica adquirida (RSA) y en la inducción de la respuesta sistémica (IRS), dependiente de la molécula señal que inicie la ruta de expresión (Thakur y Sohal, 2013).

### **1.10.1. Jasmonatos**

El ácido jasmónico (AJ) es una molécula señal sintetizada de forma natural en las plantas, y que está implicada en la regulación de diversos procesos fisiológicos durante el desarrollo de la planta y la maduración del fruto. La biosíntesis de AJ se produce a partir del ácido  $\alpha$ -linoleico ( $\alpha$ -ALE) en las membranas del cloroplasto siguiendo la siguiente secuencia; en el primer paso interviene una lipoxigenasa, luego se produce una reacción con dos pasos en la que interviene una aleno óxido sintasa asociada a la membrana cuyo producto es muy inestable y es rápidamente ciclado por una aleno óxido ciclasa a ácido 12-oxofitodienoico (OPDA). A continuación, se produce una hidrólisis espontánea y una ciclación no enzimática que da como resultado un OPDA racémico (Brash y col., 1988). La segunda mitad de la biosíntesis ocurre en los peroxisomas, en el primer paso el OPDA es reducido por una OPDA reductasa, seguido de una etapa en la que intervienen enzimas de  $\beta$ -oxidación (acil-CoA oxidasa, proteínas multifuncionales y 3-cetoacil-CoA tiolasas), produciendo (+) 7-iso-AJ, el cual se epimeriza al compuesto bioactivo más estable (-) - AJ. La estereoquímica de los intermedios y productos es un factor determinante en la biosíntesis de AJ, en la etapa catalizada por la enzima aleno óxido ciclasa se establece la forma enantiomérica (7R, 7S) (Fonseca y col., 2009).

El estrés biótico o abiótico induce la síntesis de AJ, el cual puede ser convertido en la forma biológicamente activa ácido jasmónico-isoleucina (AJ-Ile), mediado por la proteína jasmonato resistente 1 (JAR1). AJ-Ile es reconocido por el receptor proteico coronatina 1 (COI1) que inicia la degradación de los represores del dominio jasmonato unido por dedos de zinc (JAZ), lo que conduce a la liberación de los factores de transcripción aguas abajo y a la regulación de genes que responden a AJ en varios procesos como

se describe en la Figura 1.13. Entre otros, el AJ estimula la síntesis de proteínas relacionadas con la respuesta defensiva en plantas y la acumulación de metabolitos secundarios (Martínez-Esplá y col., 2017). El jasmonato de metilo (JaMe) (Figura 1.13A) es un derivado volátil del AJ, que ha sido utilizado con éxito a una concentración de 0.2 mM para reducir las podredumbres desarrolladas por *Monilinia fructicola* en cerezas, siendo más efectivo que aplicarlo durante la post-cosecha (Yao y Tian 2005b). La dosis efectiva de MeJa para inducir la resistencia adquirida varía con el fruto, siendo la concentración mínima aplicada con efectividad de 0.045 mM para el control de Antracnosis en tomate (Tzortzakis, 2007), mientras que la más elevada fue de 10 mM en tomate para controlar *Botrytis cinerea* (Zhu y Tian, 2012). Al aplicar JaMe en pre-cosecha se induce la expresión de los sistemas antioxidantes, entre los que cabe destacar los relacionados con la síntesis de compuestos fenólicos a través de la activación de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) (Rudell y col., 2005; García-Pastor y col., 2019). Tratamientos con JaMe promueven la acumulación temprana de peróxido de hidrógeno (Zhu y Tian, 2012), lo que se traduce en un aumento de la expresión de las enzimas catalasa (CAT), peroxidasa (POD), ascorbato peroxidasa (APX) y superóxido dismutasa (SOD) tal y como se han podido medir en granadas (García-Pastor y col., 2020), uvas (García-Pastor y col., 2019) o cerezas (Giménez y col., 2019).



**Figura 1.13.** A) Estructura química del jasmonato de metilo (JaMe). B) Estructura química del ácido oxálico (AO). Fuente: JaMe (CID 5281929) y AO (CID 971), NCBI, 2021.

Este incremento en los sistemas antioxidantes se relaciona con una mayor vida útil del fruto durante la conservación post-cosecha. Se retrasa el proceso de maduración, senescencia y otros trastornos, reflejado en unas menores pérdidas de peso y firmeza, manteniendo la tasa de respiración y se minimizando o retrasando la producción de etileno (Zapata y col., 2014; García-Pastor y col., 2019).

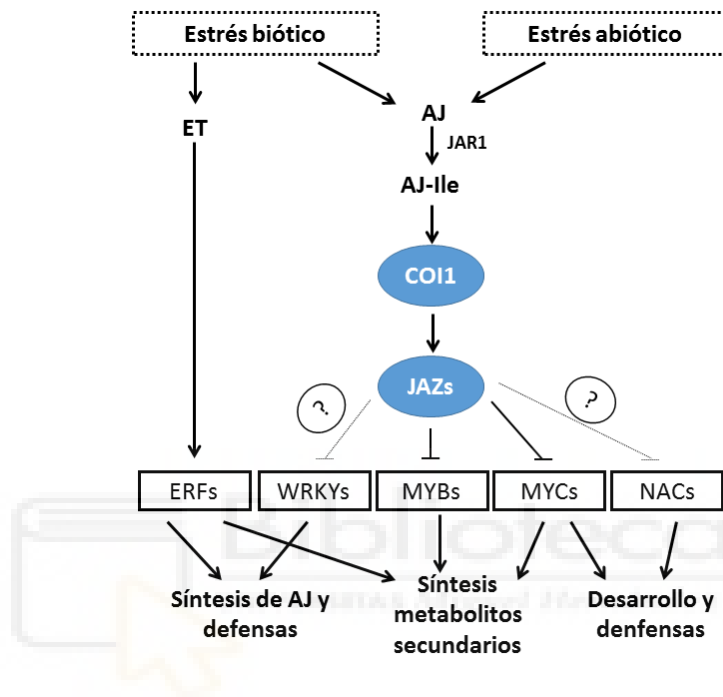


Figura 1.13. Regulación mediada por el ácido jasmónico (AJ). El símbolo de interrogación indica que hay una proteína adaptadora no identificada. Fuente: Ruan y col., 2019.

### 10.1.2. Ácido oxálico

El ácido oxálico (AO) (Figura 1.13B) es un ácido orgánico cuya ruta de síntesis no ha sido bien documentada en plantas. Sin embargo, se ha propuesto que el oxalato se sintetiza a partir de tres precursores, glioxilato/glicolato, ascorbato y oxalacetato. Durante la fotorrespiración se ha podido relacionar la síntesis de oxalato con la oxidación de glicolato/ glioxilato a través de la enzima glicolato oxidasa (Cai y col., 2015). Se ha planteado también que la degradación oxidativa del oxalacetato sería otra fuente de oxalato, proceso en el que interviene la enzima oxalacetato acetilhidrolasa. Los resultados obtenidos utilizando precursores radiomarcados de la síntesis de oxalato,

respaldaron una ruta que implica la una escisión C2/ C3 del ácido ascórbico en la producción de oxalato (Kostman y col., 2001).

El AO aplicado durante la pre-cosecha retrasa la senescencia y mantiene la calidad de frutos como en el caso de cerezas (Martínez-Esplá y col., 2014) o melocotones (Razavi y Hajilou., 2016). En cuanto al modo de acción, se ha podido establecer que interviene en la acumulación de compuestos ROS (Ding y col., 2007), suprime la actividad de la alcohol deshidrogenasa (ADH), promueve la acumulación de prolina y mantiene altos niveles de ATP (Peiyan y col., 2014), regula la proporción de ácidos grasos insaturados y saturados (Jin y col., 2014) e interviene en el metabolismo de los azúcares (Wang u col., 2016). Por otro lado, los tratamientos de AO se han asociado con un aumento en la actividad de enzimas relacionadas con la resistencia a patógenos como POD, APX, SOD y CAT, en este sentido, también se ha descrito un aumento en la acumulación de compuestos fenólicos (Serrano y col., 2018, García-Pastor y col., 2020). Los tratamientos con AO favorecen una respuesta en la planta y el fruto que mejora la homeostasis celular al reducir el estrés oxidativo.

Pero también se ha descrito que el AO interviene en los factores de virulencia cuando se produce una infección por *Sclerotinia sclerotiorum* patógeno vegetal de más de 600 plantas, entre ellas los cítricos (Hanif y col., 2016). El AO presenta un doble rol, ya que durante el proceso de infección el patógeno *S. sclerotiorum* sintetiza AO en exceso, el cual se almacena en las vacuolas y colabora en debilitar al hospedador, ya que posibilita que el patógeno escape a los sistemas de reconocimiento de estrés o daño, como de la proteína inhibidora de la poligalaturonasa (PGIP) (Kalunke y col., 2015), induciendo también el cierre de estomas, la quelación del  $\text{Ca}^{2+}$  de la pared celular y además crea un entorno de pH ácido que facilita el proceso de apoptosis programada en la célula huésped (Kabbage y Williams, 2013).

Estudios realizados con *Arabidopsis thaliana* muestran que tratamientos con AO hasta una concentración de 5 mM no afectan al desarrollo de la planta e inducen la expresión de genes relacionados con la defensa, lo que protege a la planta de posibles infecciones. Sin embargo, concentraciones superiores a 6

mM promueven la apoptosis programada de las células y facilita el desarrollo de posibles hongos patógenos (Lehner y col., 2008).

### **10.1.3. Salicilatos**

El ácido salicílico (AS) o 2-hidroxibenzoico, es un regulador endógeno del crecimiento de las plantas. Es un compuesto de naturaleza fenólica que posee un anillo aromático con un grupo hidroxilo u otro derivado funcional. Estudios realizados en arroz proponen que el AS es sintetizado a partir del ácido cinámico, presentando dos posibles rutas biosintéticas, una de ellas implica la descarboxilación de la cadena lateral del ácido cinámico, formando ácido benzoico, el cual se hidroxila dos veces más para formar AS, esta etapa está regulada por la enzima ácido benzoico 2-hidrolasa. La otra ruta propone que el ácido cinámico sufre dos hidroxilaciones, lo que da lugar a o-cumárico que después se descarboxila y forma AS (Silverman y col., 1995). Estudios más recientes han presentado la ruta del ácido siquímico, proponiendo dos rutas a partir del corismato. Una mediada por la enzima isocorismato sintetasa (ICS) en los cloroplastos, y otra en la que interviene la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) en el citoplasma, que convierte el ácido benzoico en ácido o-cumárico, precursor del AS (Dempsey y col., 2011).

El efecto más característico del AS es la inducción de la resistencia sistémica adquirida, interviniendo en la resistencia a enfermedades locales y endémicas de las plantas, activando las defensas. El AS se sintetiza y se transporta por el floema a toda la planta, protegiendo a toda la planta de futuras infecciones. Además, entre sus efectos fisiológicos destacan la estimulación de la germinación de semillas, el crecimiento del fruto o la floración (Lefevre y col., 2020).

El ácido acetil salicílico (AAS) es un análogo del AS, en el que se transforma de forma espontánea al hidrolizarse. Otro derivado es su forma metilada, que recibe el nombre de salicilato de metilo (SaMe), el cual es volátil y puede difundir a través de las membranas, por lo que actúa como una molécula señal. Se han descrito importantes efectos del uso de AAS y SaMe durante la pre-cosecha, reduciendo los daños por frío, la susceptibilidad a

podredumbres y permitiendo una mayor vida útil de los productos vegetales tratados (Martínez-Esplá y col., 2018; García-Pastor y col., 2020).



---

## CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

---







## CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

Los cítricos se enfrentan a una serie de dificultades durante su producción, procesado y comercialización que afectan a la calidad de los frutos. Por lo tanto, para mantener la calidad y prologar la vida útil de los cítricos es necesaria la implantación de sistemas que controlen el estado de los frutos durante la post-recolección. Además, tratándose de producción ecológica se utilizan una serie de tratamientos con un impacto ambiental, sobre la salud humana y animal muy reducido, cumpliendo con las exigencias de la normativa.

Esta Tesis Doctoral se realiza con el objetivo de evaluar el efecto post-cosecha de los tratamientos pre-cosecha con jasmonato de metilo y ácido oxálico en limones. Además, de valorar el efecto *in vitro* e *in vivo* de los tratamientos post-cosecha con Timol y Carvacrol encapsulados en HP- $\beta$ -ciclodextrinas, determinando su efectividad para controlar enfermedades post-cosecha en limón,

Por lo tanto, para conseguir este propósito se establecen los siguientes objetivos generales:

1) Evaluar el efecto de los tratamientos pre-cosecha con jasmonato de metilo y ácido oxálico durante el desarrollo del fruto en el árbol. Para la consecución de este objetivo se aplicarán 3 concentraciones 0.1, 0.5 y 1 mM, mensualmente, a partir del momento en el que los árboles presenten la carga final de fruta a producir, con un tratamiento final tres días antes de la recolección.

El efecto de los tratamientos será evaluado a través del análisis de las producciones en los árboles tratados (peso medio del fruto, kilogramos por árbol y número de frutos por árbol). Además, se medirá el efecto sobre los parámetros fisiológicos del fruto, como la tasa de respiración y la producción de etileno, parámetros relacionados con la calidad organoléptica, como el color y la firmeza, parámetros relacionados con la calidad nutricional, como sólidos solubles totales y acidez total. También se analizará la calidad funcional midiendo el contenido en fenoles totales, y el efecto de los tratamientos sobre la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), peroxidasa (POD) y ascorbato peroxidasa (APX) por su relación con la eliminación de los radicales libres de oxígeno, implicados en el proceso de maduración y senescencia.

2) Determinar el efecto de estos tratamientos pre-cosecha sobre el desarrollo de los parámetros de calidad de los limones, durante la conservación post-cosecha en condiciones refrigeradas. Para afrontar este objetivo, se seleccionarán limones tratados con todas las concentraciones utilizadas previamente, y se compararán con limones de árboles no tratados. El estudio se realizará en dos variedades cultivadas en la misma finca, localizada en Cartagena (Murcia, España). Siendo los parámetros de calidad a analizar los mismos que se han numerado en el **Punto 1**.

3) Determinar la efectividad de los aceites esenciales Timol y Carvacrol encapsulados en HP- $\beta$ -ciclodextrinas (HP- $\beta$ -CDs), a través de dos métodos de inclusión distintos, irradiación por microondas (MO) y 'slurry' (S), sobre el crecimiento del hongo fitopatógeno *Geotrichum citri-aurantii*. Para desarrollar este objetivo se aplicarán los aceites esenciales encapsulados a las concentraciones 2,5, 5, 12, 25 y 50 mM utilizando técnicas *in vitro*.

El efecto de los tratamientos sobre el crecimiento del hongo fitopatógeno *G. citri-aurantii* será evaluado analizando la dosis efectiva, la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima fungicida. Mediante el análisis turbidimétrico en microcultivos, y aplicando otros métodos como el recuento en placa o evaluando el crecimiento del microorganismo en disco en medios con las distintas concentraciones de los aceites esenciales encapsulados.

4) Analizar el efecto de los aceites esenciales encapsulados en HP- $\beta$ -CDs, a través de los dos métodos de inclusión, como tratamiento en post-cosecha en frutos inoculados con el hongo fitopatógeno *G. citri-aurantii*, para determinar su efectividad como tratamiento curativo, preventivo o ambos.

Para desarrollar este objetivo, los aceites esenciales encapsulados serán aplicados a las concentraciones 25 mM y 50 mM, antes y después de inocular los limones con el hongo *G. citri-aurantii*, de la misma forma otros limones inoculados serán tratados con el fungicida comercial Propiconazol. Durante el período de incubación se comparará la incidencia de podredumbres entre los distintos tratamientos. Además, se evaluarán los efectos de los tratamientos sobre la conservación del limón, estudiando las pérdidas de peso, el efecto sobre la tasa de respiración y producción de etileno, y otros

parámetros como la acidez total y los sólidos solubles totales. En la zona del fruto donde se inoculará el hongo y se aplicarán los tratamientos con los aceites esenciales encapsulados se cuantificará el contenido en fenoles totales y la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), peroxidasa (POD) y ascorbato peroxidasa (APX), por su relación con la detoxificación de las especies reactivas del oxígeno.

Los resultados esperados, de conformidad con lo anteriormente expuesto en la introducción, será obtener unos frutos con una mayor calidad y con un mayor contenido en compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes, lo que supondrá un beneficio al aumentar la vida útil del fruto, ya que la presencia de estos compuestos antioxidantes están vinculados con el proceso de maduración y senescencia del fruto. Además, supondrá un beneficio para la salud de los consumidores, ya que existe la relación entre el consumo de frutos con un elevado contenido en compuestos antioxidantes y la prevención de ciertas enfermedades. En cuanto a la aplicación de aceites esenciales encapsulados en post-cosecha, se espera que mantengan la calidad del fruto durante un mayor intervalo de tiempo y reduzcan la incidencia de enfermedades relacionadas con microorganismos fitopatógenos. Finalmente, es preciso destacar que los compuestos utilizados están considerados como sustancias GRAS, por lo que garantiza el cumplimiento de las demandas de parte de los consumidores, que señalan la importancia de utilizar estrategias de producción y conservación inofensivas para la salud humana, animal y respetuosas con el medio ambiente.

---

# CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---





## CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. MATERIAL VEGETAL Y DISEÑO EXPERIMENTAL DE LOS TRATAMIENTOS PRE-COSECHA

Los ensayos pre-cosecha se realizaron durante cinco años consecutivos, desde el 2016 al 2020 (ambos incluidos).

En **2016**, se trató la variedad de limonero 'Fino' sobre patrón *Citrus macrophylla*, cultivada en una explotación comercial ubicada en Cartagena (37,401573 N, 0,505401 O, Murcia, España), los suelos donde se realizaron los ensayos son de tipo ardisol, con un 43,1 % de arcilla, un 24,3 % franco y un 32,6 % de arena, la conductividad eléctrica es de 0,313 dS m<sup>-1</sup> y el pH de 8,16, representando estos valores la media de tres analíticas. Además, los campos están situados en una zona con clima mediterráneo, caracterizado por una temperatura media anual de 18 °C y unas precipitaciones de 47,6 mm / día. Los limoneros fueron cultivados conforme a la normativa de la Agricultura Ecológica vigente, utilizando un marco de plantación de 7 x 5 m y 8 años de edad. Se seleccionaron las filas, y en ellas se marcaron 20 árboles agrupados en bloques de 5 unidades por tratamiento, buscando un diseño homogéneo. Los tratamientos aplicados fueron el control y el jasmonato de metilo (JaMe) a tres concentraciones 0,1, 0,5 y 1 mM. De cada fila los dos primeros y los dos últimos árboles se consideraron como barrera para minimizar el 'efecto borde', además, en la fila los bloques tratados se separaron dejando un árbol sin tratar para evitar contaminación cruzada.

Los tratamientos con JaMe fueron diluidos en etanol absoluto, y a continuación, se le añadió Tween 20 a una concentración final del 0,5 %, como tensioactivo. Los controles se prepararon mezclando agua con el Tween 20 al 0,5 %. Los tratamientos fueron aplicados mediante pulverización foliar, dosificando 5 L por árbol (lo suficiente para humedecer que la parte aérea del árbol). Los tratamientos se iniciaron al finalizar la etapa en la que se produce la caída fisiológica del fruto, repitiendo los tratamientos mensualmente, y aplicando el último tratamiento 3 días antes de la recolección.

La recolección se realizó el 28 de diciembre de 2016, cuando el limón alcanzó el calibre comercial que el técnico de campo indicó (> 55 mm), y se valoró el efecto de los tratamientos pre-cosecha sobre la producción, contabilización el número de frutos por árbol, el peso medio de los frutos (gramos) y la producción en kilogramos por árbol. Además, se cogieron 20 kilogramos de limones, aproximadamente, de cada uno de los tratamientos e inmediatamente se transportaron al laboratorio. A continuación, para los experimentos del ensayo post-cosecha se prepararon 6 lotes de 10 frutos, sin daños físicos y homogéneos en tamaño y color para cada una de las réplicas de campo, los cuales se pesaron y se almacenaron a 10 °C con una humedad relativa del 85 al 90 % durante 0, 7, 14, 21, 28 y 35 días. En cada fecha de muestreo, se cogió un lote por réplica y tratamiento al azar para realizar las siguientes determinaciones analíticas; pérdidas de peso, color, firmeza, contenido en sólidos solubles totales (SST) y acidez total (AT). Además, de cada fruto de los diferentes tratamientos, se tomaron seis tiras longitudinales de flavedo de 1 cm de ancho y se congelaron inmediatamente con N<sub>2</sub> líquido, al mismo tiempo se tomaron muestras de zumo y se almacenaron a -80 °C. A los 7 días se cuantificó el contenido en compuestos fenólicos y la actividad de las enzimas antioxidantes, catalasa (CAT), peroxidasa (POD) y ascorbato peroxidasa (APX), por duplicado.

En **2017**, se repitieron los tratamientos en la variedad 'Fino' sobre patrón *C. macrophylla*, cultivada en la misma explotación comercial situada en Cartagena (Murcia, España) bajo idénticas condiciones y prácticas agronómicas como las descritas en 2016. Para realizar los tratamientos pre-cosecha, se seleccionaron 20 árboles en bloques de 5 unidades para el control y el tratamiento con JaMe 0,1 mM, concentración seleccionada a partir de los mejores resultados obtenidos durante 2016, además, las disoluciones fueron preparadas como ya se ha descrito en el apartado anterior. En la parcela a tratar se mantuvieron 2 árboles en cada extremo para minimizar el 'efecto borde', y se dejó un árbol sin tratar entre los bloques tratados para evitar contaminación cruzada. La frecuencia y el modo en el que fueron preparados y aplicados los tratamientos fue el mismo que durante el año 2016.



La recolección se inició el 13 de diciembre de 2017, y se evaluó el efecto de los tratamientos pre-cosecha sobre la producción tal y como se realizó en 2016. 20 kilogramos de limón de cada tratamiento fueron transportados rápidamente al laboratorio para elaborar los lotes con 10 frutos por réplica y tratamiento para los ensayos post-cosecha, los lotes fueron almacenados a una temperatura de 10 °C y a una humedad relativa del 85 al 90 %. Siguiendo la metodología descrita en el ensayo de 2016, se tomó un lote al azar después de 0, 7, 14, 21, 28 y 35 días de almacenamiento refrigerado, para realizar las determinaciones analíticas anteriormente descritas. Además, en el experimento realizado en 2017, se recogieron dos limones de cada árbol tras 3 días del tratamiento 1 (T1), tratamiento 5 (T5) y tratamiento 6 (T6), después de 3, 4, 5 y 6 días del tratamiento 2 (T2) y del tratamiento 3 (T3) y a los 3, 4, 5, 8, 11, 15 y 22 días del tratamiento 4 (T4). Estos frutos fueron agrupados en lotes de 10 limones, mezclando la piel y el zumo y almacenados a -80 °C hasta que se midieron los fenoles totales y la actividad de las enzimas antioxidantes.

En **2018**, además de la variedad 'Fino' sobre patrón *C. macrophylla* se utilizó la variedad 'Verna' sobre patrón *Citrus aurantium*, cultivadas las dos en la misma explotación comercial identificada geográficamente en el año 2016, la cual está situada en Cartagena (Murcia, España). Las prácticas agronómicas para las dos variedades fueron idénticas a las vistas durante los años 2016 y 2017. Los árboles de la variedad 'Fino' tenían 10 años de edad y los árboles de la variedad 'Verna' 7 años.

Para realizar los tratamientos pre-cosecha, en cada variedad se seleccionaron 20 árboles en bloques de 5 unidades para los controles y los tratamientos con JaMe 0,1 mM. Se mantuvieron 2 árboles en cada extremo de la parcela para minimizar el 'efecto borde', y se dejó un árbol sin tratar entre los bloques tratados para evitar contaminación cruzada. Las disoluciones de los tratamientos se prepararon y se aplicaron como se ha descrito previamente en el año 2016. La fecha de recolección para la variedad 'Fino' fue el 11 de diciembre de 2017, distinta a la de la variedad 'Verna' que fue el 2 de mayo de 2018.

Durante la recolección se cuantificó el efecto de los tratamientos pre-cosecha sobre la producción en las dos variedades como en los años 2016 y

2017. Además, se transportaron inmediatamente 20 kilogramos de limones sin defectos físicos y homogéneos en color y tamaño al laboratorio para elaborar los lotes de 10 frutos por réplica para los ensayos post-cosecha a los 0, 7, 14, 21, 28 y 35 días, siendo almacenados a una temperatura de 10 °C y a una humedad relativa del 85 al 90 %. Cada día de muestreo se tomó un lote al azar para realizar las determinaciones analíticas descritas previamente en los experimentos de los años anteriores.

En **2019** se inició un experimento en el que se aplicó ácido oxálico (AO) durante la pre-cosecha en árboles de la variedad 'Fino' sobre patrón *C. macrophylla*. La explotación comercial situada en Cartagena (Murcia, España), las condiciones y las prácticas agronómicas fueron las mismas que se han descrito en los años anteriores. En las filas seleccionadas se identificaron 20 árboles agrupados en bloques de 5 unidades por tratamiento. Los tratamientos aplicados fueron el control y el AO a tres concentraciones 0,1, 0,5 y 1 mM. De cada fila los dos primeros y los dos últimos árboles se consideraron como barrera para minimizar el 'efecto borde', además, en la fila los bloques tratados se separaron dejando un árbol sin tratar para evitar contaminación cruzada.

Los tratamientos con AO fueron preparados diluyéndolo directamente en agua destilada, luego se le añadió Tween 20 como tensioactivo hasta conseguir una concentración final al 0,5 %. Los controles se prepararon mezclando agua con el Tween 20 al 0,5 %. Los tratamientos fueron aplicados mediante pulverización foliar, dosificando 5 L por árbol (lo suficiente para humedecer que la parte aérea del árbol), cada mes tras la etapa en la que se produce la caída fisiológica del fruto, con un tratamiento final 3 días antes de la recolección.

La recolección se realizó el 13 de diciembre de 2019, cuantificando el efecto de los tratamientos pre-cosecha con AO sobre la producción como ya se hizo en el caso de los tratamientos con JaMe los años anteriores. Se cogieron 20 kilogramos de limones homogéneos en color y tamaño para cada tratamiento y se transportaron inmediatamente al laboratorio. Se prepararon lotes con 10 frutos por réplica para los ensayos post-cosecha a los 0, 7, 14, 21, 28 y 35 días, siendo almacenados a una temperatura de 10 °C y a una humedad relativa del 85 al 90 %. Cada día de muestreo se tomó un lote al azar

para realizar las determinaciones analíticas descritas previamente en los experimentos de los años anteriores.

En **2020** se repitieron los tratamientos pre-cosecha con AO 1 mM, debido a los resultados obtenidos en 2019, en árboles de la variedad 'Fino' sobre patrón *C. macrophylla*, en idéntica localización, condiciones y prácticas agronómicas que en los años anteriores. Se seleccionaron 20 árboles en bloques de 5 unidades manteniendo 2 árboles en cada extremo para minimizar el 'efecto borde', y se dejó un árbol sin tratar entre los bloques tratados para evitar contaminación cruzada. Los tratamientos con AO 1 mM y control fueron preparados en el año 2019, además, la frecuencia y el modo en el que fueron aplicados los tratamientos fue el mismo que durante el año 2019.

La recolección se inició el 11 de diciembre de 2020, evaluando el efecto sobre la producción como ya se ha descrito previamente. Se seleccionaron 20 kilogramos de limón de cada tratamiento, los cuales fueron transportados rápidamente al laboratorio. Se prepararon los lotes con 10 frutos por réplica para los ensayos post-cosecha, los lotes fueron almacenados a 10 °C y a una humedad relativa del 85 al 90 %, siguiendo la metodología descrita en los ensayos anteriores. Se tomó un lote al azar después de 0, 7, 14, 21, 28 y 35 días de almacenamiento refrigerado, para realizar las determinaciones analíticas descritas en el año 2016. Además, en el experimento realizado en 2020, como ya se describió en los experimentos de 2017, se recolectaron dos limones de cada árbol tras 3 días del tratamiento 1 (T1) y del tratamiento 5 (T5), y después de 3, 4, 5 y 6 días del tratamiento 2 (T2) y del tratamiento 3 (T3) y a los 3, 4, 5, 8, 11, 15 y 22 días del tratamiento 4 (T4). Estos frutos fueron agrupados en lotes de 10 limones, mezclando la piel y el zumo y almacenados a -80 °C hasta que se midieron los fenoles totales y la actividad de las enzimas antioxidantes.

## **3.2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS**

### **3.2.1. Tasa de respiración**

Para determinar la tasa de respiración se utilizó el sistema propuesto por Kader (1995), que supone encerrar un producto en un recipiente hermético

durante un periodo de tiempo. Para realizar estas medidas se colocó cada fruto, individualmente, de un total de 30, en un frasco de vidrio de 0,5 L durante 60 minutos. La tapadera incorporaba un septum (válvula de material elástico), que permitió tomar una muestra del aire de cabeza con jeringas de 1 mL.

La producción de CO<sub>2</sub> se cuantificó utilizando un cromatógrafo de gases Shimadzu 14B-GC acoplado a un detector de conductividad térmica (TCD) y una columna CTR I (ALLTECH), bajo las siguientes condiciones de trabajo: temperatura del horno 35 °C, temperatura del inyector 120 °C, temperatura del detector 120 °C y el flujo de la fase móvil (Helio) de 65 mL/min. Previo a la inyección de la muestra tomada en el frasco hermético, se realizó una calibración con una muestra de aire atmosférica, cuya concentración de CO<sub>2</sub> es de 0,036 %. El cromatógrafo estaba asociado a un equipo informático que registra e integra el área del pico, permitiendo la cuantificación. Para calcular el CO<sub>2</sub> producido se utiliza el peso del fruto, el volumen del recipiente y el tiempo que permanece en el recipiente, mediante la fórmula:

$$\frac{mgCO_2}{kg \times h} \equiv \frac{(V - P) \times (0,687 \times A_{CO_2} \times 60)}{A_{patrón} \times P \times T}$$

Luego se compara el área de integración del pico de la muestra con la de patrones a una concentración conocida. Los resultados para la tasa de respiración fueron la media  $\pm$  ES y se expresaron como mg de CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

### 3.2.2. Pérdida de peso

La determinación del peso se realizó mediante una balanza Radwag WLC 2/A2 (Radwag wagi Elektroniczne) con 2 cifras decimales de precisión y se expresó en gramos. El día de la recolección se pesaron todos los frutos que formaron parte de los lotes y que volvieron a pesarse en los diferentes períodos de conservación. Calculándose el porcentaje de pérdida de peso de cada lote con respecto a su peso inicial, los resultados son la media  $\pm$  ES del total de frutos por lote.

### **3.2.3. Color**

El color externo de los 10 frutos por réplica se determinó en 3 puntos equidistantes del perímetro ecuatorial del fruto utilizando un colorímetro triestímulo Minolta (CRC 200, Minolta Camera Co., Japon), usando el sistema de coordenadas CIELab ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ). Es el sistema de medida que más se acerca a la percepción humana del color y cuyo análisis permite distinguir la luminosidad que oscila entre 100 para el blanco y 0 para el negro, y la cromaticidad (tono y croma), que se indica con por los parámetros  $a^*$  y  $b^*$  conjuntamente. Los resultados se expresan con el índice  $a^*$ , que representa el eje que va desde colores verdes hasta colores rojos. Los datos son el resultado de la media  $\pm$  ES del total de frutos de cada lote.

### **3.2.4. Textura**

La firmeza se determinó individualmente en cada uno de los frutos de cada réplica utilizando un texturómetro TA-XT2i (Stable Microsystems, Godalming, UK) acoplado a una sonda que presenta una placa con un disco de acero plano, que es válido para hacer ensayos de tracción, compresión y flexión con una fuerza máxima de 25 N y una precisión media de 0,5 a 1 %. Para determinar la firmeza del fruto el disco de acero de la sonda aplica una fuerza constante sobre la superficie del fruto, hasta producirle una deformación del 5 % respecto a su diámetro ecuatorial. Los resultados se expresan en  $N\ mm^{-1}$ , siendo la media  $\pm$  ES de las medidas realizadas a cada fruto de cada uno de los lotes.

### **3.2.5. Procesado de muestras**

Tras realizar las determinaciones descritas previamente, de cada uno de los frutos que conforman los lotes se extrajeron 6 láminas de flavedo de 1 cm de ancho, las cuales fueron debidamente identificadas y almacenadas en bolsas con autocierre zip a  $-80\ ^\circ C$ . A continuación, los frutos se parten en dos mitades para obtener el zumo, el cual se utiliza para realizar las determinaciones de sólidos solubles totales y acidez total. Finalmente, se guarda 1,5 mL de zumo en tubos de plástico (Eppendorf) para microcentrífuga a  $-20\ ^\circ C$  para futuras determinaciones.

### 3.2.6. Sólidos solubles totales

Los sólidos solubles totales (SST) del zumo recién exprimido y filtrado a través de una gasa, se midieron por duplicado mediante refractometría. Para ello se utilizó el refractómetro digital Hanna HI96801 (Hanna Instruments, Rhode Island, EEUU), el cual se calibra con agua destilada y las lecturas se realizan a 20 °C. Esta técnica se basa en los distintos índices de refracción que presentan dos medios con unas sustancias disueltas diferentes, el zumo y el agua destilada. Los resultados se expresaron como g equivalentes de sacarosa en 100 g<sup>-1</sup> de peso fresco y representan la media ± ES de las determinaciones realizadas en los frutos.

### 3.2.7. Acidez titulable

La acidez total (AT) se determinó por duplicado en el mismo zumo mediante valoración potenciométrica automática con un equipo 785 DMP Tritino (Metrohm), con una sensibilidad de ± 0,01 pH. Se tomó 0,5 mL de zumo diluido en 25 mL de agua destilada, añadiendo NaOH 0,1 N hasta alcanzar el pH = 8,1 (AOAC, 1990). Los resultados se expresaron como g de ácido cítrico equivalentes a 100 g<sup>-1</sup> de peso fresco, y son la media ± ES de las determinaciones realizadas en los frutos de cada lote.

$$\frac{\text{g de ácido cítrico eq}}{100g_{pf}} = \frac{6,4 \cdot V_1 \cdot f \cdot N}{V_2}$$

### 3.2.8. Fenoles totales

Los fenoles totales fueron extraídos y cuantificados de acuerdo con Zapata y col., (2014) con pequeñas modificaciones. En un tubo de centrifuga se pesaron 2 g de flavedo, troceado en secciones de menor tamaño de 3 tiras longitudinales diferentes, y se añadieron 15 mL de una disolución con agua : metanol (2 : 8) que contenía fluoruro de sodio 2 mM (para inactivar a la enzima polifenol oxidasa y así prevenir la degradación fenólica). Se homogeneizó con un Polytron (IKA T18 basic, Ultraturrax) durante 30 segundos y se centrifugó a 10.000 x g en una centrifuga C30P (B. Braun Biotech international) durante 12 minutos a 4 °C. A continuación, se midió el volumen final del sobrenadante y se

tomó muestra suficiente para su posterior cuantificación. Las extracciones se realizaron por duplicado para para cada una de las muestras previamente procesadas. Las muestras de zumo fueron centrifugadas a 8.000 x g durante 5 minutos a 4 °C, utilizando el sobrenadante para la cuantificación por duplicado de cada una de las muestras del lote.

En las muestras previamente extraídas en metanol se realizó la determinación del contenido en fenoles totales utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu, basado en una reacción de óxido-reducción que causa la aparición de una coloración azulada que puede ser medida espectrofotométricamente. En un tubo de ensayo de vidrio se añadieron 50 µL de extracto de cada muestra (flavedo o zumo centrifugado), 450 µL de tampón fosfato pH 6,8 y 2,5 mL del reactivo Folin diluido 1 : 10. Se agitó durante 10 segundos en un vortex (IKA) y se dejó reposar durante 2 minutos a temperatura ambiente. Luego, se añadieron 2 mL de carbonato sódico anhidro (0,7 M) parando la reacción, y se agitó durante otros 10 segundos. Finalmente, los tubos de ensayo se introdujeron en un baño a 50 °C durante 5 minutos.

La lectura de las muestras se realizó con un espectrofotómetro UV-1700 Pharma Spec (Shimadzu), midiendo la absorbancia a 760 nm. Se cuantificó en base a una recta patrón con ácido gálico, expresando los resultados como mg de ácido gálico equivalentes (GAE) en 100 g<sup>-1</sup> de peso fresco, y los datos fueron la media ± ES.

### **3.2.9. Enzimas antioxidantes**

El extracto para la determinación de la actividad de las enzimas CAT, APX y POD se obtuvo pesando 2 g de flavedo congelado, el cual fue troceado en secciones más pequeñas de 3 tiras longitudinales diferentes, con 10 mL de tampón fosfato 50 mM pH = 6,8 que contiene 1 % (p/v) polivinilpirrolidona (PVP), para eliminar los polifenoles presentes en la extracción, y 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) que actúa como un quelante para desactivar las metaloproteínas. La muestra se homogeneizó en un Polytron durante 30 segundos y se centrifugó a 10.000 x g en una centrífuga C30P (B. Braun Biotech International) durante 15 minutos a 4 °C, utilizando el sobrenadante para determinar la actividad enzimática.



#### **a) Catalasa (CAT)**

La cuantificación de la actividad catalasa se realizó de acuerdo a lo descrito por Martínez-Esplá y col., (2017) con pequeñas modificaciones. La reacción enzimática presenta un volumen final de 3 mL, y contenía 2,9 mL de una mezcla de tampón fosfato 50 mM pH = 6,8 con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 mM, al cual se le añadieron 100 µL del extracto de cada muestra. La degradación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue medida por duplicado por la disminución de absorbancia a 240 nm durante 1 minuto. Una unidad enzimática (U) se define como la disminución de 0,01 de absorbancia por minuto, siendo los resultados de la actividad CAT expresados como U min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>, los datos fueron la media ± ES.

#### **b) Ascorbato peroxidasa (APX)**

Para determinar la actividad ascorbato peroxidasa se utilizó el protocolo descrito por Valverde y col., (2015) con pequeñas modificaciones. La mezcla contiene tampón fosfato 50 mM pH = 6,8, ácido ascórbico 0,5 mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM, añadiéndole 100 µL del extracto de cada muestra para iniciar la reacción, en un volumen final de 3 mL. Se midió el descenso de absorbancia a 290 nm durante 1 minuto por duplicado. Una unidad enzimática (U) se define como la disminución de 0,01 de absorbancia por minuto, siendo los resultados de la actividad APX expresados como U min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>, los datos fueron la media ± ES.

#### **c) Peroxidasa (POD)**

La actividad de la enzima peroxidasa se determinó de acuerdo con publicaciones previas (Zapata y col., 2014), en una mezcla que contiene tampón fosfato 50 mM pH 6,8, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12 mM, guayacol 14 mM y 200 µL del extracto diluido 1:20, en un volumen final de la reacción de 3 mL. Se midió el incremento de absorbancia a 470 nm derivado de la oxidación de guayacol a tetraguayacol durante 1 minuto, el cual presenta un color rojo característico. Una unidad enzimática (U) se define como la disminución de 0,01 de absorbancia por minuto, siendo los resultados de la actividad POD expresados como U min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>, los datos fueron la media ± ES.



### **3.2.10. Proteínas**

El contenido de proteínas totales en los extractos utilizados para los ensayos enzimáticos fue cuantificado según el método descrito por Bradford (1976). Es una técnica colorimétrica que se basa en añadir un colorante ácido (Coomassie Brilliant Blue G-250), de color rojo, a una solución con proteínas. Los grupos sulfónicos ionizados interactúan con los residuos cargados positivamente de las proteínas, que modifican su estructura, revelando grupos hidrofóbicos que contribuyen a la fijación con el colorante (Compton y col., 1985). La unión con la proteína consume la forma aniónica del colorante, lo que produce un viraje de color hacia el azul.

Para determinar la concentración de proteína total presente en las muestras se preparó una curva patrón con seroalbúmina bovina (BSA) en un rango de 0 a 90 µg, ajustando a un volumen final de 300 µL con agua ultrapura. Finalmente se añaden 3 mL del reactivo de Bradford, tanto a los tubos con BSA como a los que contienen la muestra, los tubos se agitan y se procede a la lectura de la absorbancia a 595 nm utilizando un espectrofotómetro UV-1700 Pharma Spec (Shimadzu).

### **3.3. MÉTODOS DE ENCAPSULACIÓN**

Los complejos formados con timol y carvacrol encapsulados en HP-β-CDs, fueron proporcionados por el Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Católica San Antonio de Murcia (UCAM). Para su elaboración se desarrollaron los pasos descritos a continuación.

#### **a) Método de irradiación por microondas ('Slurry')**

La encapsulación de los aceites esenciales se realizó de acuerdo a lo publicado por Rodríguez-López y col. (2018). Las soluciones acuosas con HP-β-CDs a diferentes concentraciones (0-100 mM), pero manteniendo una relación 1:1, fueron irradiadas durante 30 segundos, a intervalos de 30 segundos, hasta alcanzar la disolución una temperatura de 70 °C. A continuación, se añadieron los aceites esenciales Timol y Carvacrol, irradiando de nuevo durante 30 segundos (a intervalos de 10 segundos) hasta alcanzar los 70 °C. Las muestras se agitaron y se mantuvieron durante 12 horas en

viales sellados y protegidos de la luz. Una vez transcurrido dicho tiempo, las muestras fueron de nuevo sometidas a otra etapa de irradiación, según el procedimiento ya descrito. Las disoluciones fueron filtradas utilizando un filtro de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  para eliminar el exceso de monoterpeno (no disuelto). Finalmente fueron sometidas a un proceso de atomización utilizando un atomizador Mini Spray Dryer Büchi B290 (Flawil, Suiza), la temperatura e entrada de aire se fijó en 170 °C y de salida en 68 °C, con un caudal de 5 mL/min, una presión del aire de 3,2 bar, una velocidad de rotación de 30.000 rpm y un diámetro de boquilla de 1,5 mm, para obtener los complejos en estado sólido. Para determinar la concentración de cada monoterpeno se utilizaron las muestras filtradas, las cuales fueron disueltas en etanol al 80 % para romper el complejo, cada muestra se introdujo en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS/ GC-QP, Shimadzu, 2010), equipado con una columna capilar Slb-5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm). Las condiciones de trabajo utilizadas fueron: temperatura inicial 70 °C, con un aumento de 4 °C/min hasta alcanzar los 160 °C y a partir de ahí 30 °C/min hasta 280 °C, la cual se mantiene durante 6 minutos, la temperatura del inyector fue de 250 °C, el tipo de inyección en modo Split 1:20 y se utilizó helio como gas portador. Los monoterpenos fueron cuantificados mediante el estudio de las áreas obtenidas tras la inyección, las cuales fueron interpoladas a las rectas de calibrado para cada monoterpeno. Para la identificación de los compuestos se utilizaron los tiempos de elución relativa y la comparación del espectro de masas de cada pico con la base de datos que incorpora el sistema.

#### **b) Método de solubilidad**

El proceso de encapsulación se determinó de acuerdo a publicaciones previas (Rodríguez-López y col., 2018). Se prepararon viales con una concentración creciente de HP- $\beta$ -CDs hasta una concentración de 100 mM. A cada disolución se le adicionó una cantidad saturante de Timol o Carvacrol, y se mantuvieron en un baño de ultrasonidos durante 60 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Tras ello la disolución se filtraron a través de un filtro de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  para eliminar el exceso de monoterpeno, y finalmente fueron sometidas a un proceso de atomización utilizando un atomizador Mini Spray Dryer Büchi B290 (Flawil), para obtener los complejos en estado sólido. La

concentración de cada monoterpeno fue determinada mediante cromatografía de gases como se ha descrito en la sección **3.3.a**.

### **3.4. CEPAS MICROBIANAS**

#### **a) Medios de cultivo**

Para el desarrollo de los ensayos se utilizaron distintos medios de cultivo según el proceso a realizar, presentando todos ellos su certificado de análisis, que aseguran la calidad de los productos. Son los siguientes:

- Agua peptona (AP), de Scharlau, Barcelona, sustrato de escasa capacidad nutritiva para inducir el crecimiento microbiano, utilizado para la extracción de los hongos fitopatógenos de los tejidos afectados y para realizar diluciones decimales.
- Agar patata dextrosa (APD), de Scharlau, Barcelona, medio de cultivo sólido para la detección y seguimiento del crecimiento de levaduras y mohos en alimentos. Es un medio débilmente selectivo para hongos debido a su alto contenido en azúcares y pH ácido. La selectividad del medio para el crecimiento de hongo se incrementó añadiendo al medio de cultivo antibióticos, como el cloranfenicol a una concentración de 0,05 g/ L (Merck KGaA)
- Medio patata dextrosa (MPD), Scharlau, Barcelona, medio de cultivo líquido para la detección y seguimiento del crecimiento de levaduras y mohos. Se aumentó la selectividad para el crecimiento de hongos del medio añadiendo cloranfenicol (0,05 g/ L).

#### **b) Aislamiento de *Geotrichum citri-aurantii***

La cepa de *G. citri-aurantii* fue aislada de limones 'Fino' con síntomas de pudrición ácida. Para ello se utilizó un bisturí y pinzas estériles con las que seleccionar el tejido afectado, se pesaron 5 g y se mezclaron con 45 mL de agua peptona (dilución  $10^{-1}$ ). La mezcla fue sometida a un proceso de homogeneización durante 3 minutos utilizando un homogeneizador Stomacher (Seward). A continuación, con 1 mL del contenido de la bolsa se realizó una dilución seriada hasta  $10^{-4}$  en tubos de vidrio. 0,1 mL de cada tubo de vidrio fue

sembrado aplicando el método de extensión en placa utilizando un asa Digralesky estéril, en placas con agar de patata dextrosa y cloranfenicol (0,05 g/ L). La incubación de las placas sembradas se realizó a 25 °C durante 5 días. Las placas con las colonias de *G. citri-aurantii* visibles y aisladas fueron revisadas, y con un asa de siembra estéril se realizó un segundo paso a placas con agar de patata dextrosa y cloranfenicol (0,05 g/ L), dejándolas incubar a 25 °C durante otros 5 días. Las esporas de placas con colonias diferenciadas y sin signos de contaminación fueron resuspendidas con agua de peptona, y 1 mL fue inoculado en medio líquido de patata dextrosa, que fue incubado durante 5 días a temperatura ambiente (20 °C).

El micelio se separó del medio líquido primero por filtración y luego por centrifugación en una centrífuga C30P (B. Braun Biotech International) a 8.000 x g durante 5 minutos a 4 °C, retirando el sobrenadante. El pelet fue liofilizado utilizando un liofilizador Alpha 2-4 (Martin Christ) y almacenado en paquetes con papel Millipore (Merck) a -20 °C.

### c) Identificación morfológica de *Geotrichum citri-aurantii*

A partir de placas sembradas con el hongo *G. citri-aurantii* e incubadas a 25 °C durante 7 días (Figura 3.1A) y con el uso de pinzas y aguja enmangada estériles, se depositó una pequeña fracción del hongo sobre un portaobjetos, al cual se le añadió una gota de azul lactofenol y un cubreobjetos. Con la ayuda de un microscopio binocular (Canon) se examinó su morfología (Figura 3.1B; Figura 3.2) siguiendo las descripciones publicadas por Watanabe (2002).

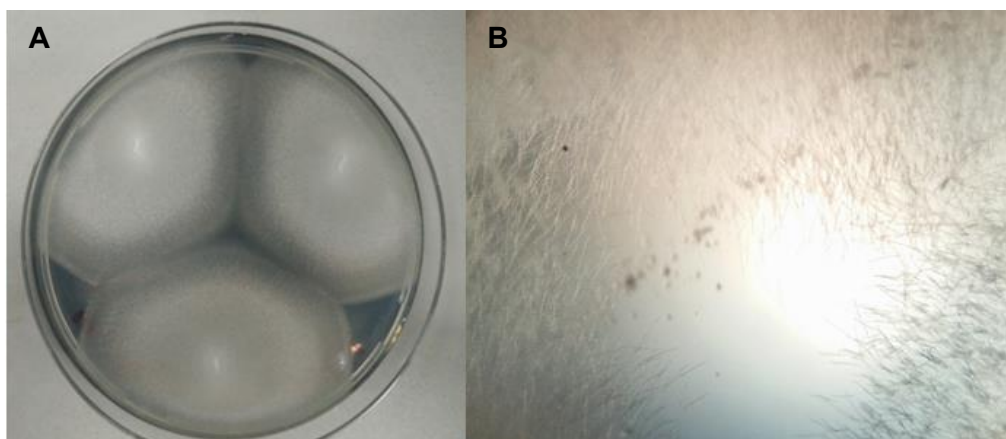


Figura 3.1. A) Crecimiento de *Geotrichum citri-aurantii* en placa con agar patata dextrosa. B) Colonia vista a 10 X. Fuente: Propia.

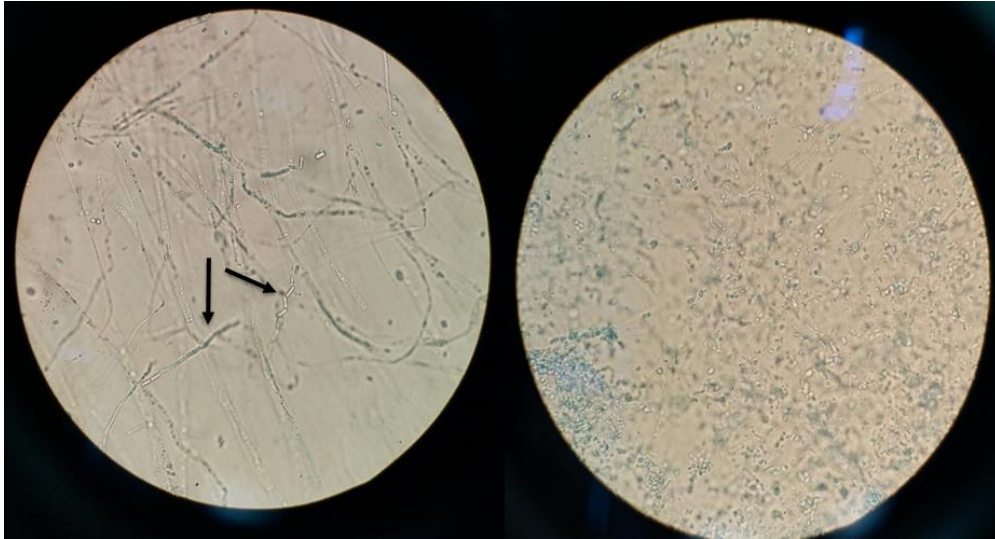


Figura 3.2. Arthrosporas de *Geotrichum citri-aurantii* vistas a través de microscopía óptica y 40 X. Fuente: Propia.

#### **d) Identificación genómica de *Geotrichum citri-aurantii***

Para determinar la especie se utilizan las muestras de micelio previamente liofilizadas, se pesan 30 mg en un mortero con nitrógeno líquido y se machaca hasta que la muestra quede con un aspecto de polvo fino. La extracción se realiza siguiendo las instrucciones proporcionadas en el kit comercial DNeasy Plant Mini (Qiagen), verificando la presencia de ADN con un gel de agarosa al 1 %. La calidad y la concentración de la extracción fueron evaluadas con un NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific).

La PCR se desarrolló siguiendo el protocolo publicado por White y col. (1990) con pequeñas modificaciones. La concentración de la muestra se ajustó a 10 ng/  $\mu$ L con un volumen final por reacción de 24  $\mu$ L. Se utilizaron las regiones relacionadas con los espaciadores internos (ITS), descritos en la Tabla 3.1. La PCR se programó con una desnaturalización inicial de 3 minutos a 95 °C, seguida de 35 ciclos en las condiciones siguientes: 30 s a 95 °C, 30 s a 55 °C, 1 min a 72 °C. Para completar el método se dejaron 10 min a 72 °C, como etapa final de alargamiento. El proceso fue verificado con un gel de agarosa, siendo el rendimiento medio de las reacciones de 50 a 60 ng/  $\mu$ L. Las muestras fueron enviadas a la empresa IpatimUp (Portugal), donde fueron purificadas y secuenciadas. Finalmente, con los programas GENTle (Magnus Manske, Alemania) y Mega X (Pensilvania, EEUU) se obtuvieron las

secuencias que fueron comparadas con las bases de datos proporcionadas por GenBank (NCBI, Bethesda, EEUU).

Tabla 3.1. Marcadores y secuencias de los cebadores utilizados en la PCR para la identificación genética de *Geotrichum citri-aurantii*. Fuente: White y col., 1990.

Marcador	Secuencia del cebador (5'-3')
ITS 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS 5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG

### 3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LOS ENSAYOS *IN VITRO*

#### 3.5.1. Ensayos *in vitro* con Timol y Carvacrol encapsulados en HP- $\beta$ -CDs sobre *Geotrichum citri-aurantii*.

Para evaluar el efecto antifúngico de los aceites esenciales encapsulados sobre el crecimiento y el desarrollo *in vitro* de *Geotrichum citri-aurantii* se realizaron los siguientes ensayos:

##### a) Experimento 1a: Estudio turbidimétrico del efecto de los aceites esenciales encapsulados en microcultivos de *Geotrichum citri-aurantii*.

Se realizaron cuatro ensayos independientes por triplicado con su respectivo tratamiento; Timol-HP- $\beta$ -CDs (S), Timol-HP- $\beta$ -CDs (MO), Carvacrol-HP- $\beta$ -CDs (S), Carvacrol-HP- $\beta$ -CDs (MO), en placas de titulación de 96 pocillos. Los tratamientos fueron disueltos en el medio de cultivo patata dextrosa y las concentraciones utilizadas fueron 0, 2.5, 5, 12, 25 y 50 mM, además se añadió un control sin los monoterpenos encapsulados. En cada uno de los pocillos, menos en el control positivo, se inocularon  $10^5$  unidades formadoras de colonias (UFC) del hongo *G. citri-aurantii*, ajustando la concentración con una Cámara de Neubauer (Marienfeld, Alemania). Como valor cero para realizar las medidas de absorbancia se utilizaron los pocillos que sólo tenían medio de cultivo PD. Antes de realizar cada medida se homogeneizó el cultivo, y los valores de densidad óptica a 600 nm fueron



tomados a tiempo cero, a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h de incubación a 25 °C con un lector Microplate Manager 4.0 (BioRad).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) o concertación fungistática, a la cual se inhibe el crecimiento del microorganismo un 90 %, y la dosis efectiva ( $DE_{50}$ ) que es la concentración de aceites esenciales encapsulados necesaria para reducir el crecimiento del hongo un 50 % fueron calculadas. Para ello, se utilizó un método de regresión lineal entre el crecimiento relativo del hongo a las 48 h y el logaritmo de la concentración de los complejos.

**b) Experimento 1b: Estudio turbidimétrico del efecto de los aceites esenciales encapsulados en macrocultivos de *Geotrichum citri-aurantii*.**

En tubos de ensayo de vidrio de 5 mL se realizó un ensayo turbidimétrico idéntico al desarrollado en el Experimento 1a. Para ello se dispensaron 3 mL de medio PD con los distintos tratamientos por triplicado; PD Timol-HP- $\beta$ -CDs (S), Timol-HP- $\beta$ -CDs (MO), Carvacrol-HP- $\beta$ -CDs (S), Carvacrol-HP- $\beta$ -CDs (MO), a las concentraciones 0, 2.5, 5, 12, 25 y 50 mM. Como valor cero se utilizó un tubo con medio de cultivo PD sin el hongo correspondiente. Antes de realizar cada medida los tubos fueron homogeneizados con la ayuda de un vórtex, tomando una medida de absorbancia inicial (tiempo cero), a las 24 h y a las 48 h a 600 nm, e incubándolos en una estufa a 25 °C.

De cada tubo de vidrio se tomó una alícuota de 1 mL, realizando una dilución seriada en agua de peptona de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-4}$ , y realizando una siembra en placas Petrifilm 3M™ de mohos y levaduras. Cada 24 h se fueron contando las UFCs, y con estos datos se calculó la concentración mínima fungicida (CMF), que representa la concentración más baja a la cual el crecimiento de un hongo disminuye un 99.9 %. Una disminución de 3 logaritmos en la viabilidad de *G. citri-aurantii* mantenido durante 24h y 48 h fue considerado como un indicio de actividad fungicida.

**c) Experimento 2: Estudio del crecimiento de discos de hongos en placas con distintas concentraciones de aceites esenciales encapsulados.**

Para evaluar la inhibición del crecimiento microbiano provocada por la concentración de aceites esenciales encapsulados, se utilizó el método de crecimiento de discos. Para ello se utilizaron placas Petri con PDA con distintas concentraciones de aceites esenciales encapsulados 0, 1.5, 3, 6, 12 y 30 mM, siguiendo el método descrito por Fraternali y col., 2003.

Los discos fueron obtenidos a partir de placas inoculadas con *G. citri-aurantii* e incubadas a 25 °C durante 7 días, produciendo una cantidad significativa de micelio y esporas. Las porciones en forma de disco de 6 mm de diámetro se depositaron en placas PDA a las cuales se les añadieron los diferentes aceites esenciales encapsulados, realizando 5 réplicas para cada tratamiento y concentración. Se incubaron a 25 °C, midiendo el diámetro de crecimiento a partir de las 48 h de incubación cada 24 h, hasta que la placa de Petri está completamente. Con estos datos se calculó la inhibición del crecimiento micelial (ICM).

**3.5.2. Estudio *in vivo* del efecto de Timol encapsulado en HP-β-CDs sobre limones inoculados con *Geotrichum citri-aurantii*.**

**a) Material vegetal**

Los frutos utilizados para las pruebas fueron limones de la variedad 'Fino' clon 49 injertado sobre *Citrus aurantium*, recolectados de una explotación comercial situada en La Murada (38,094873 N, 0,581572 O, Orihuela, España). Los suelos presentan una textura de tipo franco arcilloso, con un 35,5 % de arcilla, un 32,8 % de limo y un 32.6 % de arena, la conductividad eléctrica es de 0,370 dS m<sup>-1</sup> y el pH de 8,76. Además, los campos están situados en una zona con clima mediterráneo, caracterizado por una temperatura media anual de 17,3 °C y unas precipitaciones de 49,3 mm / día. Los frutos fueron seleccionados con un grado de madurez óptimo, sin daños físicos en la piel y homogéneos en tamaño y color, sin recibir tratamientos post-cosecha antes de los ensayos. A continuación, fueron desinfectados con una solución de



hipoclorito sódico al 5 %, se aclararon con agua y se dejaron secar hasta el día siguiente.

#### **b) Experimento: Tratamiento con Timol encapsulado en HP- $\beta$ -CDs en limones inoculados**

Se seleccionaron un total de 180 frutos por tratamiento, y se repartieron en 6 lotes de 30 limones cada uno, todos los limones fueron numerados y pesados individualmente. A todos los frutos se les ocasionó en una de las caras una herida en la piel de 1 cm de ancho con un estilete estéril, sin llegar a la pulpa del fruto. A continuación, en 3 de los lotes se realizó un tratamiento en la zona dañada con Timol encapsulado a las concentraciones 25 mM y 50 mM, también se aplicó el tratamiento comercial con propiconazol a la concentración recomendada por el fabricante y un control con agua. En los otros 3 lotes de cada se inoculó primero una concentración de  $10^6$  UFCs/ mL del hongo *G. citri-aurantii*, en la zona donde dañada. Todos los lotes se dejaron secar a temperatura ambiente hasta el día siguiente en oscuridad. A continuación, en los 3 lotes tratados primero con Timol y propiconazol se inoculó una concentración de  $10^6$  UFCs/ mL de *G. citri-aurantii*, con el objetivo de evaluar el efecto preventivo de estos tratamientos. Al mismo tiempo, en los lotes inoculados previamente con el hongo fitopatógeno se realizaron los tratamientos con Timol encapsulado a las concentraciones 25 mM y 50 mM, el tratamiento comercial con propiconazol a la concentración recomendada por el fabricante, con el objetivo de comprobar el efecto curativo de estos compuestos, el control se trató con agua. Todos los lotes se dejaron en oscuridad a temperatura ambiente, controlando la humedad y evaluando la evolución del daño cada 24 horas.

A los 5, 10 y 15 días de almacenamiento se anotó la incidencia de *G. citri-aurantii*, contando el número de limones podridos respecto del total. Mientras que la severidad fue determinada midiendo el diámetro del daño provocado por el avance del hongo. Al mismo tiempo, en cada etapa del muestreo se tomaron 15 frutos por tratamiento al azar (5 de cada lote), para analizar las pérdidas de peso y la tasa de respiración, como se han descrito previamente en los puntos 3.2.2 y 3.2.1, respectivamente.

A los 10 días del ensayo, también se tomó un trozo de la zona donde se había realizado la herida en la piel del fruto, la muestra fue congelada con N<sub>2</sub> líquido y almacenada a -20 °C para el posterior análisis de fenoles totales (3.2.8) y enzimas antioxidantes (3.2.9).

### **3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral se corresponden con los valores medios de (al menos) 3 repeticiones. Los datos fueron sometidos a análisis de la varianza (ANOVA), y los test aplicados se especifican en cada una de las publicaciones del capítulo 4. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas en  $p < 0,05$ . Siendo todos los análisis realizados con el programa estadístico SPSS en la versión 22.0 para Windows.



---

# CAPÍTULO 4. PUBLICACIONES

---





## CAPÍTULO 4. PUBLICACIONES

---

### 4.1. Pre-harvest methyl jasmonate treatments increase antioxidant systems in lemon fruit without affecting yield or other fruit quality parameters

---

#### Publicación 1 (Transcripción literal)

#### Pre-harvest methyl jasmonate treatments increase antioxidant systems in lemon fruit without affecting yield or other fruit quality parameters

Vicente Serna-Escolano

Juan Miguel Valverde

María E García-Pastor

Daniel Valero

Salvador Castillo

Fabián Guillén

Domingo Martínez-Romero

Pedro Javier Zapata

María Serrano

Journal of the Science of Food and Agriculture, 99 (11), 5035-5043, 2019

<https://doi.org/10.1002/jsfa.9746>

**Pre-harvest methyl jasmonate treatments increase antioxidant systems in lemon fruit without affecting yield or other fruit quality parameters**

<sup>a</sup>Serna-Escolano, V., <sup>a</sup>Valverde, J.M., <sup>a</sup>García-Pastor, M.E., <sup>a</sup>Valero, D.,  
<sup>a</sup>Castillo, S., <sup>a</sup>Guillén, F., <sup>a</sup>Martínez-Romero, D., <sup>a</sup>Zapata, P., <sup>\*b</sup>Serrano, M.

<sup>a</sup> Department of Food Technology, EPSO, University Miguel Hernández, Ctra. Beniel km 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain

<sup>b</sup> Department of Applied Biology, EPSO, University Miguel Hernández, Ctra. Beniel km 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain.

\*Corresponding author. E-mail: [m.serrano@umh.es](mailto:m.serrano@umh.es)



## **ABSTRACT**

**BACKGROUND:** Jasmonic acid (JA) and its volatile derivative methyl jasmonate (MeJA) are hormones involved in regulating many processes in plants, and it has been reported their effect (applied as post- or pre-harvest treatment) on increasing fruit bioactive compounds with antioxidant potential. However, there is no literature regarding the effect of pre-harvest MeJA treatments on lemon fruit antioxidant systems, which was the aim of the present research.

**RESULTS:** MeJA treatments (0.1, 0.5 and 1.0 mM) increased antioxidant compounds, such as phenolics, in juice and flavedo of 'Fino' and 'Verna' lemons at harvest, the most effective concentration being 0.1 mM in both cultivars. In addition, catalase (CAT), peroxidase (POD) and ascorbate peroxidase (APX) activities were also increased by MeJA treatments, the highest increases being also found with 0.1 mM. The increases in APX and CAT were maintained from one treatment to another during fruit development on tree while the increase on POD disappeared after 8-10 d of each treatment. For both antioxidant systems, the highest increases were found in lemon harvested at commercial ripening stage. On the contrary, crop yield, fruit ripening process and quality parameters were not generally affected by MeJA treatments.

**CONCLUSION:** Preharvest MeJA treatment could be a useful tool to increase antioxidant potential and health beneficial effects of lemon fruit consumption, given the relationship between these properties and phenolic content. Moreover, the increased concentration of phenolics and activity of antioxidant enzymes in flavedo of MeJA treated fruit could increase lemon tolerance to chilling injury and decay during postharvest storage.

**Keywords:** phenolics, peroxidase, catalase, ascorbate peroxidase, quality, yield

## 1. INTRODUCTION

Lemon fruit (*Citrus limon* (L.) Burm. f) is the third most important *Citrus* species after orange and mandarin worldwide. This plant species is cultivated in several countries all over the world and Spain is the seventh lemon producing country in the world, with 923,192 t in 2017, ca. 90% of them being produced in Murcia and Alicante provinces.<sup>1</sup> The most widespread cultivars are the autochthonous 'Fino' and 'Verna', which are harvested on autumn-winter and spring-summer, respectively. Lemon tart flavour is very appreciated by consumers and it is used worldwide as fresh fruit, as well as in beverages, ice creams, desserts, salads, and many meat and vegetable dishes. In addition, lemon fruit is rich in phenolics (mainly flavonoids) and other nutrients and non-nutrients compounds (vitamins, minerals, dietary fibre, essential oils and carotenoids) having antioxidant potential and health beneficial effects. In fact, there is evidence that lemon fruit has antimicrobial and anti-inflammatory properties and that reduces obesity, diabetes, blood lipid and the risk of cardiovascular disorders and certain types of cancer.<sup>2,3,4</sup> Thus, treatments focused on increasing these bioactive compounds would be of great social interest.

Jasmonic acid (JA) and its volatile derivative methyl jasmonate (MeJA) are plant hormones involved in regulating many processes in plants, although the most studies ones have been their role as elicitors triggering the plant defence responses against herbivores and pathogens.<sup>5,6,7</sup> These plant defence responses are mainly the activation of secondary metabolic pathways leading to accumulation of defence compounds, such as terpenoids, alkaloids, and phenolics.<sup>8,9,10</sup> In addition, MeJA applied as post- or pre-harvest treatment has been proved to have positive effects on increasing fruit bioactive compounds with antioxidant potential and health beneficial effects.<sup>7</sup> Thus, MeJA treatment during on-plant fruit development increased phenolics and anthocyanins, in plums,<sup>11</sup> sweet cherry,<sup>12</sup> black currants,<sup>13</sup> raspberries,<sup>14</sup> apples,<sup>15</sup> grapewine<sup>16</sup> and globe artichoke,<sup>17</sup> due to enhanced phenylalanine ammonialyase (PAL) activity and leading to improve quality and health properties of fresh fruit and vegetable consumption.<sup>18</sup> Specifically, in lemon fruit, just in a recent paper has been reported the effect of postharvest MeJA



treatment on increasing phenolic content in flavedo, which was related to increased chilling injury tolerance during cold storage.<sup>19</sup>

On the other hand, postharvest MeJA treatments have been also effective on increasing activity of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) and ascorbate peroxidase (APX) in loquat,<sup>20</sup> peach,<sup>21</sup> raspberry,<sup>22</sup> eggplants<sup>23</sup> and tomato,<sup>24</sup> as well as pre-harvest treatments in plum.<sup>25</sup> These antioxidant enzymes are involved in scavenging reactive oxygen species (ROS) responsible for oxidative stress, which causes alteration of membrane integrity and oxidation of membrane lipids and has been associated with fruit ripening,<sup>26</sup> chilling injury<sup>20,21</sup> and pathogen attack.<sup>22,24</sup> Thus, increased activity of the antioxidant enzymes, together with higher levels of antioxidant compounds, by MeJA treatments, would lead to a delay in the postharvest ripening process of lemon fruit and to increased tolerance to chilling injury and pathogen attack, leading to maintenance of fruit quality. Moreover, taking into account that MeJA is already classified by the United States Food and Drug Administration (FDA) as “generally recognized as safe” (GRAS) substance,<sup>27</sup> it has potential for commercial purposes.

Thus, the aim of the present research was to evaluate the effect of MeJA treatments on antioxidant systems, in flavedo and juice of ‘Fino’ and ‘Verna’ lemon fruit as well as on fruit ripening and quality parameters at harvest and crop yield. In addition, a more detailed study was performed with ‘Fino’ lemon by evaluating phenolic concentration and antioxidant enzyme activities during fruit development on tree, from the first MeJA treatment until harvest.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1. Field conditions and experiment design**

The experiments were conducted on commercial fields located in Cartagena (Murcia, Spain) during 2016, 2017 and 2018, by using two lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.f) cultivars, ‘Fino’ grafted on *C. macrophylla* rootstocks and ‘Verna’ grafted on sour orange (*C. aurantium* L.) rootstock. The soils were aridisol type, with 43.1 % clay, 24.3 % loam and 32.6 % sand, an EC of 0.313 dS m<sup>-1</sup> and pH 8.16. Trees were planted at 4x5 m, the ‘Fino’ trees being 15 and 7 years old in 2016 and 2017 experiments, respectively, and the ‘Verna’ ones 6 years old in 2018 experiments. The experiments were performed totally at

random by using four blocks of five trees for each treatment. 'Fino' trees were treated six times (at 20 day-intervals, except T5 and T6 which were separated by 7 d, T6 being performed 2 d before harvest) with 0.1, 0.5 and 1.0 mM MeJA concentrations in 2016 experiment and with 0.1 mM MeJA concentration in 2017. 'Verna' cultivar was treated four times (at 30 day-intervals, the last one 2 d before harvest) with 0.1 and 1.0 mM MeJA in 2018 experiment, since its development period is lower than the 'Fino' one. In all cases 5 L of MeJA (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) freshly prepared solutions and containing 0.5% Tween 20 as surfactant were sprayed on the tree canopy by using a mechanical mist sprayer. Treatments were performed early in the morning and during favourable weather conditions where rainfall or winds were not forecasted for the following 24 h. Control trees were sprayed with 0.5% Tween 20 aqueous solution. 'Fino' lemon fruit were harvested at 28<sup>th</sup> December 2016 and 13<sup>th</sup> December 2017 and 'Verna' lemons at 2<sup>nd</sup> May 2018 and total yield (kg tree<sup>-1</sup>) and number of fruit per tree were measured and then, fruit mass was calculated. After that, two lemon fruit were taken from each tree and colour and firmness were measured independently in each of them. Then, six longitudinal 1-cm strips of the ten lemons of each block were taken, ground under liquid N<sub>2</sub> and stored at -80 °C until phenolics and the activity of the antioxidant enzymes were measured. The juice of the ten lemons was also obtained and combined and used to measure titratable acidity (TA).

## **2.2. Firmness, colour and titratable acidity measurements**

Colour was measured at three points of the fruit equatorial perimeter by using a Minolta colorimeter (CRC200, Minolta Camera Co., Japan) and expressed as L\*, a\* and b\* parameters. Firmness was determined by using a TX-XT2i Texture Analyzer (Stable Microsystems, Godalming, UK) coupled to a flat steel plate which applied a force causing a 5% deformation of the fruit diameter and expressed as N mm<sup>-1</sup>. Titratable acidity was determined in each sample by titration of 0.1 mL of juice diluted with 25 mL of distilled water with 0.1 N NaOH up to pH 8.1 by using an automatic titrator (785 DMP Titrino, Metrohm), and results were expressed as g of citric acid equivalent kg<sup>-1</sup> fresh weight.

### 2.3. Total phenolic quantification

Total phenolics in flavedo tissue were extracted by homogenising 2 g of samples with 15 mL of water:methanol (2:8) containing 2 mM NaF to inactivate polyphenol oxidase activity. The homogenate was centrifuged at 15,000 *g* at 4 °C for 15 min and total phenolics were quantified in duplicate in the supernatant by using the Folin-Ciocalteu's reagent as previously described.<sup>28</sup> Total phenolics in juice were measured in the same way by using 25 µL of juice. Results were expressed as g gallic acid equivalent kg<sup>-1</sup> fresh weight by using a relative calibration procedure with gallic acid (purchased from Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) at 5-20 µg in the reaction medium, which showed linearity with the absorbance at 760 nm ( $y = 0.0208 x + 0.0045$ ;  $R^2 = 0.996$ ).

### 2.4. Activity of the antioxidant enzymes

Crude extracts to measure POD, CAT and APX enzymes in lemon flavedo were performed by homogenizing 2 g of tissue with 10 mL of phosphate buffer 50 mM, pH=6.8 containing 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone and 1.0 mM ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA). Then, the extracts were centrifuged at 15000 *x g* for 30 min at 4°C and the supernatant was used for antioxidant enzyme assays as previously reported.<sup>25</sup> Briefly, for APX quantification the reaction mixture contained 100 µL of extract in 3 mL of 50 mM potassium phosphate pH=7.0, 0.5 mM ascorbic acid and 1.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The decrease of absorbance at 290 nm from time 0 to 60 s was measured and APX activity was expressed as units of enzymatic activity by min and g (U min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>), being one enzymatic unit (U) defined as 0.01 decrease of ascorbate per minute. For POD activity the reaction mixture contained 200 µL of extract in a final volume of 3 mL of 50 mM phosphate buffer pH=7.0, 12 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 7 mM guaiacol. The increase of absorbance at 470 nm during 1 min was measured and POD activity was expressed as U min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> (U was defined as 0.01 absorbance increase per minute). Finally, for CAT, 100 µL of extract were added to 3 mL of reaction mixture containing 15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 50 mM phosphate buffer pH=7.0. The decrease of absorbance at 240 nm during 1 min was measured and CAT activity expressed as U min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> (U was defined as 0.01 absorbance decrease per minute).

## 2.5. Statistical analysis

For all experiments, data were subjected to ANOVA analysis by using the SPSS software package v. 22.0 for Windows (SPSS, 2011). Sources of variation were treatments for data shown in Tables 1-5 and treatments and sampling date for data in Figures 1-4. The overall least significant differences (Fisher's LSD procedure,  $P < 0.05$ ) were calculated and used to detect significant differences among treatments.

## 3. RESULTS

### 3.1. Antioxidant systems, yield and quality in 'Fino' lemon at harvest (2016 experiment)

In 2016 experiment, total phenolic content was quantified in flavedo and juice of 'Fino' lemon from control and MeJA treated trees at harvest and values were  $2.11 \pm 0.05$  and  $0.64 \pm 0.03$  g kg<sup>-1</sup>, respectively, in controls. However, in fruit from MeJA treated trees, phenolic concentration was significantly higher than in controls, the highest increases being found for 0.1 and 0.5 mM doses in both, flavedo (65 and 48%, respectively) and juice (39 for 0.1 and 0.5 mM doses) (Table 1). Similarly, MeJA treatments increased significantly the activity of the antioxidant enzymes APX and POD in flavedo, without significant differences among MeJA concentrations. CAT activity was also increased significantly for 0.1 and 0.5 mM doses (Table 1).

**Table 1.** Total phenolics (g kg<sup>-1</sup>) and activity of the antioxidant enzymes, ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) and peroxidase, in 'Fino' lemon from control and methyl jasmonate (MeJA)-treated trees. Data at harvest in 2016 experiment.

Treatment	Total phenolics		Enzyme activity (U min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> ) in flavedo		
	Flavedo	Juice	APX	CAT	POD
Control	$2.11 \pm 0.05^d$	$0.64 \pm 0.03^c$	$1163 \pm 27^b$	$814 \pm 83^b$	$11517 \pm 726^b$
MeJA 0.1 mM	$3.48 \pm 0.01^a$	$0.89 \pm 0.01^a$	$1602 \pm 50^a$	$1585 \pm 141^a$	$14723 \pm 839^a$
MeJA 0.5 mM	$3.12 \pm 0.04^b$	$0.89 \pm 0.02^a$	$1515 \pm 104^a$	$1379 \pm 85^a$	$14890 \pm 749^a$
MeJA 1.0 mM	$2.63 \pm 0.03^c$	$0.81 \pm 0.02^b$	$1357 \pm 99^a$	$802 \pm 119^b$	$15405 \pm 691^a$

Data are the mean  $\pm$  SD of four replicates. Different letters in the same column show significant differences ( $P < 0.05$ ) among treatments.

Total yield in 'Fino' lemon was around 140 kg tree<sup>-1</sup>, with a number of fruit per tree between 1320 and 1380 and a fruit mass of 99.68-106.85 g in control and MeJA treated trees, in 2016 experiment, without significant differences attributed to MeJA treatments (Table 2). Similarly, 'Fino' lemon quality parameters, such as firmness and titratable acidity (TA) at harvest were not significantly affected by MeJA treatments, except firmness for 0.1 mM treatment and total acidity for 1.0 mM concentration, in which values were significantly higher than in controls. In addition, no significant effects were observed in L\* or b\* colour parameters between control and treated fruit, independently of the applied concentration (data not shown). Colour a\* parameter ranged from 2.21 to 2.77 in fruit from control and treated trees (Table 2), showing that all of them had a similar light-yellow colour. Thus, all the applied MeJA doses had effects on increasing antioxidant systems in 'Fino' lemon at harvest, without affecting crop yield, ripening process or fruit quality properties, although for most of these parameters the highest effect was found for 0.1 mM MeJA dose, which was chosen for the following experiment (year 2017).

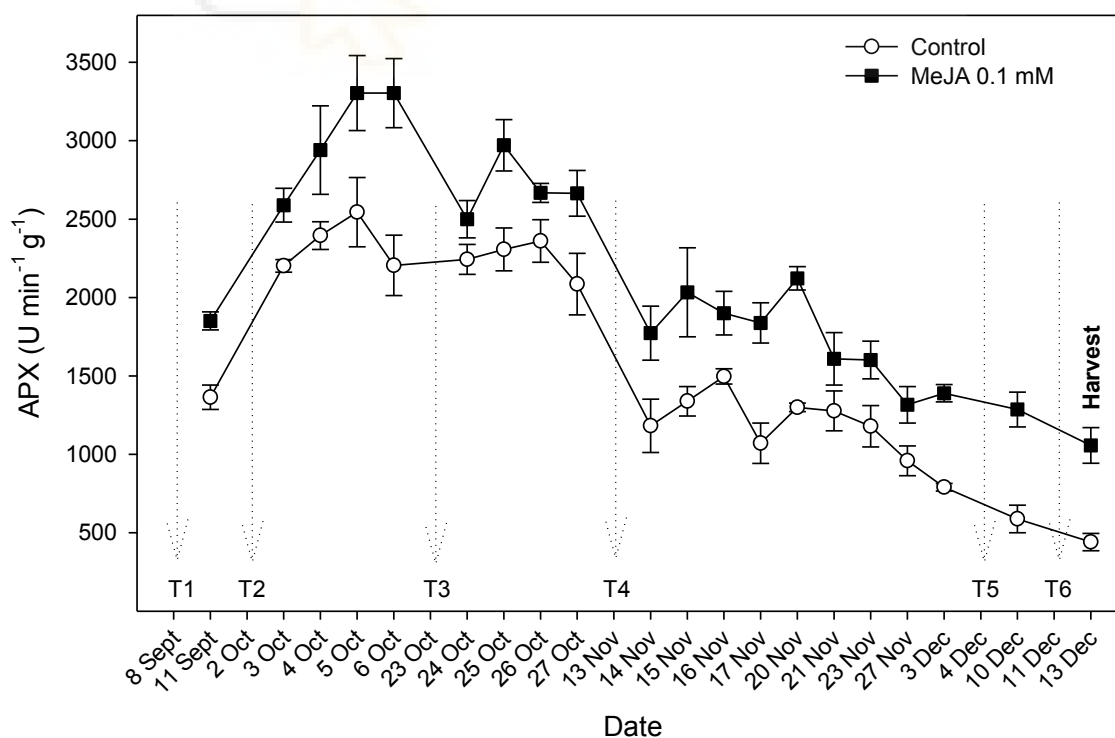
**Table 2.** Effect of methyl jasmonate (MeJA) treatments on yield (kg tree<sup>-1</sup>), number of fruit per tree (fruit tree<sup>-1</sup>), fruit mass (g), firmness (N mm<sup>-1</sup>), colour a\*, and titratable acidity (g kg<sup>-1</sup>) in 'Fino' lemon at harvest in 2016 experiment.

Treatment	Yield (kg tree <sup>-1</sup> )	Fruit tree <sup>-1</sup>	Fruit mass (g)
Control	140.76 $\pm$ 8.46 <sup>a</sup>	1381 $\pm$ 63 <sup>a</sup>	101.82 $\pm$ 1.49 <sup>a</sup>
MeJA 0.1 mM	142.70 $\pm$ 2.48 <sup>a</sup>	1352 $\pm$ 105 <sup>a</sup>	106.31 $\pm$ 6.19 <sup>a</sup>
MeJA 0.5 mM	138.15 $\pm$ 13.47 <sup>a</sup>	1381 $\pm$ 72 <sup>a</sup>	99.68 $\pm$ 4.57 <sup>a</sup>
MeJA 1.0 mM	141.34 $\pm$ 9.29 <sup>a</sup>	1321 $\pm$ 56 <sup>a</sup>	106.85 $\pm$ 3.73 <sup>a</sup>
Treatment	Firmness	Colour a*	Titratable acidity
Control	9.09 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	2.77 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	69.3 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>
MeJA 0.1 mM	10.26 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	2.21 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	70.2 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>
MeJA 0.5 mM	10.06 $\pm$ 0.37 <sup>ab</sup>	2.37 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	72.9 $\pm$ 1.9 <sup>ab</sup>
MeJA 1.0 mM	10.09 $\pm$ 0.25 <sup>ab</sup>	2.50 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	74.7 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>

Data are the mean  $\pm$  SD. Different letters in the same column show significant differences ( $P < 0.05$ ) among treatments.

### 3.2. Phenolic content and antioxidant enzymes during fruit development (2017 experiment)

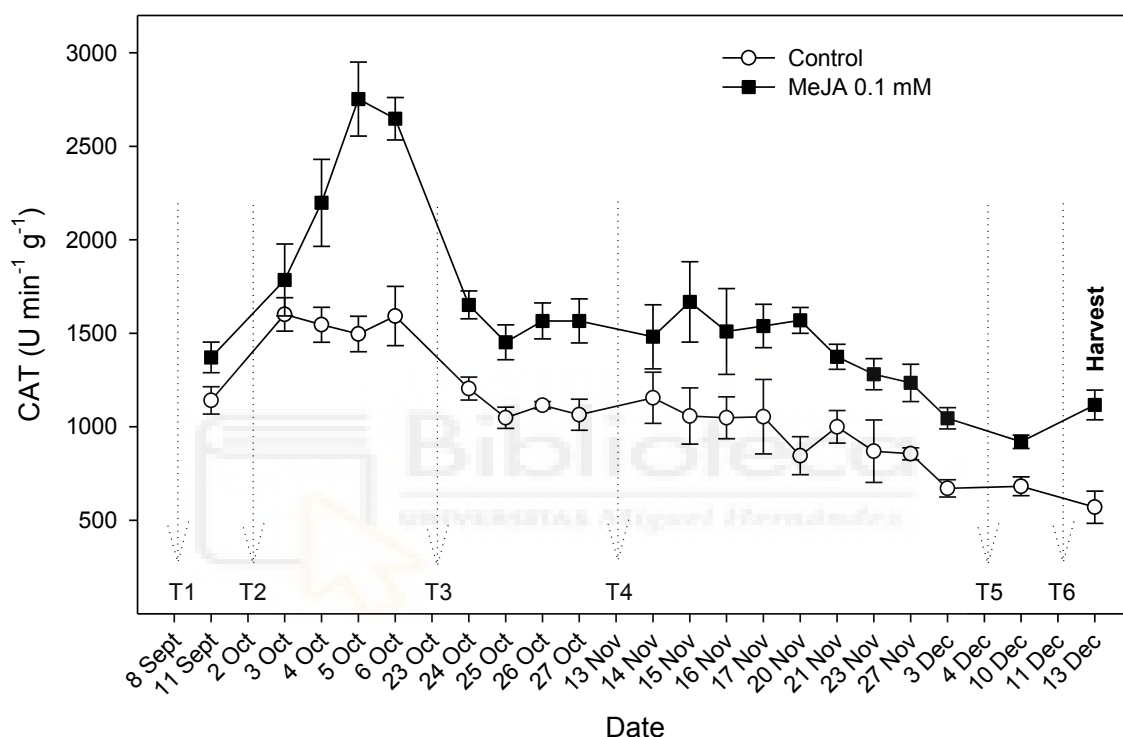
A more detailed study was performed in 'Fino' lemons in 2017 experiment by measuring the activity of the antioxidant enzymes in fruit flavedo and the phenolic content in flavedo and juice several days after each 0.1 mM MeJA treatment. APX activity changed during fruit development on tree, following similar patterns in control and MeJA treated fruit. That is, it increased from the beginning of the experiments until 5-6 October, and then decreased until harvest on 13 December although it was significantly higher in treated than in control fruit, in all the analysed samples (Fig. 1). This effect of MeJA treatment on increasing APX activity was evident after the first treatment, and was noticeable from one treatment to another, with mean increases of 36 % taking into account all sampling data. The highest differences between control and treated fruit were found after T5 and T6 treatments, 2.2 and 2.4-fold increases, respectively.



**Figure 1.** Ascorbate peroxidase activity (APX) on flavedo of 'Fino' lemon during fruit growth and ripening on tree in 2017 experiment. T1-T6 show the date of

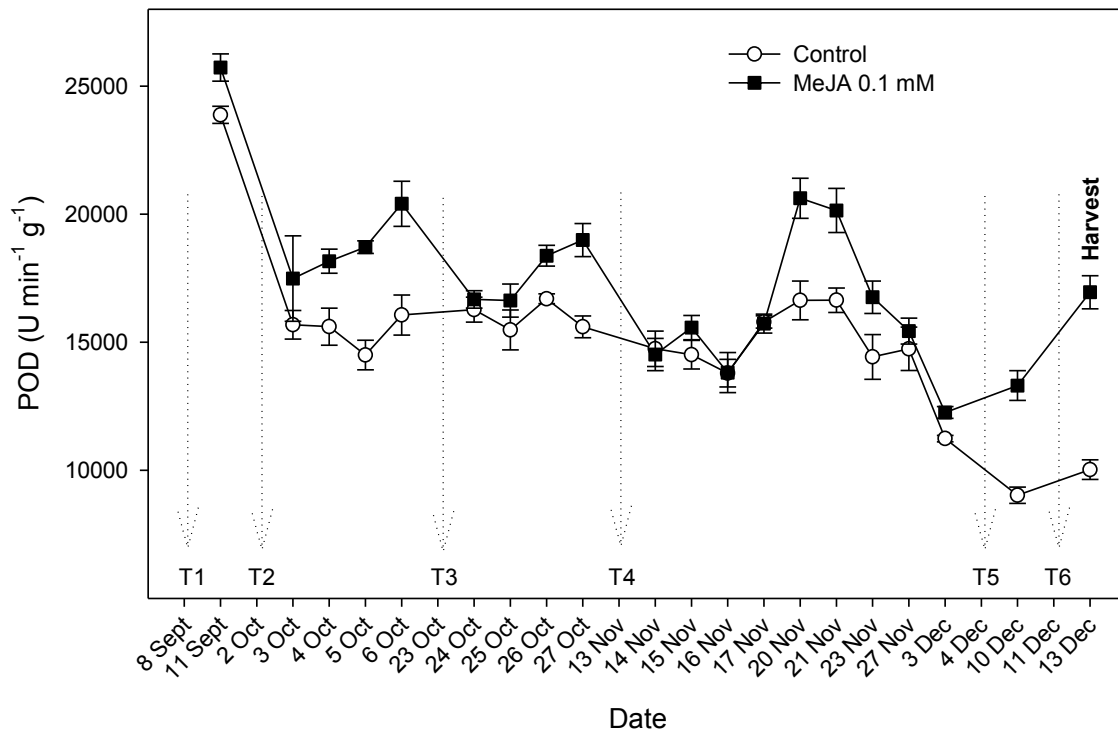
methyl jasmonate (MeJA) 0.1 mM treatments. Data are the mean  $\pm$  SD of four replicates.

CAT activity evolved in a similar way to APX activity during lemon development and was also higher in MeJA treated lemons than in controls (Fig. 2). For this antioxidant enzyme a mean of 1.5-fold increase was obtained in the flavedo of treated fruit with respect to control and the highest differences (2-fold increase) were found 3 d after T2 and T6.



**Figure 2.** Catalase activity (CAT) on flavedo of ‘Fino’ lemon during fruit growth and ripening on tree in 2017 experiment. T1-T6 show the date of methyl jasmonate (MeJA) 0.1 mM treatments. Data are the mean  $\pm$  SD of four replicates.

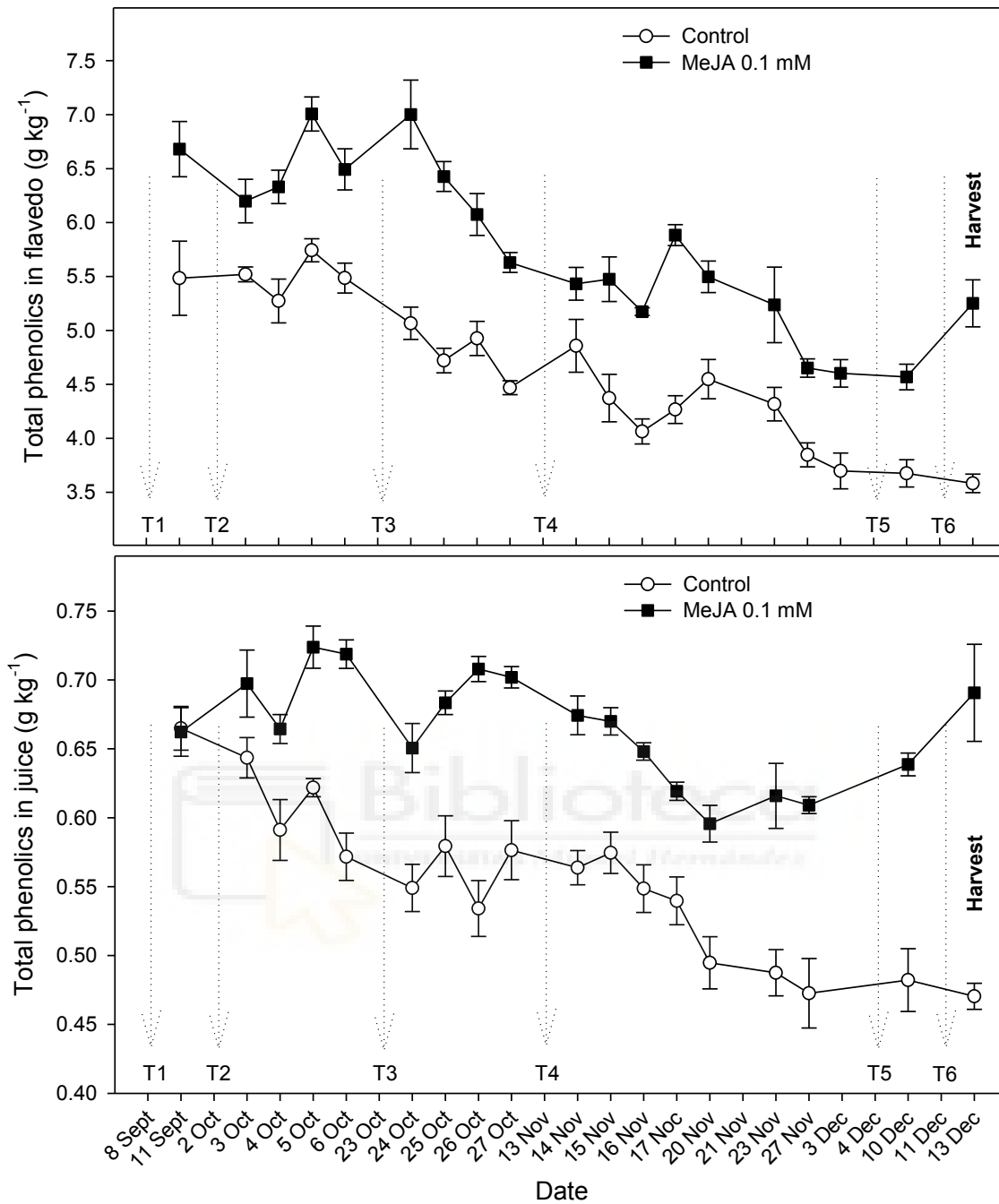
Finally, POD activity evolved in a different way to the previous ones, showing a decrease during the month of September, remaining without significant changes during October and November and decreasing after that until harvest. The application of MeJA treatments also increased POD activity, although in this case the effect was evident after 3 d of every treatment and tended to disappear after 7 d (Fig. 3).



**Figure 3.** Peroxidase activity (POD) on flavedo of ‘Fino’ lemon during fruit growth and ripening on tree in 2017 experiment. T1-T6 show the date of methyl jasmonate (MeJA) 0.1 mM treatments. Data are the mean  $\pm$  SD of four replicates.

Total phenolic content in fruit flavedo and juice decreased in control fruit during development on tree, from  $5.48 \pm 0.34$  to  $3.58 \pm 0.08$  and from  $0.66 \pm 0.02$  to  $0.47 \pm 0.01$  g kg<sup>-1</sup>, respectively (Fig. 4). However, in MeJA treated fruit total phenolic concentration was significantly higher in both, flavedo and juice, these effects being maintained from one treatment until the next one. Taking into account all sampling dates, 25 and 21 % of increases in phenolic concentration were found in flavedo and juice, respectively, and the highest increases, more than 45 %, were obtained at harvest in both of them.





**Figure 4.** Total phenolic content in flavedo and juice of ‘Fino’ lemon during fruit growth and ripening on tree in 2017 experiment. T1-T6 show the date of methyl jasmonate (MeJA) 0.1 mM treatments. Data are the mean  $\pm$  SD of four replicates.

According to the results obtained in 2016 experiment, no significant effects on crop yield, number of fruit per tree or fruit mass were observed in ‘Fino’ lemons in 2017 experiment attribute to MeJA treatments (Table 3). However, total yield and number of fruit per tree were lower and fruit mass was higher

than in 2016 experiment (Tables 2 and 3), due to the younger trees used in 2017 with respect to those of 2016. Quality parameters, such as firmness, colour and TA were also similar in fruit from control and treated fruit (data not shown), as previously observed in 2016 experiment.

**Table 3.** Effect of methyl jasmonate (MeJA) treatments on yield ( $\text{kg tree}^{-1}$ ), number of fruit per tree ( $\text{fruit tree}^{-1}$ ), fruit mass (g), firmness ( $\text{N mm}^{-1}$ ), colour  $a^*$ , and titratable acidity ( $\text{g kg}^{-1}$ ) in 'Fino' lemon at harvest in 2017 experiment.

	Yield ( $\text{kg tree}^{-1}$ )	Fruit tree <sup>-1</sup>	Fruit mass (g)
Control	113.65 $\pm$ 4.99 <sup>a</sup>	862 $\pm$ 35 <sup>a</sup>	132.13 $\pm$ 3.01 <sup>a</sup>
MeJA 0.1 mM	108.77 $\pm$ 4.96 <sup>a</sup>	834 $\pm$ 36 <sup>a</sup>	130.53 $\pm$ 2.64 <sup>a</sup>
	Firmness	Colour $a^*$	Titratable acidity
Control	9.65 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	-3.29 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	70.2 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>
MeJA 0.1 mM	9.87 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	-4.32 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	68.7 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>

Data are the mean  $\pm$  SD. Different letters in the same column show significant differences ( $P < 0.05$ ) among treatments.

### 3.3. Effect of MeJA treatment on 'Verna' cultivar (2018 experiment)

In 2018 experiment, MeJA treatments were performed in lemon trees of 'Verna' cultivar by using 0.1 and 1.0 mM MeJA concentrations, in order to find out if the effect of MeJA treatments could be confirmed in other lemon cultivars. Results showed that both MeJA doses also increased phenolic content in albedo and 0.1 mM in juice. In addition, the activity of the antioxidant enzymes were enhanced by MeJA treatments in this lemon cultivar, and in most cases the highest effects were found with 0.1 mM concentration (Table 4). It is worth noting that phenolic concentration in flavedo was higher in 'Verna' than in 'Fino' lemons while the contrary occurred in juice phenolic concentration (Tables 1 and 4). Moreover, differences were observed between both cultivars on the activity of the antioxidant enzymes since APX activity was higher in 'Verna' and CAT in 'Fino' while values of POD activity were in the same range in both cultivars. Nevertheless, in spite of these differences, the effects of MeJA treatments on increasing phenolic content and antioxidant enzyme activities were similar in both cultivars, 'Fino' and 'Verna' and in both years, 2016 and

2017 for 'Fino' cultivar. In general, the highest increments were found with 0.1 mM MeJA concentration.

**Table 4.** Total phenolics (g kg<sup>-1</sup>) and activity of the antioxidant enzymes, ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) and peroxidase, in 'Verna' lemon from control and methyl jasmonate (MeJA)-treated trees. Data at harvest in 2018 experiment.

Treatment	Total phenolics		Enzyme activity (U min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> ) in albedo		
	Flavedo	Juice	APX	CAT	POD
Control	3.12 ± 0.06 <sup>c</sup>	0.51 ± 0.02 <sup>b</sup>	2994 ± 75 <sup>c</sup>	383 ± 18 <sup>c</sup>	10430 ± 155 <sup>c</sup>
MeJA 0.1 mM	4.25 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.02 <sup>a</sup>	3426 ± 89 <sup>a</sup>	798 ± 41 <sup>a</sup>	12643 ± 225 <sup>b</sup>
MeJA 1.0 mM	3.54 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.52 ± 0.02 <sup>b</sup>	3204 ± 48 <sup>b</sup>	571 ± 22 <sup>b</sup>	17250 ± 304 <sup>a</sup>

Data are the mean ± SD of four replicates. Different letters in the same column show significant differences among treatments.

With respect to crop yield and fruit quality parameters, results on 'Verna' lemon were similar to those obtained in 'Fino' cultivar, that is, these parameters were not generally affected by MeJA treatments, except fruit firmness in lemon from 0.1 mM MeJA treated trees, which was significantly higher than in controls (Table 5).

**Table 5.** Effect of methyl jasmonate (MeJA) treatments on yield (kg tree<sup>-1</sup>), number of fruit per tree (fruit tree<sup>-1</sup>), fruit mass (g), firmness (N mm<sup>-1</sup>), colour a\*, and titratable acidity (g kg<sup>-1</sup>) in 'Verna' lemon at harvest in 2018 experiment.

	Yield (kg tree <sup>-1</sup> )	Fruit tree <sup>-1</sup>	Fruit mass (g)
	Control	40.95 ± 4.96 <sup>a</sup>	385 ± 25 <sup>a</sup>
MeJA 0.1 mM	46.43 ± 3.52 <sup>a</sup>	416 ± 27 <sup>a</sup>	111.49 ± 3.34 <sup>a</sup>
MeJA 1.0 mM	41.26 ± 3.76 <sup>a</sup>	356 ± 31 <sup>a</sup>	116.69 ± 3.88 <sup>a</sup>
	Firmness	Colour a*	Titratable acidity
Control	9.49 ± 0.29 <sup>b</sup>	4.35 ± 0.64 <sup>a</sup>	68.1 ± 1.9 <sup>a</sup>
MeJA 0.1 mM	10.53 ± 0.30 <sup>a</sup>	3.30 ± 0.41 <sup>a</sup>	70.6 ± 1.8 <sup>a</sup>
MeJA 1.0 mM	9.33 ± 0.28 <sup>b</sup>	3.84 ± 0.67 <sup>a</sup>	71.7 ± 1.5 <sup>a</sup>

Data are the mean  $\pm$  SD of four replicates. Different letters in the same column show significant differences among treatments.

#### 4. DISCUSSION

Lemon fruit is rich in antioxidant compounds with health beneficial effects, one of the most important group being phenolic compounds, although their profile and concentration depends on growing environmental conditions, cultivar and fruit part.<sup>19,29,30</sup> The present results show that phenolic concentration was higher in flavedo than in juice, in both cultivars 'Fino' and 'Verna', although phenolic concentration in juice was higher in 'Fino' than in 'Verna' cultivar, while in flavedo the highest phenolic content was found in 'Verna'. However, in both cultivars, MeJA treatments increased significantly total phenolic concentration, in flavedo and juice, and the most effective dose was 0.1 mM with increases of 65 and 39 %, respectively in 'Fino' and 36 and 10%, respectively, in 'Verna' (Tables 1 and 4). Similar results have been reported in previous papers, although the most effective MeJA dose on increasing phenolic content was dependent on fruit species and cultivars. Thus, 0.5 mM MeJA was the most effective concentration in increasing total and individual phenolic concentration in 'Royal Rosa' and 'Black Splendor' plum,<sup>25</sup> 1.0 mM in 'Fortune' plums,<sup>31</sup> 10 mM in wine grapes cultivars,<sup>16</sup> 0.1 mM in table grape cultivars<sup>32</sup>, 0.2 mM in black currant,<sup>13</sup> and 0.1 mM in raspberries.<sup>14</sup> In addition, it has been reported that the increased phenolic concentration due to pre-harvest MeJA treatments was maintained during storage in plum,<sup>25</sup> mango<sup>33</sup> and strawberry<sup>34</sup> fruits. These effects were attributed to a stimulation of PAL activity, the key enzyme in the phenolic biosynthesis pathway.

In lemon fruit, flavonoids account for 90% of total phenolics and within flavanones, hesperidin and eriocitrin are the most important ones in juice and neoeriocitrin, neohesperidin and naringin in peel, while rutin and myricetin are the main flavonols in juice and kampferol in both, peel and juice, although different concentrations have been reported depending on cultivar.<sup>2,30</sup> These phenolic compounds, together with ascorbic acid,<sup>35</sup> are the main responsible for the antioxidant properties attributed to lemon fruit, which not only depend on the concentration of each individual compound but also on the interaction among them.<sup>4,30</sup> Thus, the effect of MeJA treatments on increasing phenolic

concentration in juice and flavedo of lemon fruit would lead to enhance their antioxidant potential and health-beneficial effects.<sup>18</sup> In fact, MeJA treatment of blackberry plants increased the effect of fruit extracts on inhibiting cancer cell proliferation and inducing apoptosis on human lung cancer cells,<sup>36</sup> which was correlated with increased phenolic concentration. In lemon fruit, just in a previous paper has been reported the effect of postharvest 10  $\mu$ M MeJA treatment on increasing phenolic concentration in flavedo during storage due to an increase in PAL activity. This response was different depending on storage temperature and the environmental conditions of farm location and related to fruit tolerance to chilling injury.<sup>19</sup>

Apart from the effect of MeJA on the above commented antioxidant compounds, its role on the activity of antioxidant enzymes has been studied recently. Thus, preharvest MeJA treatments of plum trees increased POD, CAT, and APX activities at harvest in 'Black Splendor' and 'Royal Rosa' plums, which were maintained at higher levels also during cold storage, leading to a delay in the postharvest ripening process.<sup>25</sup> Accordingly, postharvest MeJA treatment delayed the ripening process of eggplant which was attributed to the increased activity of POD and CAT antioxidant enzymes and the expression of their codifying genes.<sup>23</sup> On the other hand, postharvest MeJA treatment increased SOD, CAT, and APX activities during storage in peach and loquat fruits with respect to controls, and this effect was related to an enhanced tolerance to CI damage.<sup>20,21</sup> Moreover, the increased activity of antioxidant enzymes induced by preharvest MeJA treatment in raspberry was related to an increase of the fruit resistance to decay.<sup>22</sup> This is the first report in which the effect of MeJA treatment on antioxidant enzyme activities has been analysed through the on-tree fruit growth and ripening, and results show that lemon tree MeJA treatment increased POD, CAT and APX activities in flavedo in 'Fino' and 'Verna' lemon cultivars and in the three years of study (Tables 1 and 4, Fig. 1-3) and in general, the highest effects were obtained with 0.1 mM concentration. However, the increase was different depending on the antioxidant enzyme. Thus, for APX activity the differences between control and treated fruit were almost constant from T1 to harvest (Fig. 1). For CAT activity the highest increase was found 3-4 d after the second treatment (T2), and from T3 until harvest the same differences between control and treated fruit were observed (Fig. 2). For these

two enzymatic activities the effect of MeJA treatment was maintained from one treatment to another. However, for POD activity increases were observed after 4-6 d of each treatment, but after that the activity decreased to control levels (Fig. 3). Thus, the stimulation of these antioxidant enzymes by repeated MeJA treatments seems to be non-accumulative. On the contrary, the effect of MeJA treatments on increasing phenolic concentration in juice seems to be more accumulative since the highest differences between control and treated fruit were observed after T4, T5 and T6 treatments (Fig. 4). For phenolic content in flavedo these accumulative effect was just observed after T5 and T6 treatments, which were applied one week apart (Fig. 4).

On the other hand, MeJA treatments did not affect yield, number of fruit harvested per tree or fruit mass neither in 'Fino' lemon (Tables 2 and 3) or in 'Verna' lemon (Table 5). With respect to the fruit ripening process, results show that no effect was obtained with any of the MeJA concentrations since fruit from control and treated trees of each cultivar and year were harvested at the same date and colour  $a^*$  parameter was similar in control and treated fruit for both lemon cultivars (Tables 2, 3 and 5). In general, no significant effects were observed in total soluble solid content (data not shown), TA or fruit firmness (Tables 2, 3 and 5) due to MeJA treatments, and these values were in the range of those previously published for these lemon cultivars.<sup>35,37,38,39,40</sup>

## 5. CONCLUSIONS

The present results show that MeJA preharvest treatments increased antioxidant systems, both enzymatic and non-enzymatic ones, in lemon fruit without affecting fruit quality, ripening or crop yield. These results were confirmed in two lemon cultivars, 'Fino' and 'Verna' and in two years in 'Fino' cultivar. Given the relationship between phenolic concentration in fruit and their health beneficial effects, MeJA treatment could be a useful tool to increase lemon fruit antioxidant properties and their beneficial effects for consumers. On the other hand, MeJA treatment increased the activity of CAT, APX and POD in flavedo tissue. Taking into account the role of antioxidant enzymes in scavenging oxygen free radicals involved on senescence, chilling injury and decay processes, an increase in these activities would confer more tolerance to

these stresses to lemon fruit, leading to increase storage possibilities, which deserves further research.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work has been funded by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through Project AGL2015-63986R and European Commission with FEDER funds. The authors thank to University Miguel Hernández for PhD-scholarship of M.E. García-Pastor.



## REFERENCES

- 1 Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Gobierno de España. <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/>. Accessed 5 April 2019.
- 2 González-Molina E, Domínguez-Perles R, Moreno DA, García-Viguera C, Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. *J Pharm Biomed Anal* **51**: 327-345 (2010).
- 3 Gamboa-Gómez CI, Rocha-Guzmán NE, Moreno-Jiménez MR, Vázquez-Cabral BD, González-Laredo RF, Plants with potential use on obesity and its complications. *EXCLI J* **14**: 809-831 (2015).
- 4 Oboh G, Bello FO, Ademosun AO, Akinyemi AJ, Adewuni TM, Antioxidant, hypolipidemic, and anti-angiotensin-1-converting enzyme properties of lemon (*Citrus limon*) and lime (*Citrus aurantifolia*) juice. *Comp Clin Pathol* **24**: 1395-1406 (2015).
- 5 Creelman RA, Mullet JE, Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 355-381 (1997).
- 6 Wasternack C, Strnad M, Jasmonate signaling in plant stress responses and development – active and inactive compounds. *N Biotechnol* **33(5)**: 604-613 (2016).
- 7 Serrano M, Martínez-Esplá A, Zapata P, Castillo S, Martínez-Romero D, Guillén F, Valverde JM, Valero D, 2018. Effects of methyl jasmonate treatment on fruit quality properties In: K. Barman S. Sharma MW. Siddiqui (Eds). Emerging Postharvest Treatment of Fruits and Vegetables. *Apple Academic Press*. 85-105. Oakville, Canada, 2018; 85-106.
- 8 De Geyter N, Gholami A, Goormachtig S, Goossens A, Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends Plant Sci* **17**: 349-359 (2012).
- 9 Dar TA, Uddin M, Khan MMA, Hakeem KR, Jaleel H, Jasmonates counter plant stress: A review *Environ Exp Bot* **115**: 49-57 (2015).
- 10 Wasternack C, How jasmonates earned their laurels: Past and present. *J Plant Growth Regul* **34**: 761-794 (2015).
- 11 Martínez-Esplá A, Zapata PJ, Castillo S, Guillén F, Martínez-Romero D, Valero D, Serrano M, Preharvest application of methyl jasmonate (MeJA) in two plum cultivars. 1. Fruit growth and quality attributes at harvest. *Postharvest Biol Technol* **98**: 98-105 (2014).
- 12 Castillo S, Valverde JM, Guillén F, Zapata PJ, Díaz-Mula HM; Valero D, Martínez-Romero D, Serrano M, Methyl jasmonate and methyl salicylate affect differentially the postharvest ripening process of 'Primulat' Sweet cherry. *Acta Horti* **1079**: 541-544 (2015).
- 13 Flores G and Ruiz Del Castillo ML, Accumulation of anthocyanins and flavonols in black currants (*Ribes nigrum* L.) by pre-harvest methyl jasmonate treatments. *J Sci Food Agric* **96**: 4026-31 (2016).
- 14 Flores G and Ruiz Del Castillo ML, Variations in ellagic acid, quercetin and myricetin in berry cultivars after preharvest methyl jasmonate treatments. *J. Food Compos Anal* **39**: 55-61 (2015).



- 15 Ozturk B, Yıldız K, Ozkan, Y, Effects of pre-harvest methyl jasmonate treatments on bioactive compounds and peel color development of “Fuji” apples. *Int J Food Prop* **18**: 954-962 (2015).
- 16 Portu J, Santamaría P, López-Alfaro I, López R, Garde-Cerdán T, Methyl jasmonate foliar application to Tempranillo vineyard improved grape and wine phenolic content. *J Agric Food Chem* **63**: 2328-2337 (2015).
- 17 Martínez-Esplá A, Valero D, Martínez-Romero D, Castillo S, Giménez MJ, Serrano M, Zapata PJ, Preharvest application of methyl jasmonate as an elicitor improves the yield and phenolic content of artichoke. *J Agric Food Chem* **65**: 9247-9254 (2017).
- 18 Reyes-Díaz M, Lobos T, Cardemil L, Nunes-Nesi A, Retamales J, Jaakola L, Alberdi M, Ribera-Fonseca A, Methyl jasmonate: An alternative for improving the quality and health properties of fresh fruits. *Molecules* **21**: 567 (2016).
- 19 Siboz XI, Bertling I, Ondindo AO, Salicylic acid and methyl jasmonate improve chilling tolerance in cold-stored lemon fruit (*Citrus limon*). *J Plant Pathol* **171**: 1722-1731 (2014).
- 20 Cao S, Zheng Y, Wang K, Jin Rui PH, Methyl jasmonate reduces chilling injury and enhances antioxidant enzyme activity in postharvest loquat fruit. *Food Chem* **115**: 1458-1463 (2009).
- 21 Jin P, Zheng Y, Tang S, Rui H, Wang CY, A combination of hot air and methyl jasmonate vapor treatment alleviates chilling injury of peach fruit. *Postharvest Biol Technol* **52**: 24-29 (2009).
- 22 Chanjirakul K, Wang SY, Wang CH, Siriphanich J, Effect of natural volatile compounds on antioxidant capacity and antioxidant enzymes in raspberries. *Postharvest Biol Technol* **40**: 106-115 (2006).
- 23 Fan L, Shi J, Zuo J, Gao L, Lv J, Wang Q, Methyl jasmonate delays postharvest ripening and senescence in the non-climacteric eggplant (*Solanum melongena* L.) fruit. *Postharvest Biol Technol* **120**: 76-83 (2016).
- 24 Zhu Z and Tian SP, Resistant responses of tomato fruit treated with exogenous methyl jasmonate to *Botrytis cinerea* infection. *Sci Hortic* **142**: 38-43 (2012).
- 25 Zapata PJ, Martínez-Esplá A, Guillén F, Díaz-Mula HM, Martínez-Romero D, Serrano M, Valero D, Preharvest application of methyl jasmonate (MeJA) in two plum cultivars. 2. Improvement of fruit quality and antioxidant systems during postharvest storage. *Postharvest Biol Technol* **98**: 115-122 (2014).
- 26 Hodges DM, Lester GE, Munro KD, Toivonen PMA, Oxidative stress: Importance for postharvest quality. *HortSci* **39**: 924-929 (2004).
- 27 FDA-EPA, Methyl Jasmonate; Exemption from the requirement of a tolerance. Document 78 FR 22789. Pages 22789-22794 (<https://federalregister.gov/a/2013-08829>) (2013).
- 28 Sayyari M, Babalar M, Kalantari S, Martínez-Romero D, Guillén F, Serrano M, Valero D, Vapour treatments with methyl salicylate or methyl jasmonate alleviated chilling injury and enhanced antioxidant potential during postharvest storage of pomegranates. *Food Chem* **124**: 964-970 (2014).

- 29 Benavente-Garcia O and Castillo J, Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J Agric Food Chem* **56**:6185-6205 (2008).
- 30 Xi W, Lu J, Qun J, Jiao B, Characterization of phenolic profile and antioxidant capacity of different fruit part from lemon (*Citrus limon* Burm.) cultivars. *J Food Sci Technol* **54**: 1108-1118 (2017).
- 31 Ozturk B, Yildiz K, Kucuker E, Effect of pre-harvest methyl jasmonate treatments on ethylene production, water-soluble phenolic compounds and fruit quality of Japanese plums. *J Sci Food Agric* **95**: 583-591 (2014).
- 32 García-Pastor ME, Serrano M, Guillén F, Castillo S, Martínez-Romero D, Valero D, Zapata PJ, Methyl jasmonate effects on table grape ripening, vine yield, berry quality and bioactive compounds depend on applied concentration. *Sci Hort* **247**: 380-389 (2019).
- 33 Muengkaew R, Chaiprasart P, Warrington I, Changing of physiochemical properties and color development of mango fruit sprayed methyl jasmonate. *Sci Hort* **198**: 70-77 (2016).
- 34 Saavedra GM, Figueroa NE, Poblete LA, Cherian S, Figueroa CR, Effects of preharvest applications of methyl jasmonate and chitosan on postharvest decay, quality and chemical attributes of *Fragaria chiloensis* fruit. *Food Chem* **190**: 448-453 (2016).
- 35 Asencio AD, Serrano M, García-Martínez S, Pretel MT, Organic acids, sugars, antioxidant activity, sensorial and other fruit characteristics of nine traditional Spanish Citrus fruits. *Eur Food Res Technol* **244**: 1497-1508 (2018).
- 36 Wang SY, Bowman L, Ding M, Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus sp.*) and promotes antiproliferation of human cancer cells. *Food Chem* **107**: 1261-1269 (2008).
- 37 Perez-Perez JG, Castillo IP, Garcia-Lidon A, Botia P, Garcia-Sanchez F, Fino lemon clones compared with the lemon varieties Eureka and Lisbon on two rootstocks in Murcia (Spain). *Sci Hort* **106**: 530-538 (2005).
- 38 Pérez-Pérez JG, Robles JM, García-Sánchez F, Botía P, Comparison of deficit and saline irrigation strategies to confront water restriction in lemon trees grown in semi-arid regions. *Agricultural Water Management* **164**: 46-57 (2016).
- 39 Pérez-Alfonso CO, Martínez-Romero D, Zapata PJ, Serrano M, Valero D, Castillo S, The effects of essential oils carvacrol and thymol on growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* involved in lemon decay. *Int J Food Microbiol* **158**: 101-106 (2012).
- 40 Castillo S, Pérez-Alfonso CO, Martínez-Romero D, Guillén F, Serrano M, Valero D, 2014, The essential oils thymol and carvacrol applied in the packing lines avoid lemon spoilage and maintain quality during storage. *Food Control* **35**: 132-136 (2014).

---

## 4.2. Preharvest treatment with oxalic acid improves postharvest storage of lemon fruit by stimulation of the antioxidant system and phenolic content

---

### Publicación 2 (Transcripción literal)

#### Preharvest treatment with oxalic acid improves postharvest storage of lemon fruit by stimulation of the antioxidant system and phenolic content

Vicente Serna-Escolano

María José Giménez

Salvador Castillo

Juan Miguel Valverde

Domingo Martínez-Romero

Fabián Guillén

María Serrano

Daniel Valero

Pedro Javier Zapata

Antioxidants, 10(6), 963, 2021

<https://doi.org/10.3390/antiox10060963>

## **Preharvest treatment with oxalic acid improves postharvest storage of lemon fruit by stimulation of the antioxidant system and phenolic content**

Vicente Serna-Escolano <sup>1</sup>, María José Giménez <sup>1</sup>, Salvador Castillo <sup>1</sup>, Juan Miguel Valverde <sup>1</sup>, Domingo Martínez-Romero <sup>1</sup>, Fabián Guillén <sup>1</sup>, María Serrano <sup>2</sup>, Daniel Valero <sup>1</sup> and Pedro Javier Zapata<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Food Technology, EPSO, University Miguel Hernández, 03312 Alicante, Spain; [vicente.serna02@goumh.umh.es](mailto:vicente.serna02@goumh.umh.es) (V.S.-E.); [maria.gimenezt@umh.es](mailto:maria.gimenezt@umh.es) (M.J.G.); [scastillo@umh.es](mailto:scastillo@umh.es) (S.C.); [jmvalverde@umh.es](mailto:jmvalverde@umh.es) (J.M.V.); [dmromero@umh.es](mailto:dmromero@umh.es) (D.M.-R.); [fabian.guillen@umh.es](mailto:fabian.guillen@umh.es) (F.G.); [daniel.valero@umh.es](mailto:daniel.valero@umh.es) (D.V.)

<sup>2</sup> Department of Applied Biology, EPSO, University Miguel Hernández, 03312 Alicante, Spain; [m.serrano@umh.es](mailto:m.serrano@umh.es) (M.S)

\* Correspondence: [pedrojzapata@umh.es](mailto:pedrojzapata@umh.es)



## ABSTRACT

Lemon trees (*Citrus limon* (L.) Burm. F) were treated monthly with oxalic acid (OA) at 0.1, 0.5, and 1 mM from initial fruit growth on the tree until harvest in 2019. The experiment was repeated in 2020, with the application of OA 1 mM (according to the best results of 2019). In both years, fruit from OA-treated trees and the controls were stored for 35 days at 10 °C. Results showed that all treatments reduced weight loss (WL) and maintained higher firmness, total soluble solids (TSS), and total acidity (TA) than in the controls. Meanwhile, colour (hue angle) did not show significant differences. The activity of antioxidant enzymes, catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), and peroxidase (POD) in the flavedo of the fruit from the OA-treated trees was higher than in the controls at harvest and after 35 days of storage. Similarly, the total phenolic content (TPC) in the flavedo and juice of the fruit from the OA-treated trees were higher than in the controls. The increase in the activity of the antioxidant enzymes and TPC started with the first preharvest OA treatment and were maintained during fruit development on the tree until harvest. Preharvest OA treatments enhanced the antioxidant system of the lemon fruits, reducing the postharvest incidence of decay. Thus, OA could be a useful tool to increase the quality and functional properties of lemon fruits.

**Keywords:** lemon tree; oxalic acid; antioxidant enzymes; total phenolic content; preharvest; postharvest

## 1. INTRODUCTION

The lemon tree (*Citrus limon* (L.) Burm. F) is an evergreen plant belonging to the *Rutaceae* family, mainly cultivated in countries of the tropical and subtropical regions. Spain is positioned as one of the main producer countries of lemon fruit worldwide, together with Argentina, Mexico, China, and India [1]. Lemons are highly appreciated by consumers around the world because of their flavour and appearance [2], and are widely used for culinary purposes, such as juice, slices accompanying beverages, or as flavouring (pulp and peel). In addition, lemon fruit has a high content of bioactive compounds, the most important ones being carotenoids, ascorbic acid (AsA), and flavonoids, mainly eriocitrin and hesperidin, which determine its biological activity [3,4]. These attributes are dependent on different factors such as management of the crop, the growth and fruit ripening stages, and rootstock, among others [5,6]

Lemons have a limited storage life, mainly due to softening, colour changes, acidity losses, and decay [2] as well as the oxidation of bioactive compounds. The content of AsA and antioxidant activity in lemon juice are affected by the ripening stage at harvest, as the higher initial concentration of antioxidant compounds could delay quality loss during storage since low antioxidant activity can produce an imbalance in reactive oxygen species (ROS), which would damage cell membranes and accelerate fruit senescence [7]. In this sense, the combination of cold storage and some postharvest treatments have been shown to be useful in delaying the postharvest ripening process [8]. Citrus fruit decay is mainly due to *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, and *Geotrichum citri-aurantii*, although the last one is less common. Additionally, the decay is related to mechanical damage on the fruit surface and high humidity during the harvest, storage, and fruit maturity stages [2]. The main fungicides to control lemon fruit decay are *o*-tho-phenylphenol (OPP), imazalil (IMZ), and thiabendazole (TBZ); however, many of them are being limited by legislation due to risks to human health.

One of the emerging strategies to delay the postharvest losses during storage is the use of preharvest treatments with natural elicitor compounds, which stimulate a tree response, leading to the maintenance of fruit quality through delaying the maturation process during cold storage. Among these elicitors, oxalic acid (OA) is a naturally organic acid present in plants, fungi, and

mammals, playing different roles for each organism [9]. Specifically in fruits, it has been reported that preharvest treatments with OA have positive effects in delaying senescence and preserving the quality in sweet cherries [10], peaches [11], and pomegranates [12]. Although OA's mechanism of action has not been elucidated, postharvest treatments with OA in mangoes have been related to the scavenging of the accumulation of reactive oxygen species (ROS) [13], and the maintenance of high contents of AsA and high levels of ATP in postharvest OA-treated kiwifruit [14]. Increases in the ratio of unsaturated/saturated fatty acids and the content of glucose and fructose have been reported in peaches and apricots, respectively, improving chilling injury tolerance in postharvest OA-treated samples [15,16]. Moreover, postharvest treatments with OA in melons and jujube were related to a reduction of decay due to an increase in the activity of antioxidant enzymes related to the resistance to pathogens, including peroxidase (POD), ascorbate peroxidase (APX), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) [17,18]. However, to the best of our knowledge, there is no information available in the literature regarding the effect of OA treatments on lemon fruit quality at harvest or during storage. OA is used as a pesticide to control the Varroa mite in honeybee combs. Recently, the FDA finalized a regulation establishing an exemption from the requirement of a tolerance for OA residues in honey and honeycomb, concluding that OA is safe for the general U.S. population, or any population subgroup, including infants and children.

The aim of this study was to evaluate the effect of preharvest treatments with OA at 0.1, 0.5, and 1 mM on the antioxidant enzymes CAT, APX, and POD in the flavedo and the total phenolic content in juice and flavedo of lemon fruit during on-tree development. Furthermore, the effect of OA treatments on lemon quality traits over 35 days of postharvest storage was measured. Finally, the role of the increased antioxidant system by OA treatments and the maintenance of postharvest quality of lemon fruits is discussed.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1. Field Conditions and Experimental Design**

Commercial fields located in Cartagena (Murcia, Spain) were used to perform the experiments in 2019 and 2020 using lemon (*Citrus limon* (L.)

Burm.f) 'Fino' grafted on *Citrus macrophylla* rootstock, under standard agricultural practices that include foliar sprays of sulphur or copper for fungal control during periods with high field humidity. The trees were planted at 4 × 5 m, with the 'Fino' trees being 8 and 9 years old in the 2019 and 2020 assays, respectively. Field experiments were performed at random using four blocks of five trees for each treatment. In 2019, assay 'Fino' trees were treated five times with 0.1, 0.5, and 1.0 mM of OA at monthly intervals, starting after physiological fruit drop (abscission of green, young fruits due to physiological reasons) in July and finishing three days before harvest (13<sup>th</sup> December). In the 2020 experiment, according to the best results obtained in 2019, the concentration of 1.0 mM OA was chosen and applied as it was in the 2019 experiment, and the fruit was harvested on 11<sup>st</sup> December. For all cases, 5 L of OA (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) solutions containing 0.5% Tween 20 as a surfactant were sprayed on each tree. Control trees were sprayed with aqueous solutions containing 0.5% Tween-20. The fruit was harvested at the commercial ripening stage based on size (55 mm of diameter) and peel colour (light green). For the postharvest experiments in 2019 and 2020, 60 fruits (homogeneous in size and colour) from each replicate and treatment field were taken, divided into six lots of ten fruits, and stored at 10 °C at a relative humidity of 85%. One lot of ten fruits for each replicate and treatment was sampled at random after 0, 7, 14, 28, and 35 days of cold storage for analytical determinations. In addition, in the 2020 experiment, two lemon fruits were picked from each tree after 3 days of treatment 1 (T1) and treatment 5 (T5); after 3, 4, 5, and 6 days of treatment 2 (T2) and treatment 3 (T3); and after 3, 4, 5, 8, 11, 15, and 22 days of treatment 4 (T4). The fruits were peeled and squeezed, and the peels and juice of the 10 fruits of each replicate were mixed and stored at -80 °C until the total phenolics and the activity of the antioxidant enzymes were measured.

## **2.2. Physiological and Quality Parameters**

Each individual fruit was weighed at day 0 and after each sampling date during storage, and weight loss (WL) was expressed as a percentage (%). Firmness was measured individually in each fruit by using a TX-XT2i texture analyser (Stable Microsystems, Godalming, UK) coupled to a steel plate that caused a deformation of 5% of the fruit diameter and was expressed as N mm



<sup>-1</sup>. On the other hand, to measure the respiration rate, each fruit was placed in a 0.5 L glass jar for 60 min at room temperature. One mL of the holder atmosphere was withdrawn, and CO<sub>2</sub> was quantified in a gas chromatograph (Shimadzu 14B-GC) coupled to a thermal conductivity detector [19]. The respiration rate was expressed as mg of CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. The colour was measured at three points of the equatorial perimeter using the Minolta colorimeter (CRC200; Minolta, Osaka, Japan) and was expressed as hue angle. All of these parameters were measured in the ten fruits of each replicate, and results were expressed as mean ± SE. The juice of the 10 fruits from each replicate was then mixed and used to measure total soluble solids (TSS) and titratable acidity (TA) in duplicate in each sample, and the peels were mixed and frozen in liquid nitrogen. The TSS in the lemon juice was determined with a digital refractometer (Hanna Instruments, Rhode Island, USA), and the TA was determined by the titration of 0.5 mL of juice diluted in 25 mL of distilled water with NaOH 0.1 mM until pH 8.1 using an automatic titrator (785 DMP Titrino; Metrohm, Herisau, Switzerland). The results (mean ± SE) were expressed as g 100 mL<sup>-1</sup>. The incidence of decay was determined for each sampling day by identifying the lemons with disease symptoms [20] using the following formula:

$$\text{Decay (\%)} = (\text{decayed fruits} / \text{total evaluated fruits}) \times 100 \quad (1)$$

### 2.3. Activity of the Antioxidant Enzymes

Extracts to measure ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), and peroxidase (POD) were obtained by homogenizing 2 g of frozen flavedo tissue with 10 mL of potassium phosphate buffer 50 mM, pH 7, containing 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone and 1.0 mM of ethylenediamine tetraacetic acid. The extracts were centrifuged at 10,000× *g* for 20 min at 4 °C, and the APX, CAT, and POD activities were quantified in duplicate in each extract as previously reported [21]. Enzymatic activities were calculated as units of enzyme activity (U min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>). One enzyme unit (U) was defined as a 0.01 decrease in absorbance at 290 nm min<sup>-1</sup> for APX, a 0.01 increase of absorbance at 470 nm min<sup>-1</sup> for POD and, a 0.01 decrease of absorbance at 240 nm min<sup>-1</sup> for CAT.

### 2.4. Total Phenolic Quantification

The total phenolics were measured by homogenizing 2 g of frozen flavedo with 15 mL of water: methanol (2:8, v/v) containing 2.0 mM NaF. After centrifugation of the extracts at 10,000× *g* and 4 °C for 20 min, the total phenolic content (TPC) was measured in duplicate in each flavedo sample by using the Folin–Ciocalteu reagent, as previously reported [21]. The total phenolics in the juice were measured directly using the centrifugated juice in duplicate for each replicate and treatment. Results (mean ± SE) were expressed as mg of gallic acid equivalent to 100 g<sup>-1</sup> fresh weight.

## 2.5. Statistical Analysis

The results obtained were expressed as the mean ± SE of four randomized replicates. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and a multiple comparison with the Fisher LSD method was carried out to find significant differences ( $p < 0.05$ ) among the treatments, using SPSS, version 22 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

## 3. RESULTS

### 3.1. Physiological and Quality Parameters (2019)

Weight loss increased during cold storage (Table 1), although the OA treatment induced significantly lower weight loss ( $p < 0.05$ ), with compared to the lemons from the control trees for all assayed doses (0.1, 0.5 and 1 mM). After 35 days of cold storage, lemons from the 1 mM treated trees had 40% lower WL than the controls, OA 1 mM being considered the best treatment in terms of reduced physiological WL. Conversely, fruit firmness decreased during cold storage, although this decrease was delayed by both the 0.5 and 1 mM OA treatments, with the most significant effect ( $p < 0.05$ ) being found at day 35 of storage for the fruit from the 0.5 mM OA treatment (a 8% higher firmness retention), while no significant effect was observed for 0.1 mM treatment (Table 1).

**Table 1.** The effects of oxalic acid (OA) at 0.1, 0.5, and 1 mM preharvest treatments on weight loss (%), firmness (N mm<sup>-1</sup>), respiration rate (mg Kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), total soluble solids (° Brix), total acidity (g 100 g<sup>-1</sup>), and colour (hue angle) over 35 days of storage at 10 °C in the 2019 experiment. Data are the mean ±

SE of four replicates. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) among the treatments for each sampling date.

Storage Days	Treatment	Weight Loss	Firmness	Respiration Rate	Total Soluble Solids	Titratable Acidity	Colour
0	Control		9.51 ± 0.30 a	15.72 ± 0.38 a	7.53 ± 0.09 b	6.67 ± 0.08 b	91.23 ± 0.50 a
	OA 0.1		9.21 ± 0.18 a	14.85 ± 0.21 a	7.37 ± 0.07 c	6.71 ± 0.08 b	89.55 ± 0.40 b
	OA 0.5		9.14 ± 0.22 a	13.73 ± 0.12 b	7.58 ± 0.02 b	6.71 ± 0.06 b	89.99 ± 0.51 a
	OA 1		9.37 ± 0.25 a	13.63 ± 0.14 b	7.90 ± 0.07 a	6.98 ± 0.03 a	91.20 ± 0.34 a
35	Control	6.82 ± 0.03 a	6.27 ± 0.23 b	16.61 ± 0.21 a	6.60 ± 0.04 b	6.09 ± 0.02 b	87.32 ± 0.45 a
	OA 0.1	6.33 ± 0.05 b	6.32 ± 0.30 b	15.94 ± 0.37 b	6.25 ± 0.03 c	5.82 ± 0.03 c	85.27 ± 0.51 b
	OA 0.5	5.92 ± 0.08 c	6.81 ± 0.33 a	14.27 ± 0.26 c	6.68 ± 0.05 b	6.18 ± 0.04 b	85.66 ± 0.49 b
	OA 1	4.21 ± 0.03 d	6.72 ± 0.24 a	12.47 ± 0.13 d	7.00 ± 0.02 a	6.37 ± 0.03 a	86.87 ± 0.31 a

At harvest, the respiration rate was lower in lemons from the OA-treated trees at 0.1, 0.5, and mM (5%, 14%, and 30% lower, respectively), than in fruits from the control trees, with these differences being maintained after 35 days of cold storage. At harvest, the OA 1 mM treatment increased TSS (a 7%) while the OA 0.1 and 0.5 mM treatments did not show significant differences ( $p < 0.05$ ) with respect to lemons from the control trees. The TSS decreased during cold storage, although these differences in the TSS at harvest were maintained during storage. A similar effect was observed for TA, which decreased during cold storage, but lemons from the 1 mM OA-treated trees had significantly a higher TA than the other treated and untreated fruits (Table 1). On the other hand, the hue angle at harvest of fruit from the 0.1 mM treated trees showed no significant values according to statistical analysis (more yellow) than fruit from the trees treated with OA 1 mM and the controls. The differences found at harvest were maintained during cold storage. There were no significant differences ( $p < 0.05$ ) between fruits from trees treated with OA 1 mM and the controls during the assay. However, the hue angle decreased during storage in all fruits, independent of the treatments (Table 1).

### 3.2. Antioxidant systems during cold storage (2019)

At harvest, APX, CAT, and POD activity in the flavedo of the lemons from the OA-treated trees were higher than in the controls, OA at 1 mM being the most effective treatment in enhancing these antioxidant activities. After 35 days of storage, the differences among treatments were reduced, although the

activity of APX, CAT, and POD was 1.9, 2.6, and 1.7-fold higher in the flavedo of the fruit from the 1 mM OA-treated trees, respectively, than in the controls (Table 2). TPC at harvest in the flavedo of the fruit from the trees treated with OA at 0.1, 0.5, and 1 mM were 30%, 52%, and 71% higher than in the controls, respectively. The TPC in the juice were significantly ( $p < 0.05$ ) increased by the 0.5 and 1 mM treatments. The TPC increased in fruits from the treated and untreated trees during cold storage in the flavedo and juice, TPC still being higher for OA treatments at 0.5 and 1 mM than in controls.

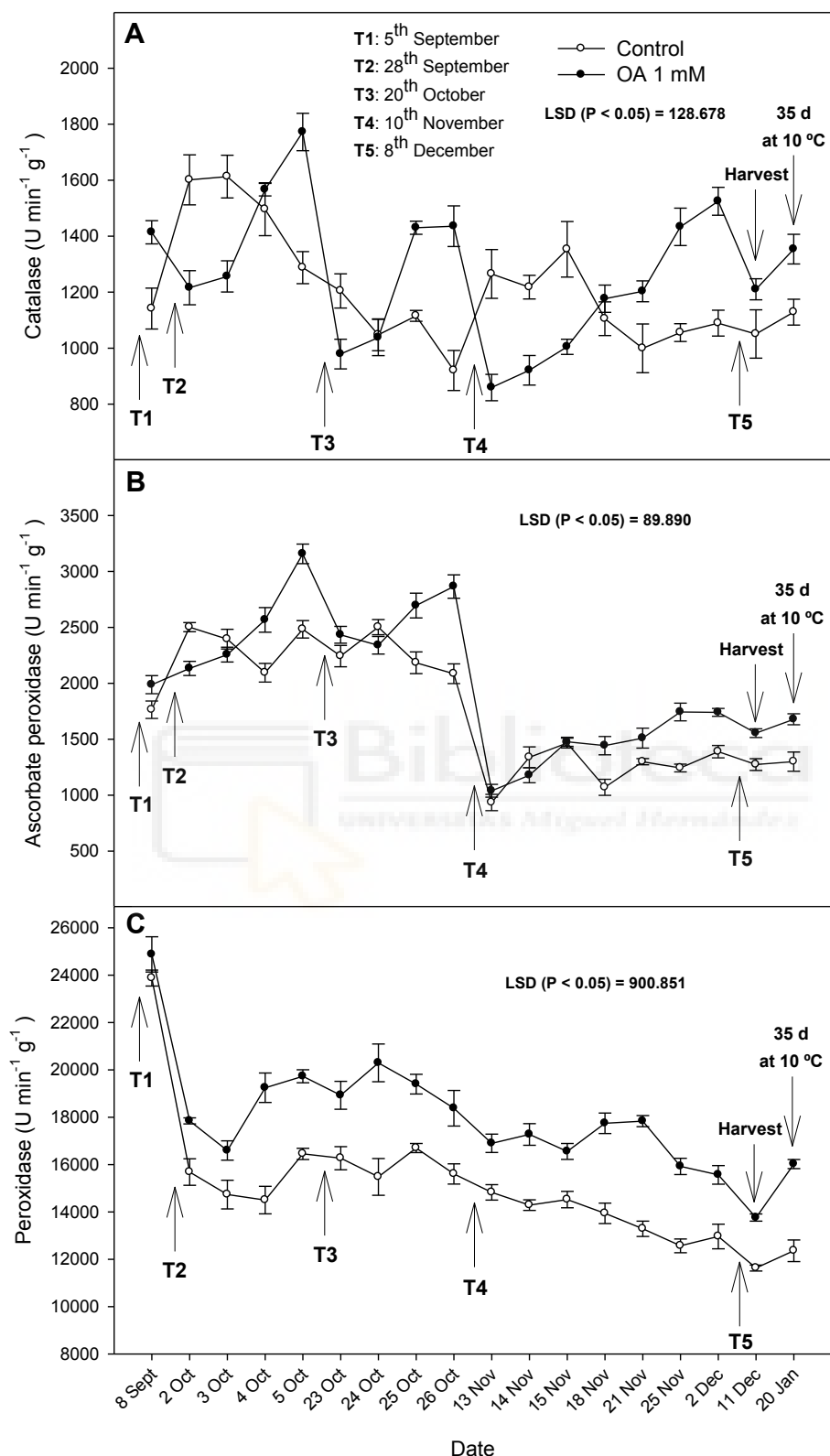
Taking into account that quality parameters, such as WL, firmness, TA, and TSS as well as the TPC and the activity of the antioxidant enzymes, were found in higher levels at harvest and maintained at higher levels during storage in the fruit from the 1 mM OA treated trees as compared with those from the 0.1 and 0.5 mM doses, this concentration was selected to perform the 2020 experiment.

**Table 2.** The activity of the antioxidant enzymes ( $\text{U min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ), ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), and peroxidase (POD) in the flavedo and total phenolic content ( $\text{mg } 100 \text{g}^{-1}$ ) in the flavedo and juice from the control and oxalic acid (OA) treated trees at harvest (day 0) and after 35 days of storage at  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  in the 2019 experiment. Data are the mean  $\pm$  SE of the four replicates. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) among treatments for each sampling date.

Storage days	Treatment	APX	CAT	POD	TPC	
		Flavedo			Flavedo	Juice
0	Control	1132.5 $\pm$ 42.5 d	772.0 $\pm$ 68.4 c	8595.0 $\pm$ 135.2 b	211.4 $\pm$ 5.1 d	64.0 $\pm$ 2.6 b
	OA 0.1	1698.0 $\pm$ 36.7 c	1782.0 $\pm$ 107.4 b	8515.0 $\pm$ 305.7 b	276.8 $\pm$ 4.8 c	71.7 $\pm$ 5.7 b
	OA 0.5	1794.0 $\pm$ 50.1 b	1743.0 $\pm$ 108.84 b	13710.0 $\pm$ 251.6 a	321.6 $\pm$ 4.8 b	83.4 $\pm$ 6.7 a
	OA 1	2208.0 $\pm$ 43.5 a	2037.6 $\pm$ 164.3 a	14330.0 $\pm$ 626.3 a	361.4 $\pm$ 5.1 a	92.3 $\pm$ 9.1 a
35	Control	1997.6 $\pm$ 51.2 d	1064.8 $\pm$ 16.5 c	9888.9 $\pm$ 221.8 c	237.9 $\pm$ 3.2 d	71.2 $\pm$ 2.3 c
	OA 0.1	2843.7 $\pm$ 59.2 c	1924.9 $\pm$ 101.9 b	9987.4 $\pm$ 165.3 c	294.5 $\pm$ 5.7 c	73.4 $\pm$ 2.4 c
	OA 0.5	3007.8 $\pm$ 78.3 b	1989.5 $\pm$ 77.3 b	14125.4 $\pm$ 189.4 b	342.3 $\pm$ 6.1 b	89.5 $\pm$ 2.2 b
	OA 1	3505.2 $\pm$ 72.2 a	2556.2 $\pm$ 33.1 a	15162.0 $\pm$ 199.5 a	375.1 $\pm$ 4.1 a	99.5 $\pm$ 1.7 a
Storage days	Treatment	APX	CAT	POD	TPC	
		Flavedo			Flavedo	Juice
0	Control	1132.5 $\pm$ 42.5 d	772.0 $\pm$ 68.4 c	8595.0 $\pm$ 135.2 b	211.4 $\pm$ 5.1 d	64.0 $\pm$ 2.6 b
	OA 0.1	1698.0 $\pm$ 36.7 c	1782.0 $\pm$ 107.4 b	8515.0 $\pm$ 305.7 b	276.8 $\pm$ 4.8 c	71.7 $\pm$ 5.7 b
	OA 0.5	1794.0 $\pm$ 50.1 b	1743.0 $\pm$ 108.84 b	13710.0 $\pm$ 251.6 a	321.6 $\pm$ 4.8 b	83.4 $\pm$ 6.7 a
	OA 1	2208.0 $\pm$ 43.5 a	2037.6 $\pm$ 164.3 a	14330.0 $\pm$ 626.3 a	361.4 $\pm$ 5.1 a	92.3 $\pm$ 9.1 a
35	Control	1997.6 $\pm$ 51.2 d	1064.8 $\pm$ 16.5 c	9888.9 $\pm$ 221.8 c	237.9 $\pm$ 3.2 d	71.2 $\pm$ 2.3 c
	OA 0.1	2843.7 $\pm$ 59.2 c	1924.9 $\pm$ 101.9 b	9987.4 $\pm$ 165.3 c	294.5 $\pm$ 5.7 c	73.4 $\pm$ 2.4 c
	OA 0.5	3007.8 $\pm$ 78.3 b	1989.5 $\pm$ 77.3 b	14125.4 $\pm$ 189.4 b	342.3 $\pm$ 6.1 b	89.5 $\pm$ 2.2 b
	OA 1	3505.2 $\pm$ 72.2 a	2556.2 $\pm$ 33.1 a	15162.0 $\pm$ 199.5 a	375.1 $\pm$ 4.1 a	99.5 $\pm$ 1.7 a

### 3.3. Antioxidant Systems during Fruit Development and Cold Storage (2020)

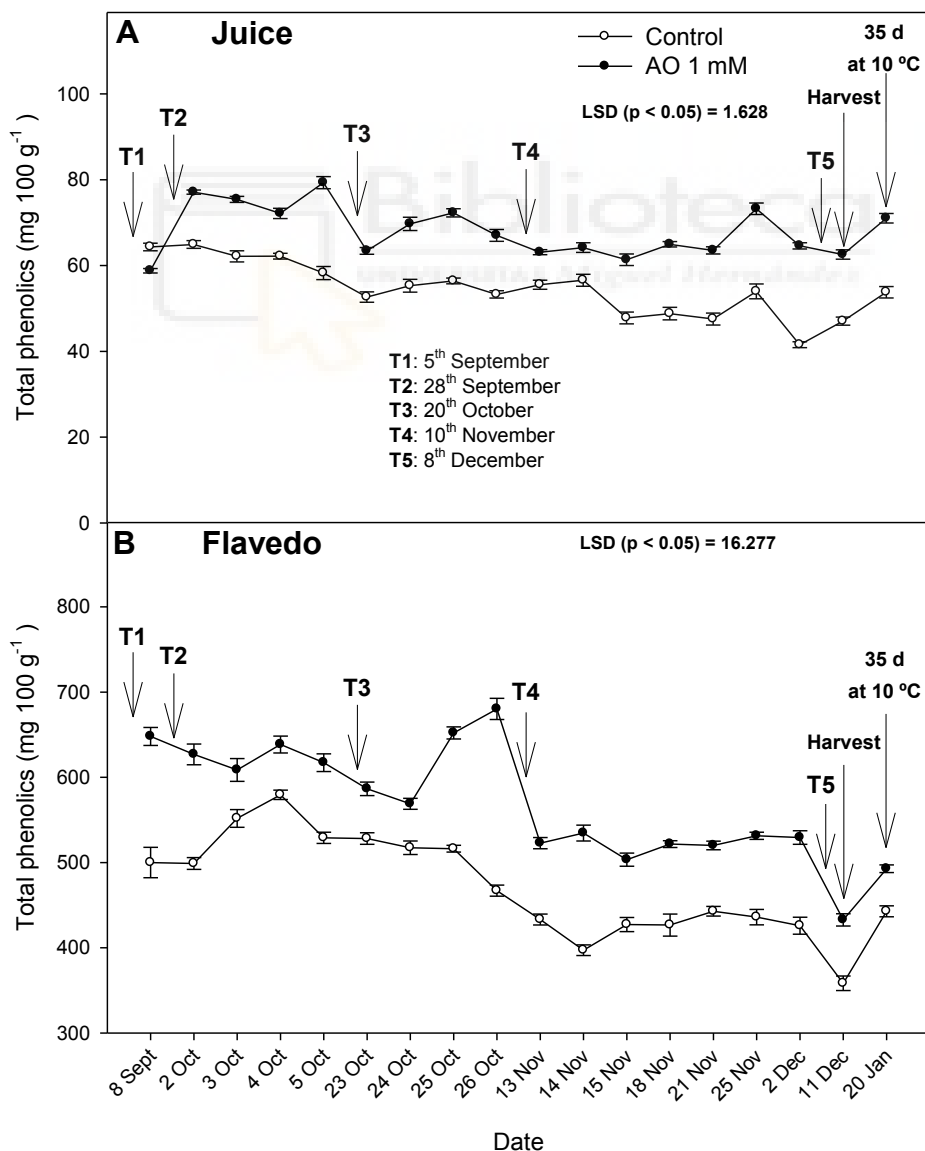
In 2020, a more detailed study was developed, measuring the activity of the antioxidant enzymes CAT, APX, and POD in the flavedo of the lemon fruits treated with OA 1 mM during their development on the tree and after 35 days of cold storage (Figure 1). The TPC in the flavedo and juice were also determined during fruit development (Figure 2). The activity of CAT enzymes changed during fruit development on the tree. Since the first sampling on 8<sup>th</sup> September (three days after the first treatment), significant differences ( $p < 0.05$ ) were found between the fruit treated with OA and the control fruit. However, in the second treatment, the maximum enzymatic activity was measured from the fourth day and was 40% higher in the fruit treated with OA than the control fruit (Figure 1). Similar to the previous treatment, the third application showed that the OA treatment had increased CAT activity by 45% compared to the control fruit. However, after four days of T1, T2, and T3, CAT activity decreased, reaching lower levels than in the controls. From the fourth treatment, CAT activity increased, and the major activity peak was achieved after 21<sup>th</sup> days, being 50% higher in the OA treated fruit than the control fruit. The APX enzyme had similar trend as CAT, and it reached the maximum activity four days after T1 and T3 and after 14 days of T4, with an increase of 45% compared to the untreated fruit ( $1243 \pm 34 \text{ U min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ). On the other hand, the POD enzyme had different behavior, as it had a significant increase ( $p < 0.05$ ) after the second treatment and was maintained at higher levels than in the control fruits during the development of the fruit on the tree (Figure 1).



**Figure 1.** The effect of oxalic acid (OA) treatments on catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), and peroxidase (POD) activity on the flavedo of lemon fruit during growth and ripening on the tree (**A–C**, respectively), at

harvest, and after 35 days of storage at 10 °C in the 2020 experiment. Data are the the mean  $\pm$  SE of the four replicates. LSD show significant differences at  $p < 0.05$ . T1, T2, T3, T4, and T5 show the dates of the treatments.

The lemon fruits were harvested on 11<sup>th</sup> December, and the flavedo of the lemons from the OA-treated trees showed significantly higher ( $p < 0.05$ ) activities of CAT, POD, and APX (ca. 20%) than the controls. After 35 days of storage, fruits from the control trees showed CAT activity of  $1128 \pm 46 \text{ U min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ , APX of  $1300 \pm 85 \text{ U min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ , and POD of  $12,360 \pm 456 \text{ U min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ , and they were significantly higher ( $p < 0.05$ ) in the fruit from the trees treated with OA 1 mM, by 20%, 30%, and 29%, respectively than in the controls (Figure 1).



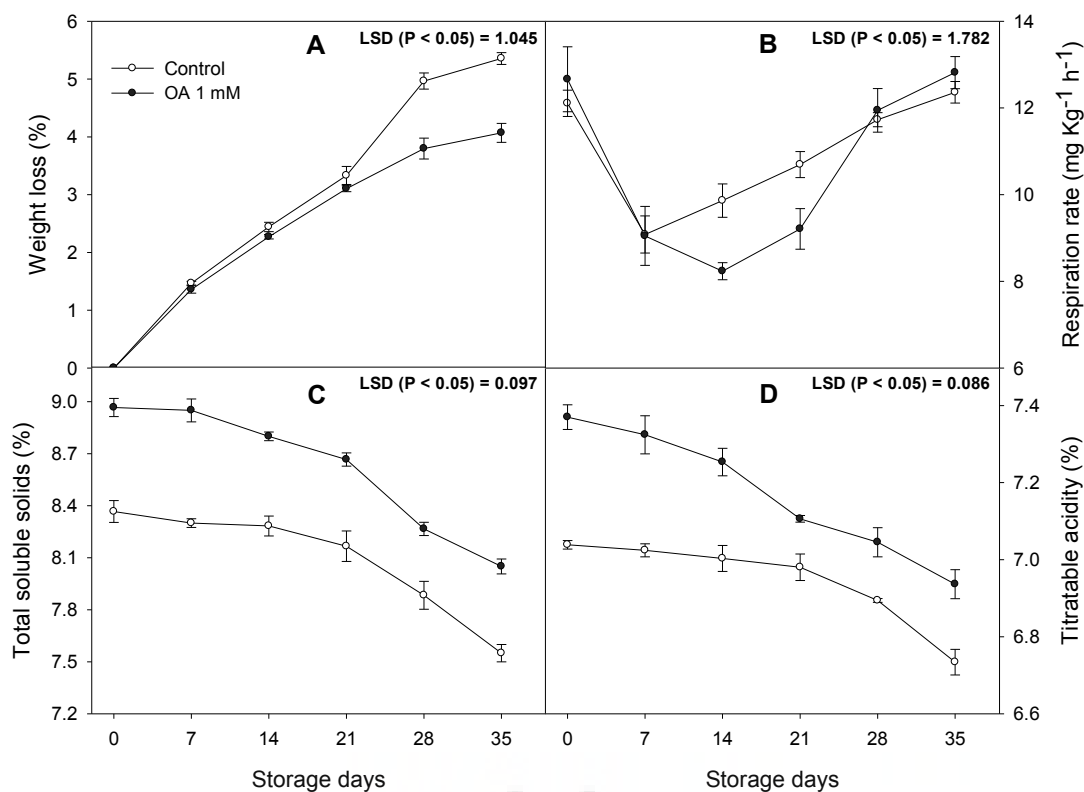
**Figure 2.** Total phenolic content in juice (**A**) and flavedo (**B**) during fruit growth and ripening on the tree, at harvest, and after 35 days of storage at 10 °C of lemons from the control and oxalic acid (OA) treated trees in the 2020 experiment. Data are the mean  $\pm$  SE of four replicates. LSD show significant differences at  $p < 0.05$ . T1, T2, T3, T4, and T5 show the dates of the treatments.

The total phenolics content in juice increased 30% from T2 in lemons from the OA-treated trees compared to the controls, differences that remained at similar levels during the whole fruit development until harvest. However, the TPC in the flavedo showed different behavior because a decreasing trend was observed in the lemons from the control and treated trees during fruit development. However, it is worth noting that TPC in the flavedo was significantly ( $p < 0.05$ ) increased by OA treatment from the first treatment until harvest, the highest differences being found after T3 treatment (45% increase). During storage, TPC increased in all fruits, but after 35 days of storage, values were 33% and 11% higher in flavedo and juice, respectively, in fruits from the OA-treated trees than in the controls (Figure 2).

### **3.4. Physiological and Quality Parameters (2020)**

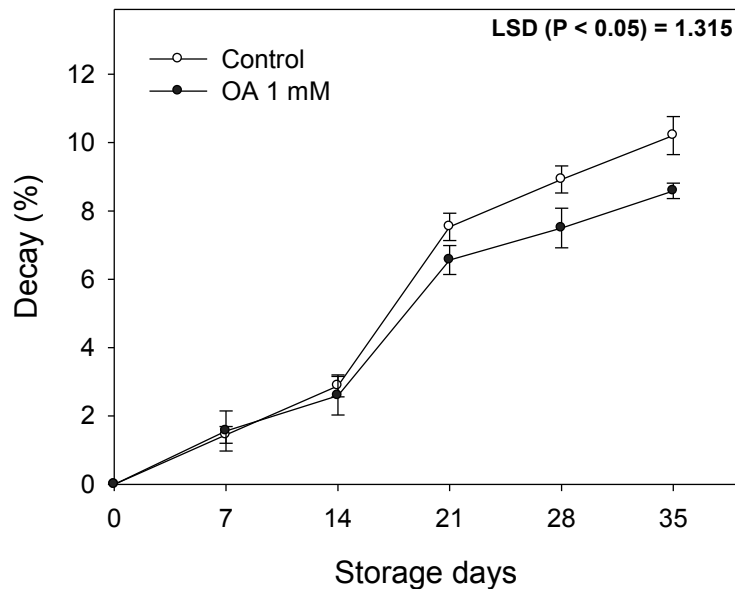
The fruit quality parameters were affected by OA treatment, as they were in the 2019 assays. WL was significantly lower ( $p < 0.05$ ) in the fruit from the 1 mM OA treated trees than in the controls from 21 to 35 days of cold storage (Figure 3A). The respiration rate was significantly reduced in the treated fruit at 14 and 21 days of storage. The greatest respiration rate difference was on day 14, with a decrease of 30% in the OA treated fruit compared to the controls (Figure 3B).





**Figure 3.** The effect of oxalic acid (OA) treatments in **A**) weight loss (%), **B**) respiration rate ( $\text{mg Kg}^{-1}\text{h}^{-1}$ ), **C**) total soluble solids ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ), and **D**) titratable acidity ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ) during 35 days of storage at  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  in the 2020 experiment. Data are the mean  $\pm$  SE. LSD show significant differences at  $p < 0.05$ .

The total soluble solids and TA in the fruit from OA-treated trees increased 10% and 3%, respectively, compared to the controls, and these differences were maintained during storage (Figure 3C,D). Finally, the decay incidence was evaluated as the percentage of fruit showing symptoms of fungal decay since previous results (2019) confirmed the effect of OA-treatments on shelf life. Results showed that from 21 days until to the end of storage, fruit from the 1 mM OA treated trees had lower decay incidence than the controls, having the highest differences after 35 days of storage with a 20% decrease (Figure 4).



**Figure 4.** The incidence (%) of decayed lemons from the trees treated with oxalic acid (OA) 1 mM and in the controls. Data are the mean  $\pm$  SE. LSD show significant differences at  $p < 0.05$ .

#### 4. DISCUSSION

Commercial procedures regulate the marketing of lemons by increasing requirements regarding quality parameters. In addition, there is currently a growing interest in replacing traditional treatments with others with a lower environmental impact. Previous results in fruits such as cherries [10] or plums [22] established that preharvest treatments with OA could delay fruit quality losses during cold storage. In lemon fruits, OA treatments considerably reduced the respiration rate, which could be responsible for the lower weight loss and higher firmness observed in the fruits from the treated trees than in the controls in the 2019 (Table 1) and 2020 (Figure 3) experiments. These results were consistent with previous results in pomegranates [12], mangoes [23], and artichokes [24]. Differences between the treated and untreated fruits with respect to weight loss and firmness could be attributed to the effect of OA on the stabilization and maintenance of cell integrity and on the reduction of the hydrolysis of cell wall components in the mesocarp [8]. Recent assays reported that postharvest treatments with OA in asparagus preserved quality by reducing the respiration rate during cold storage [25], which would indicate a suppressive

effect on metabolic activity, leading to a lower consumption of TSS and organic acids [26]. At harvest, OA treated fruit had higher TSS and TA than untreated fruit in 2019 (Table 1) and 2020 (Figure 3C), which could be due to an increase in the photosynthetic rate that promotes sugar and organic acid accumulation during fruit development on the tree. However, these differences were maintained during cold storage due to the reduced hydrolysis of sugars and organic acids, maybe related to a lower respiration rate.

In the 2019 experiment, antioxidant activity at harvest of the APX, CAT, and POD enzymes was higher in fruit treated with OA than in untreated fruit, and these effects were maintained over 35 days of storage (Table 2). In 2020, it was decided to carry out a deeper assay comparing the fruit treated with the best concentration of OA (1 mM), according to the 2019 results. APX and POD activity decreased during fruit development on the tree in both treated and untreated lemons (Figure 1B and 1C). However, CAT activity was more stable from the beginning to the end of the assay (Figure 1A). These differences may be related to the balance between the production and elimination of  $H_2O_2$ , which could be due to the important role that OA plays in suppressing oxidative damage [13]. However, it is important to note that all of those antioxidant enzymes were enhanced by OA from the first application, although an accumulative effect due to repeated applications could not be observed.

Antioxidant activity of the APX, CAT, and POD enzymes increased during cold storage in all samples, however, the increase in the fruit treated with OA was significantly higher than in the untreated fruit. CAT, POD, and APX are enzymes that have a wide distribution in taller plants and have a very specific function in detoxifying ROS [27]. Preharvest OA treatments would be able to maintain higher activity of CAT and POD for a longer time, ensuring better control of ROS balance in cells.

On the other hand, TPC were also increased by the OA treatments in the juice and flavedo in both years. In lemon fruit, the main phenolic compounds are the flavonones hesperidin and eriocitrin, which, together with vitamin C, determine most of non-enzymatic antioxidant activity [26]. The TPC in the flavedo decreased during fruit development on tree, which could be attributed to the oxidation of polyphenols by the polyphenoloxidase enzyme during the fruit ripening process [28]. TPC in the flavedo and juice increased significantly in fruit

from the OA-treated trees and in the controls during storage, although the higher levels observed at harvest as a consequence of the OA treatments were maintained until the end of storage (Figure 2). These results were consistent with previous reports in mangoes [29], pomegranates [30], and plums [22], where OA treatments promoted the accumulation of TPC during cold storage due to the activation of phenylalanine ammonium lyase (PAL), a key enzyme of the phenylpropanoid pathway.

Preharvest OA treatment decreased the accumulated decay incidence in lemon fruit during cold storage (Figure 3E). This effect could be explained by the enhanced capacity of antioxidant enzymes found in the fruits treated with OA as well as to the OA effect of strengthening the cell wall and promoting the expression of genes in plant defense responses [14]. Lemon fruit phytopathogenic fungi such as *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* are capable of altering oxidative balance, destabilizing the cell wall [31]. In this sense, it has been reported that *P. digitatum* induces the synthesis of secondary metabolites, such as flavonones, in citrus fruit through the stimulation of the phenylpropanoid pathway [32]. Moreover, there is evidence that indicates the importance of primary metabolism and the ability to generate ATP in the resistance of fruits to the pathogen [33]. Carbon availability is essential in many defense responses since in many cases, it requires the synthesis of biomolecules, such as the flavonones mentioned above. These results could establish that fruits treated with OA would have a greater availability of sugars and organic acids as a carbon source to obtain energy to induce defense mechanisms [34].

## 5. CONCLUSIONS

All preharvest treatments with OA showed a good effect on the quality parameters measured at harvest and during cold storage in 2019. However, treatment with 1mM OA demonstrated higher effectiveness compared to 0.1 and 0.5 mM, leading to lower weight loss, respiratory rate, higher firmness, TSS, and TA. Regarding bioactive compounds, the treated fruit showed the highest phenolic content and maximum activity of antioxidant enzymes (APX, CAT and POD), confirming 1 mM OA treatment as the best treatment. Therefore, the following year, the effects of the treatment with 1 mM OA were

confirmed, showing lower quality losses and improvement in the shelf life of lemons during marketing and significantly reduced the appearance of decay, which could be attributed to enhanced antioxidant systems.

**Author Contributions:** Conceptualization, V.S.-E. and P.J.Z.; methodology, M.J.G., J.M.V. and S.C.; software, F.G.; investigation, V.S.-E., M.J.G. and P.J.Z.; data curation, D.M.-R. and J.M.V.; writing—original draft preparation, V.S.-E., M.S. and P.J.Z.; writing—review and editing, D.M.-R. and D.V.; visualization, all authors; supervision, M.S. and D.M.-R.; funding acquisition, P.J.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data is contained within the article.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that there are no conflicts of interest.



## REFERENCES

1. Faostat. Production Statistics. 2019. Available online: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (accessed on 5 November 2020).
2. Baldwin, E.A.; Bai, J.; Plotto, A.; Ritenour, M.A. Citrus fruit quality assessment; producer and consumer perspectives. *Stewart Postharvest Rev.* **2014**, *10*, 1–7.
3. Xavier, S.; Barbosa, C.; Barros, D.; Silva, R.; Oliveira, A.; Freitas, R. Vitamin C antioxidant effects in hippocampus of adult Wistar rats after seizures and status epilepticus induced by pilocarpine. *Neurosci. Lett.* **2007**, *420*, 76–79, doi:10.1016/j.neulet.2007.04.056.
4. Parhiz, H.; Roohbakhsh, A.; Soltani, F.; Rezaee, R.; Iranshahi, M. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of the Citrus Flavonoids Hesperidin and Hesperetin: An Updated Review of their Molecular Mechanisms and Experimental Models. *Phytother. Res.* **2015**, *29*, 323–331, doi:10.1002/ptr.5256.
5. Gil-Izquierdo, A.; Riquelme, M.T.; Porras, A.I.; Ferreres, F. Effect of the Rootstock and Interstock Grafted in Lemon Tree (*Citrus limon* (L.) Burm.) on the Flavonoid Content of Lemon Juice. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 324–331, doi:10.1021/jf0304775.
6. Robles, J.; Botía, P.; Pérez-Pérez, J. Sour orange rootstock increases water productivity in deficit irrigated 'Verna' lemon trees compared with *Citrus macrophylla*. *Agric. Water Manag.* **2017**, *186*, 98–107, doi:10.1016/j.agwat.2017.03.002.
7. Di Matteo, A.; Simeone, G.D.R.; Cirillo, A.; Rao, M.A.; Di Vaio, C. Morphological characteristics, ascorbic acid and antioxidant activity during fruit ripening of four lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. F.) cultivars. *Sci. Hortic.* **2021**, *276*, 109741, doi:10.1016/j.scienta.2020.109741.
8. Valero, D.; Serrano, M. *Postharvest Biology and Technology for Preserving Fruit Quality*, 1st ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2010.
9. Shimada, M.; Akamtsu, Y.; Tokimatsu, T.; Mii, K.; Hattori, T. Possible biochemical roles of oxalic acid as a low molecular weight compound involved in brown-rot and white-rot wood decays. *J. Biotechnol.* **1997**, *53*, 103–113, doi:10.1016/s0168-1656(97)01679-9.
10. Martínez-Esplá, A.; Zapata, P.J.; Valero, D.; García-Viguera, C.; Castillo, S.; Serrano, M. Preharvest Application of Oxalic Acid Increased Fruit Size, Bioactive Compounds, and Antioxidant Capacity in Sweet Cherry Cultivars (*Prunus avium* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 3432–3437, doi:10.1021/jf500224g.
11. Razavi, F.; Hajilou, J. Enhancement of postharvest nutritional quality and antioxidant capacity of peach fruits by preharvest oxalic acid treatment. *Sci. Hortic.* **2016**, *200*, 95–101, doi:10.1016/j.scienta.2016.01.011.
12. García-Pastor, M.E.; Giménez, M.J.; Valverde, J.M.; Guillén, F.; Castillo, S.; Martínez-Romero, D.; Serrano, M.; Valero, D.; Zapata, P.J. Preharvest Application of Oxalic Acid Improved Pomegranate Fruit Yield, Quality, and Bioactive Compounds at Harvest in a Concentration-Dependent Manner. *Agronomy* **2020**, *10*, 1522, doi:10.3390/agronomy10101522.

13. Ding, Z.-S.; Tian, S.-P.; Zheng, X.-L.; Zhou, Z.-W.; Xu, Y. Responses of reactive oxygen metabolism and quality in mango fruit to exogenous oxalic acid or salicylic acid under chilling temperature stress. *Physiol. Plant* **2007**, *130*, 112–121, doi:10.1111/j.1399-3054.2007.00893.x.
14. Liang, C.; Lv, J.; Jin, M.; Li, H.; Rao, J. Effects of oxalic acid treatment on chilling injury, antioxidant capacity and energy status in harvested kiwifruits under low temperature stress. *Acta Hort. Sin.* **2017**, *44*, 279–287, doi:10.16420/j.issn.0513-353x.2016-0451.
15. Jin, P.; Zhu, H.; Wang, L.; Shan, T.; Zheng, Y. Oxalic acid alleviates chilling injury in peach fruit by regulating energy metabolism and fatty acid contents. *Food Chem.* **2014**, *161*, 87–93, doi:10.1016/j.foodchem.2014.03.103.
16. Wang, Z.; Cao, J.; Jiang, W. Changes in sugar metabolism caused by exogenous oxalic acid related to chilling tolerance of apricot fruit. *Postharvest Biol. Technol.* **2016**, *114*, 10–16, doi:10.1016/j.postharvbio.2015.11.015.
17. Wang, Q.; Lai, T.; Qin, G.; Tian, S. Response of Jujube Fruits to Exogenous Oxalic Acid Treatment Based on Proteomic Analysis. *Plant Cell Physiol.* **2008**, *50*, 230–242, doi:10.1093/pcp/pcn191.
18. Deng, J.; Bi, Y.; Zhang, Z.; Xie, D.; Ge, Y.; Li, W.; Wang, J.; Wang, Y. Postharvest oxalic acid treatment induces resistance against pink rot by priming in muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruit. *Postharvest Biol. Technol.* **2015**, *106*, 53–61, doi:10.1016/j.postharvbio.2015.04.005.
19. Martínez-Esplá, A.; Zapata, P.J.; Valero, D.; Martínez-Romero, D.; Díaz-Mula, H.M.; Serrano, M. Preharvest treatments with salicylates enhance nutrient and antioxidant compounds in plum at harvest and after storage. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, *98*, 2742–2750, doi:10.1002/jsfa.8770.
20. Serna-Escolano, V.; Martínez-Romero, D.; Giménez, M.J.; Serrano, M.; García-Martínez, S.; Valero, D.; Valverde, J.M.; Zapata, P.J. Enhancing antioxidant systems by preharvest treatments with methyl jasmonate and salicylic acid leads to maintain lemon quality during cold storage. *Food Chem.* **2021**, *338*, 128044, doi:10.1016/j.foodchem.2020.128044.
21. Serna-Escolano, V.; Valverde, J.M.; García-Pastor, M.E.; Valero, D.; Castillo, S.; Guillén, F.; Martínez-Romero, D.; Zapata, P.J.; Serrano, M. Pre-harvest methyl jasmonate treatments increase antioxidant systems in lemon fruit without affecting yield or other fruit quality parameters. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 5035–5043, doi:10.1002/jsfa.9746.
22. Martínez-Esplá, A.; Serrano, M.; Martínez-Romero, D.; Valero, D.; Zapata, P.J. Oxalic acid preharvest treatment increases antioxidant systems and improves plum quality at harvest and during postharvest storage. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 235–243, doi:10.1002/jsfa.9165.
23. Razzaq, K.; Khan, A.S.; Malik, A.U.; Shahid, M.; Ullah, S. Effect of oxalic acid application on Samar Bahisht Chaunsa mango during ripening and postharvest. *LWT* **2015**, *63*, 152–160, doi:10.1016/j.lwt.2015.03.069.



24. Martínez-Esplá, A.; García-Pastor, M.E.; Zapata, P.J.; Guillen, F.; Serrano, M.; Valero, D.; Gironés-Vilaplana, A. Preharvest application of oxalic acid improves quality and phytochemical content of artichoke (*Cynara scolymus* L.) at harvest and during storage. *Food Chem.* **2017**, *230*, 343–349, doi:10.1016/j.foodchem.2017.03.051.
25. Barberis, A.; Cefola, M.; Pace, B.; Azara, E.; Spissu, Y.; Serra, P.A.; Logrieco, A.F.; D'Hallewin, G.; Fadda, A. Postharvest application of oxalic acid to preserve overall appearance and nutritional quality of fresh-cut green and purple asparagus during cold storage: A combined electrochemical and mass-spectrometry analysis approach. *Postharvest Biol. Technol.* **2019**, *148*, 158–167, doi:10.1016/j.postharvbio.2018.10.016.
26. Serna-Escolano, V.; Serrano, M.; Valero, D.; Rodríguez-López, M.I.; Gabaldón, J.A.; Castillo, S.; Valverde, J.M.; Zapata, P.J.; Guillén, F.; Martínez-Romero, D. Thymol Encapsulated into HP- $\beta$ -Cyclodextrin as an Alternative to Synthetic Fungicides to Induce Lemon Resistance Against Sour Rot Decay. *Molecules* **2020**, *25*, 4348, doi:10.3390/molecules25184348.
27. Kvaratskhelia, M.; Winkel, C.; Thorneley, R.; Wenzl, P.; Patiño, G.M.; Chaves, A.L.; Mayer, J.E.; Rao, I.M. Purification and Characterization of a Novel Class III Peroxidase Isoenzyme from Tea Leaves. *Plant Physiol.* **1997**, *114*, 1237–1245, doi:10.1104/pp.114.4.1237.
28. Fawole, O.A.; Opara, U.L. Effects of maturity status on biochemical content, polyphenol composition and antioxidant capacity of pomegranate fruit arils (cv. 'Bhagwa'). *S. Afr. J. Bot.* **2013**, *85*, 23–31, doi:10.1016/j.sajb.2012.11.010.
29. Zheng, X.; Jing, G.; Liu, Y.; Jiang, T.; Jiang, Y.; Li, J. Expression of expansin gene, MiExpA1, and activity of galactosidase and polygalacturonase in mango fruit as affected by oxalic acid during storage at room temperature. *Food Chem.* **2012**, *132*, 849–854, doi:10.1016/j.foodchem.2011.11.049.
30. Sayyari, M.; Valero, D.; Babalar, M.; Kalantari, S.; Zapata, P.J.; Serrano, M. Prestorage Oxalic Acid Treatment Maintained Visual Quality, Bioactive Compounds, and Antioxidant Potential of Pomegranate after Long-Term Storage at 2 °C. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 6804–6808, doi:10.1021/jf100196h.
31. Li, T.; Shi, D.; Wu, Q.; Yin, C.; Li, F.; Shan, Y.; Duan, X.; Jiang, Y. Mechanism of Cell Wall Polysaccharides Modification in Harvested 'Shatangju' Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) Fruit Caused by *Penicillium italicum*. *Biomolecules* **2019**, *9*, 160, doi:10.3390/biom9040160.
32. Ballester, A.-R.; Lafuente, M.T.; González-Candelas, L. Citrus phenylpropanoids and defence against pathogens. Part II: Gene expression and metabolite accumulation in the response of fruits to *Penicillium digitatum* infection. *Food Chem.* **2013**, *136*, 285–291, doi:10.1016/j.foodchem.2012.08.006.
33. Rojas, C.M.; Esenthil-Kumar, M.; Etzin, V.; Mysore, K.S. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 17, doi:10.3389/fpls.2014.00017.



34. Yun, Z.; Gao, H.; Liu, P.; Liu, S.; Luo, T.; Jin, S.; Xu, Q.; Xu, J.; Cheng, Y.; Deng, X. Comparative proteomic and metabolomic profiling of citrus fruit with enhancement of disease resistance by postharvest heat treatment. *BMC Plant Biol.* **2013**, *13*, 44, doi:10.1186/1471-2229-13-44.



---

**4.3. Effect of thymol and carvacrol encapsulated in HP- $\beta$ -Cyclodextrin by two inclusion methods against *Geotrichum citri-aurantii***

---

**Publicación 3 (Transcripción literal)**

**Effect of thymol and carvacrol encapsulated in HP- $\beta$ -Cyclodextrin by two inclusion methods against *Geotrichum citri-aurantii***

Vicente Serna-Escolano

María Serrano

Daniel Valero

María Isabel Rodríguez-López

José Antonio Gabaldón

Salvador Castillo

Fabián Guillén

Pedro Javier Zapata

Domingo Martínez-Romero

Journal of Food Science, 84 (6), 1513-1521, 2019

<https://doi.org/10.1111/1750-3841.14670>

**Effect of thymol and carvacrol encapsulated in HP- $\beta$ -Cyclodextrin by two inclusion methods against *Geotrichum citri-aurantii***

Vicente Serna-Escolano<sup>a</sup>, María Serrano<sup>b</sup>, Daniel Valero<sup>a</sup>, María Isabel Rodríguez-López<sup>c</sup>, José Antonio Gabaldón<sup>c</sup>, Salvador Castillo<sup>a</sup>, Fabián Guillén<sup>a</sup>, Pedro Javier Zapata<sup>a</sup>, Domingo Martínez-Romero<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Food Technology, University Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3.2, 03312, Orihuela, Alicante, Spain

<sup>b</sup>Department of Applied Biology, University Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3.2, 03312, Orihuela, Alicante, Spain

<sup>c</sup>Department of Food Technology and Nutrition. Universidad Católica San Antonio de Murcia (UCAM). Avenida de los Jerónimos s/n. 30107, Guadalupe. Murcia, Spain.

\*Corresponding author: Domingo Martínez-Romero. E-mail: [dmromero@umh.es](mailto:dmromero@umh.es)



## ABSTRACT

*Geotrichum citri-aurantii* causes sour rot in citrus fruits and is responsible for important economic losses during storage. However, the availability of chemical fungicides for the control of this pathogen is limited. Thus, the aim of this research was to evaluate the antifungal efficacy of thymol and carvacrol encapsulated in 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD) (prepared by the microwave irradiation method (MW) and solubility method (S)) for inhibition of *G. citri-aurantii* using *in vitro* bioassays broth (micro and macro dilutions methods) and inoculated food testing. Both encapsulated thymol and carvacrol were shown to be effective for inhibiting *G. citri-aurantii* growth in *in vitro* assays. Thymol was more effective in inhibiting *G. citri-aurantii*, while better encapsulation was provided by MW. HP- $\beta$ -CD-Thymol encapsulated by MW (HP- $\beta$ -CD-thymol-MW) showed the lowest 50% effective dose ( $ED_{50} = 1.16$  mM), minimum inhibitory concentration (MIC = 5.06 mM) and minimum fungicide concentration (MFC = 52.6 mM). HP- $\beta$ -CD-thymol-MW was found highly effective in reducing the growth rate (GR) and mycelial growth inhibition (MGI). Finally, HP- $\beta$ -CD-thymol-MW and HP- $\beta$ -CD-carvacrol-MW showed a higher persistent effect than thymol and carvacrol in their natural form in inhibiting this fungus. Therefore, HP- $\beta$ -CD-Thymol-MW could be a promising alternative to synthetic fungicides for controlling *G. citri-aurantii*, the causal agent of citrus sour rot.

**PRACTICAL APPLICATIONS:** Encapsulated thymol and carvacrol in HP- $\beta$ -Cyclodextrins are effective for controlling *G. citri-aurantii* in *in vitro* experiments. Encapsulation of thymol and carvacrol by microwave irradiation method (MW) was more effective than the solubility (S) method. Thymol was more effective than carvacrol, and the best results on *G. citri-aurantii* inhibition were achieved using the HP- $\beta$ -CD-thymol-MW method (which gave the lowest  $ED_{50}$ , MIC, and MFC).

**Keywords:** Citrus; Decay, Essential oils; Sour rot; Postharvest; Cyclodextrin

## 1. INTRODUCTION

Sour rot, caused by *Geotricum citri-aurantii*, can appear in many fruits and vegetables. Tomatoes, carrots, and citrus fruits are among the most affected ones. In fact, *G.citri-aurantii* plays an important role in the decay of citrus fruits during the post-harvest period, although it is less common than *Penicillium digitatum* and *P. italicum*. The decay is directly associated with mechanical damage on the fruit surfaces and high humidity during harvest, handling, and processing. The decay increases with fruit maturity (Ritenour, Zhang, Cano, & Dewdney, 2017). Currently, the use of many of the effective fungicides against this pathogen is limited by legislation. For example, guazatine is one of the most effective fungicides against sour rot. However, its use has been limited or banned (McKay, Förster, & Adaskaveg, 2012) since 2011 in the European Union. Nowadays, propiconazole and o-phenylphenate are the most widely used fungicides with a positive effect against *G. citri-aurantii* (McKay et al., 2012). However, o-phenylphenate has some negative effects on the fruit peel. For propiconazole, although its use is not yet officially forbidden, there is a lot of controversy because the European Union is considering it as a potentially carcinogenic compound and its use is being questioned (ECHA, 2015). On the other hand, other conventional chemicals used to control postharvest phytopathogenic fungi, such as imazalil and thiabendazole, are not effective for inhibiting sour rot.

Therefore, recent researches are focused on finding promising alternatives to synthetic fungicides for sour rot control. It has been proved that the fungus responsible for this decay can be controlled by sanitation, appropriate cold storage, use of antagonist yeast (Liu et al., 2010), lactic acid bacteria and their metabolites (Gerez, Carbajo, Rollán, Torres Leal, & Font de Valdez, 2010), or treatment with organic or inorganic salts, such as potassium sorbate or sodium bicarbonate combined with heat (Smilanick, Mansour, Gabler, & Sorenson, 2008). However, these treatments are not totally effective for reducing sour rot infection. Thus, it is necessary to look for new effective alternatives against sour rot that comply with the environmental, health, and legal requirements.

Some essential oils (EOs) have shown antimicrobial effects against some postharvest pathogens using *in vitro* and *in vivo* test (Bouchra, Mohamed, Mina, & Hmamouchi, 2003). In fact, thymol and carvacrol, either obtained from plant extracts or chemically synthesized, have been used to reduce decay caused by *P. digitatum* and *P. italicum* in lemon fruit (Castillo et al., 2014; Pérez-Alfonso et al., 2012), and to control sour rot caused by *G. citri-aurantii* in orange and lemon fruits (Xu et al., 2012; Regnier, Combrinck, Veldman, & Du Plooy, 2014; Wuryatmo, Able, Ford, & Scott, 2014; Boubaker et al., 2016). It has been observed that EOs from thyme and oregano applied to lemon fruit at concentrations above 1000  $\mu\text{L/L}$  prevented arthroconidiale spore germination and mycelial growth of *G. citri-aurantii* (Regnier et al., 2014).

However, the use of EOs to control fruit decay during storage is limited, since they are unstable under high temperature,  $\text{O}_2$ , and light. They have low water solubility, which decreases the homogeneity of treatments. They can cause fruit skin phytotoxicity, and impact negatively on fruit flavor, taste and aroma (Lazar, Jobling, & Benkeblia, 2010; Navarro et al., 2011). These problems could be solved by using microencapsulation or complexation techniques. Microencapsulation is a packaging technique that uses cyclic oligosaccharides derived from starch (CDs) to encapsulate a particular compound. The native CDs are oligomers formed by 6, 7 or 8 units of glucose linked by  $\alpha$ -(1,4) bonds for the  $\alpha$ -CDs,  $\beta$ -CDs. and  $\gamma$ -CDs, respectively. They are non-toxic substances for humans, absorbed by the digestive system and considered as GRAS (Generally Recognized as Safe). These complexes can release their contents at a controlled rate for long periods of time, to protect the encapsulated compounds from degradation and to improve their water solubility (Cabral Marques, 2010; Abarca, Rodríguez, Guarda, Galotto, & Bruna, 2016; Serrano-Martínez et al., 2016). Modified CDs, such as 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD), have been made from native CDs and have improved water solubility, longer durability, satisfactory inclusion ability and are well-tolerated by human compared to the native CDs (Gould & Scott, 2005). The inclusion of compounds into CDs can spontaneously occur through the union between the CDs and the guest molecules (Pérez-Abril et al., 2017). The final concentration of the included compound may differ depending on the inclusion method applied (Cabral Marques, 2010).

The effect of thymol incorporated into  $\beta$ -CDs through solubility inclusion methods against *G. citri-aurantii* has been evaluated in a previous paper (Dou, Ouyang, You, Qian, & Tao, 2018). The present study attempts to use microwave radiation to incorporate thymol and carvacrol into a modified cyclodextrin. The antifungal effect of encapsulated thymol and carvacrol against *G. citri-aurantii* was evaluated.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Chemicals and inclusion complex

Thymol and carvacrol (99 % purity) were purchased from Sigma (Madrid, Spain). The HP- $\beta$ -CDs were provided by AraChem (Eindhoven, Holland). The complexation process of both monoterpenes in HP- $\beta$ -CDs were carried out by using microway (MW) and solubility (S) encapsulation methods (Hernández-Sánchez, et al., 2017; Rodríguez-López et al., 2018). Finally, the HP- $\beta$ -CD-thymol-MW, HP- $\beta$ -CD-thymol-S, HP- $\beta$ -CD-carvacrol-MW and HP- $\beta$ -CD-carvacrol-S solid complexes were obtained by spray drying (Hernández-Sánchez, et al., 2017). Both inclusion methods form 1:1 molar ratio complexes with HP- $\beta$ -CDs and thymol or carvacrol (Kfoury, Auezova, Fourmentin, & Greige-Gerges, 2014). The entrapment efficiency (EE), with respect to the theoretical amount of the monoterpenes present in the inclusion complex after atomizing (see Table 1), was determined in each case as follow:

**Table 1.** Entrapment efficiency (EE) of thymol and carvacrol complexes in 50 mM of HP- $\beta$ -CDs prepared by solubility method (S) and (MW) method. Data are the mean  $\pm$  SE of triplicate determination. Different lowercase letters (a, b) within each row show significantly differences between thymol and carvacrol complexes at  $P < 0.05$  level. Different capital letters (A, B) within each column show significantly differences between encapsulation method at  $P < 0.05$  level.

	HP- $\beta$ -CDs	EE (g/100g) MW	EE (g/100g) S
Thymol	50 mM	82.8 $\pm$ 0.6 aA	82.1 $\pm$ 0.4 aA
Carvacrol	50 mM	66.3 $\pm$ 0.3 bA	64.5 $\pm$ 0.3 bB

**EE**= (amount of active compound entrapped / initial active compound amount) × 100

The concentration of thymol or carvacrol in dehydrated complexes was measured on solid complexes after atomization. HP-β-CD-thymol or HP-β-CD-carvacrol were diluted in ethanol (complex:ethanol, 20:80, v:v) for 24 h. HP-β-CDs were removed from the solution, leaving only the active compound. The quantification of HP-β-CD-thymol or HP-β-CD-carvacrol complexes was carried out in triplicate by GC-MS analysis in a Shimadzu GC-QP 2010 (Kyoto, Japan) according to Rodríguez-López et al., (2018).

## **2.2. Isolation of *G. citri-aurantii*, identification and inoculum preparation**

Pure cultures of *G. citri-aurantii* were recovered from *Citrus limon* (L.) Burm f. cv Fino-95 fruits (Alicante-Spain) showing sour rot symptoms, and cultured on PDA medium at 25°C during 1 week. The *G. citri-aurantii* strains were collected from the agar plate with a 4 mL of 0.05% Tween 20 solution and grown in liquid potato-dextrose medium for 5 days in agitation and darkness, achieving an adequate concentration of mycelium. After that period of time, the culture medium was centrifuged at 10,000 rpm and 4°C for 15 min, in order to separate fungus cells from liquid culture medium. The cell pellet was lyophilized for 24 hours and used for the following determinations.

The total DNA extraction was made from the previous lyophilized cell pellet, using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) commercial kit. The quality and quantity of DNA were evaluated by agarose gel electrophoresis and NanoDrop™ One/One<sup>c</sup> (ThermoFisher Scientific). Three internal transcriber spacer (ITS) region primers were used to limit the region of rDNA to be amplified by polymerase chain reaction (PCR) as described by White, Bruns, Lee, & Taylor, (1990). The first primer combination was ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') + ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3) and the second one was ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') + ITS4. Finally, one of the bands was analyzed with GENTle software (Cologne, Germany) and compared with sequences obtained in the genetic sequence database GenBank® by using the alignment tool (BLAST) provided by the National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, Maryland, USA).



Phylogenetic relationships and phylogenetic tree were made using Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Mega7) software (Pennsylvania State University) by using the CLUSTALW analysis that incorporates the software itself.

### **2.3. Suspension of arthrospores**

Fresh suspension of spores was obtained according to Lichter et al., (2003). Pure fungal cultures, in potato-dextrose agar medium plates with 6 days of incubation, were suspended with sterile distilled water and detergent (0.05% Tween 20). Next, a hemacytometer was used to adjust the arthrospores concentration to  $10^5$ - $10^6$  spores/mL, and inoculum was used in each one of the *in vitro* bioassay.

### **2.4. *in vitro* Bioassays**

#### **2.4.1. Broth micro-dilution methods**

The effect of each HP- $\beta$ -CDs-thymol and HP- $\beta$ -CDs-carvacrol complexes on the growth of *G. citri-aurantii* was analyzed in 96-well microtiter plates. The concentrations of thymol and carvacrol in HP- $\beta$ -CDs were 0, 2.5, 5, 12, 25 and 50 mM in PDA medium containing  $10^5$  CFU/well of *G. citri-aurantii* spores. The microplates were incubated at 25 °C for 96 hours. Every 24 hours, the absorbance at 600 nm of each well was measured with a Microplate Manager 4.0 (Bio-Rad Laboratories). Wells for each thymol and carvacrol concentration encapsulation in HP- $\beta$ -CDs without fungus spores were used as blank control and wells with  $10^5$  CFU/well without thymol and carvacrol encapsulated in HP- $\beta$ -CDs were used as negative control.

The MIC (fungistatic concentration) and ED<sub>50</sub> (ecological dose) were determined as follow. MIC (minimum inhibitory concentration) was defined as the lowest concentration of thymol or carvacrol encapsulated in HP- $\beta$ -CDs at which the growth of microorganisms is inhibited by 90%. ED<sub>50</sub> was defined as the necessary concentration of thymol or carvacrol encapsulated in HP- $\beta$ -CDs to reduce fungal growth by 50%. ED<sub>50</sub> and MIC were calculated by linear regression between the relative growth at 48 h of incubation versus the logarithm of complex concentration. This experiment was performed in triplicate

for each concentration of thymol or carvacrol encapsulated in HP- $\beta$ -CDs with both inclusion methods. Results were expressed as the absorbance increments at 600 nm ( $\Delta A_{600}$ ) of inoculates with respect to blank control wells.

#### **2.4.2. Broth macro-dilution method**

Three mL of PDA were dispensed in tubes of 5 mL containing the same concentration of thymol or carvacrol encapsulated in HP- $\beta$ -CDs as in micro-dilution method described above (0, 2.5, 5, 12, 25 and 50 mM) and  $10^5$  spores/mL of *G. citri-aurantii*. The tubes were incubated at 25 °C for 0, 24 and 48 hours. At each of these incubation times, an aliquot of each tube was taken to make a dilution bank from  $10^{-1}$  to  $10^{-4}$ . These dilutions were sown on Petri-film plates for molds and yeasts (3M) which were incubated at 25° C for 72 hours. The colony forming units (CFUs) were counted every 24 hours. The controls consisted of PDA without HP- $\beta$ -CDs-thymol or HP- $\beta$ -CDs-carvacrol. The lowest concentration of the complexes which showed no fungal growth or at which the incubated microorganisms were killed at 99.9% was assigned as the minimum fungicide concentration (MFC). A 3-log decrease in viable *G. citri-aurantii* relative to the initial inoculum that was maintained at 24 and 48 h was considered indicative of fungicidal activity. This experiment was performed in triplicate for each concentration of thymol or carvacrol encapsulated in HP- $\beta$ -CDs and inclusion method. Results were expressed as linear regressions of CFUs/mL (mean  $\pm$  SE at 48 h of incubation).

#### **2.4.3. Poisoned food method**

The bioassay about the effect of thymol and carvacrol encapsulated in HP- $\beta$ -CDs by S and MW methods on *G. citri-aurantii* growth rate (GR) was performed in Petri plates (90 mm x 20 mm). HP- $\beta$ -CDs containing thymol or carvacrol were homogenized at 45-50°C with previously sterilized Potato Dextrose Agar (PDA) growth medium to obtain final concentrations of 0, 1.5, 3, 6, 12 and 30 mM of thymol or carvacrol. In addition, similar concentrations of no-encapsulated thymol or carvacrol were also used.

Previously, one milliliter of the *G. citri-aurantii* stock was cultured on 20 PDA plates for 6 days at 25 °C to obtain a homogenous mycelium on the plate

surface. From these plates, 6-mm agar discs were taken and placed in the center of each of the above described plates. Plates were incubated in the dark at 25 °C for 6 days. The diameter of the fungal disc was measured every 24 hours in two perpendicular directions and the growth rate (GR) was expressed as increment of fungal disc diameter per hour (mm/h). The controls consisted of PDA without encapsulated thymol or carvacrol. Semilogarithmic equations of GR vs HP-β-CDs-thymol or HP-β-CDs-carvacrol complexes concentration (mM) was calculated for thymol and carvacrol and inclusion method. The thymol and carvacrol concentration of encapsulated necessary to reduce the mycelial growth rate of *G. citri-aurantii* by 90% (CRGR) were calculated using semilogarithmic equations. The mycelial growth inhibition (MGI) of *G. citri-aurantii* was calculated every day of incubation by using the following equation:

$$\text{MGI}(\%) = (\text{DC} - \text{DO}) / \text{DC} \times 100$$

where DC is the fungal disc diameters in the control plates and DO is the fungal disc diameters in the plates containing the HP-β-CDs-thymol and HP-β-CDs-carvacrol complexes. Data are the mean ± SE of 20 Petri plates from 48 to 144 h of incubation.

## 2.5. Statistical analysis

Duncan's multiple range test were applied to compare all means at a 5% level of confidence following one-way analysis of variance. Statistical correlations were performed by logarithmic regressions of the measured parameters against the concentrations of the HP-β-CDs-thymol and HP-β-CDs-carvacrol complexes. The fit of the equation was evaluated by the determination of  $r^2$  coefficient.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. Identification of the pathogenic fungus

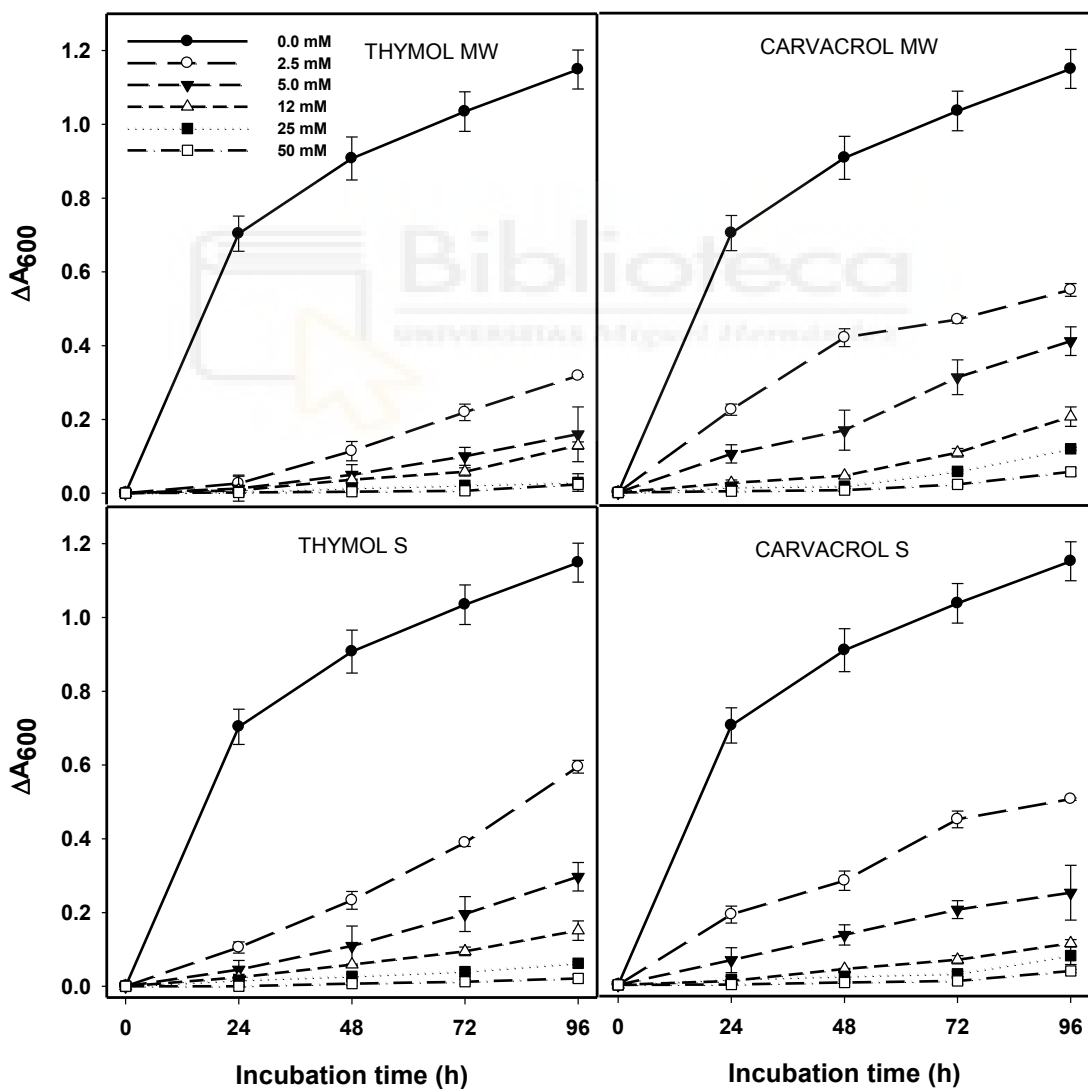
According to the observed morphological characteristics of the 8-day-old colony isolate, such as the septate and hyaline mycelium, prolific growth and presence of arthrospores, the fungus was identified as *Geotrichum* spp. (Gente, Sohier, Coton, Duhamel, & Guégben, 2006; Gerez et al., 2010; Nazerian &

Alian, 2013). The size of both DNA amplified fragments by PCR was under 400 bp (Supplementary Figure 1). The region isolated using the primers, ITS1 and ITS4, was smaller (335 bp) than that obtained using the primers, ITS5 and ITS4 (360bp) according to White, Bruns, Lee, & Taylor, (1990). The sequences of the biggest amplified fragments showed a similarity of 99% and 97% for the primer combination ITS5 + ITS4 and ITS1 + ITS4, respectively, compared with the sequence of the *G. citri-aurantii* strain from GenBank accession number EU131181.1 (Supplementary Figure 2). According to the phylogenetic tree, the analyzed sequences have a very high probability index with the accession number EU131181.1 followed by MH561742.1, JQ425851.1 and JQ425848.1, all of them corresponding to *G. citri-aurantii*. However, the sequences analyzed were phylogenetically separated from the rest of the accessions corresponding to fungi that cause citrus fruit rot, such as *P. italicum*, *P. digitatum*, *Colletrechum gloesporioides*, *Alternaria alternate* and *Phytophthora* sp. (Supplementary Figure 3). Thus, this fungus species isolated from decayed lemon was identified as *G. citri-aurantii*, which is the causal agent of the sour rot of lemon. In fact, the initial inoculum was obtained from lemons showing signs and symptoms typical of sour rot lesions, such as soft rot (with initial changes in the color of the flavedo), collapse of the albedo, and fermentation odor.

### 3.2. *in vitro* Bioassays

Absorbance increments ( $\Delta A_{600}$ ) of the broth micro-dilution method with *G. citri-aurantii* inoculum with 2.5, 5, 12, 25 and 50 mM of thymol and carvacrol encapsulated in HP- $\beta$ -CDs- by S and MW methods increased exponentially during the incubation time (Figure 1). Growth of *G. citri-aurantii* in the negative control (medium without HP- $\beta$ -CDs-thymol and HP- $\beta$ -CDs-carvacrol complexes) showed an absorbance increase of  $0.91 \pm 0.05$  at 48 h incubation while this increase was  $\sim 0$  in non-inoculated wells. For both MW and S inclusion methods, the increase in essential oil concentrations led to lower absorbance increases, showing the exponential effect of the thymol and carvacrol encapsulated in HP- $\beta$ -CDs on inhibiting fungal development at each incubation time (data not shown). The MW inclusion method was significantly more effective ( $P < 0.05$ ) than the S method and thymol oil was significantly more effective ( $P < 0.05$ ) than carvacrol against *G. citri-aurantii* (Figure 1). For

example, thymol encapsulated by MW method at 25 mM showed the lowest increases in absorbance  $< 0.03$  at 96 h of incubation. However, the increase in absorbance for thymol 25 mM encapsulated by S method was  $0.063 \pm 0.004$  at 96 h while for carvacrol 25 mM the increase was  $0.119 \pm 0.004$  and  $0.090 \pm 0.024$  for the MW and S inclusion methods, respectively, at the same 96 h of incubation. Different papers have shown that non-encapsulated carvacrol or thymol (or both) inhibit the germination of conidia and/or the mycelial growth of different postharvest pathogens (Lambert, Skandamis, Coote, & Nychas, 2001; Vardar-Ünlü et al., 2003; Martínez-Romero et al., 2007; Numpaque, Oviedo, Gil, García, & Durango, 2011; Pérez-Alfonso et al., 2012; Regnier et al., 2014).



**Figure 1.** Increases in absorbance at 600 nm ( $\Delta A_{600}$ ) for 96 h incubation of the microtiter plates containing *G. citri-aurantii* with several concentrations of HP- $\beta$ -

CDs-thymol or HP- $\beta$ -CDs-carvacrol encapsulated by MW and S inclusion methods. Data are the mean  $\pm$  SE.

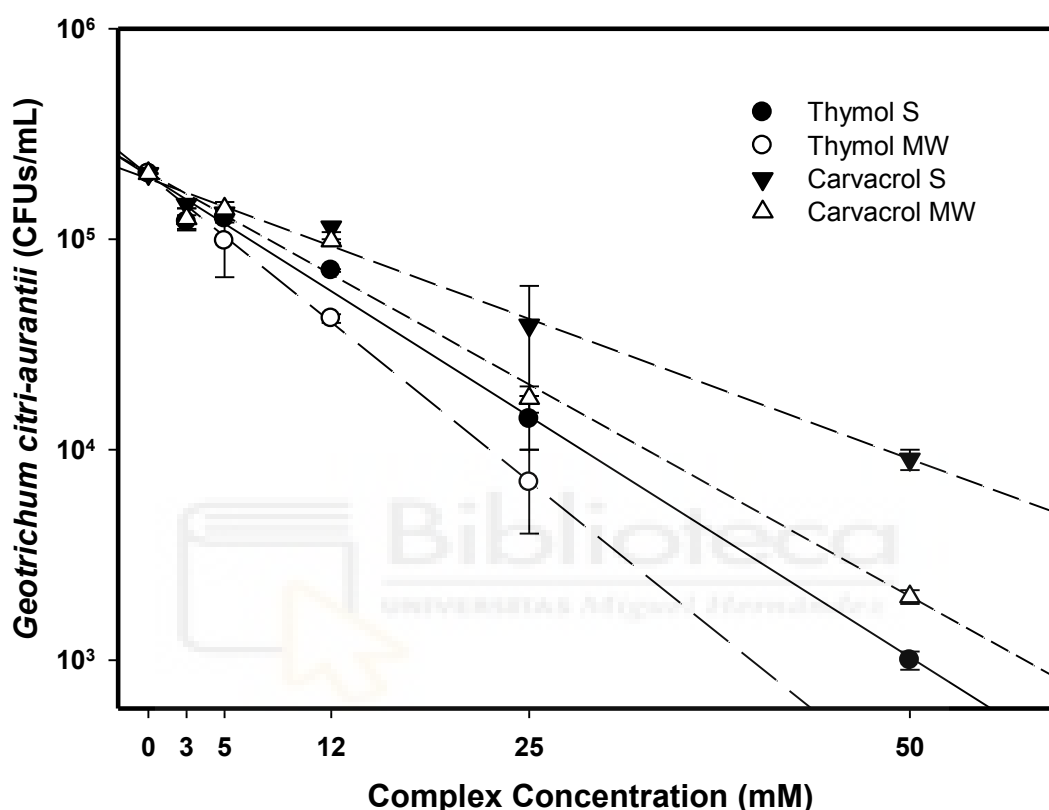
For instance, pure carvacrol and thymol inhibited *P. digitatum* and *P. italicum* growth (Pérez-Alfonso et al., 2012) and thymol inhibited the growth of *G. citri-aurantii* (Liu et al., 2009). Different hypotheses have been formulated to explain the antifungal action of thymol and carvacrol, such as the deformation and deterioration of conidia and hyphae, as well as the rupture of the cellular structure of the fungus, mainly the cell wall and plasma membrane (Lambert et al., 2001). These effects have been attributed to the hydroxyl groups and the presence of a system of delocalized electrons on the monoterpenes thymol and carvacrol and other phenolic compounds (Ultee, Bennik, & Moezelaar, 2002). In addition, Ben Jabeur, Somai-Jemmali, & Hamada (2017) have shown that thymol has a role in specific genes associated with fungal development.

The fungistatic doses of complexes (ED<sub>50</sub> and MIC) (Table 2) were calculated from the data discussed above. The lowest ED<sub>50</sub> and MIC were 1.16 and 5.06 mM, respectively, for HP- $\beta$ -CDs-thymol encapsulated by MW, followed by thymol encapsulated by S, HP- $\beta$ -CDs-carvacrol encapsulated by MW and finally HP- $\beta$ -CDs-carvacrol encapsulated by S method.

**Table 2.** Effects of HP- $\beta$ -CDs-thymol or HP- $\beta$ -CDs-carvacrol inclusion complex by two methods, solubility (S) and microwave irradiation (MW), on *in-vitro* growth of *G. citri-aurantii*. ED<sub>50</sub>: 50% of effective dose; MIC: Minimum inhibitory concentration; MFC: Minimum fungicide concentration; CRGR\*: Complex concentration necessary to reduce the mycelial growth rate diameter of *G. citri-aurantii* by 90 %.

	HP- $\beta$ -CDs Complex Concentration (mM)			
	Thymol	Thymol	Carvacrol	Carvacrol
	S	MW	S	MW
ED <sub>50</sub>	2.07	1.16	2.40	2.29
MIC	9.47	5.06	14.06	11.66
MFC	67.7	52.6	115.6	76.7
CRGR*	5.5	5.0	8.1	7.2

The initial CFUs of *G. citri-aurantii* ( $\sim 10^5$  CFU) significantly ( $P < 0.05$ ) decreased with incubation time (0, 24 and 48 hours) and increased with doses of HP- $\beta$ -CDs-thymol and HP- $\beta$ -CDs-carvacrol complexes (data not shown). After 48 hours of incubation, the lowest CFUs were reached for each set (Figure 2).



**Figure 2.** Semilogarithmic regression between total counts (CFU mL<sup>-1</sup>) of *G. citri-aurantii* after 48 h incubation on liquid growth medium with several concentrations of HP- $\beta$ -CDs-thymol or HP- $\beta$ -CDs-carvacrol encapsulated by MW and S inclusion methods. Data are the mean  $\pm$  SE.

The prolonged and permanent fungicide effect of these complexes could be mainly due to the slow release of thymol and carvacrol from the HP- $\beta$ -CDs. As can be seen in Table 3, there was a negative dose-dependence between the concentration of thymol and carvacrol encapsulated in HP- $\beta$ -CDs complexes and the survivors of *G. citri-aurantii* after 48 hours of incubation. The fit of every semilogarithmic equation reached a high regression coefficient ( $r^2 > 0.98$ ). In addition, as can be seen in Figure 2 and Table 3, the semilogarithmic equations with the highest



slopes (b coefficient) were those whose complexes showed greater effectiveness against *G. citri-aurantii*. The equation slope for the HP-β-CDs-thymol-MW complex was the highest (-0,058), followed by HP-β-CDs-thymol-S (-0.046), HP-β-CDs-carvacrol-MW (-0.04) and lastly, the HP-β-CDs-carvacrol-S one (-0.026).

**Table 3.** Semilogarithmic equations ( $\log y = bx + \log bo$ ) of *G. citri-aurantii* colony (CFUs/mL) vs HP-β-CDs-thymol or HP-β-CDs-carvacrol complexes concentration (mM) and growth disc diameter rate (GR) (mm/h) vs HP-β-CDs-thymol or HP-β-CDs-carvacrol complexes concentrations (mM).

CFUs vs CDs Concentration	Thymol S	Thymol MW	Carvacrol S	Carvacrol MW
b <sub>0</sub>	5.302	5.304	5.286	5.315
b	-0.046	-0.058	-0.026	-0.040
r <sup>2</sup>	0.99	0.99	0.98	0.98

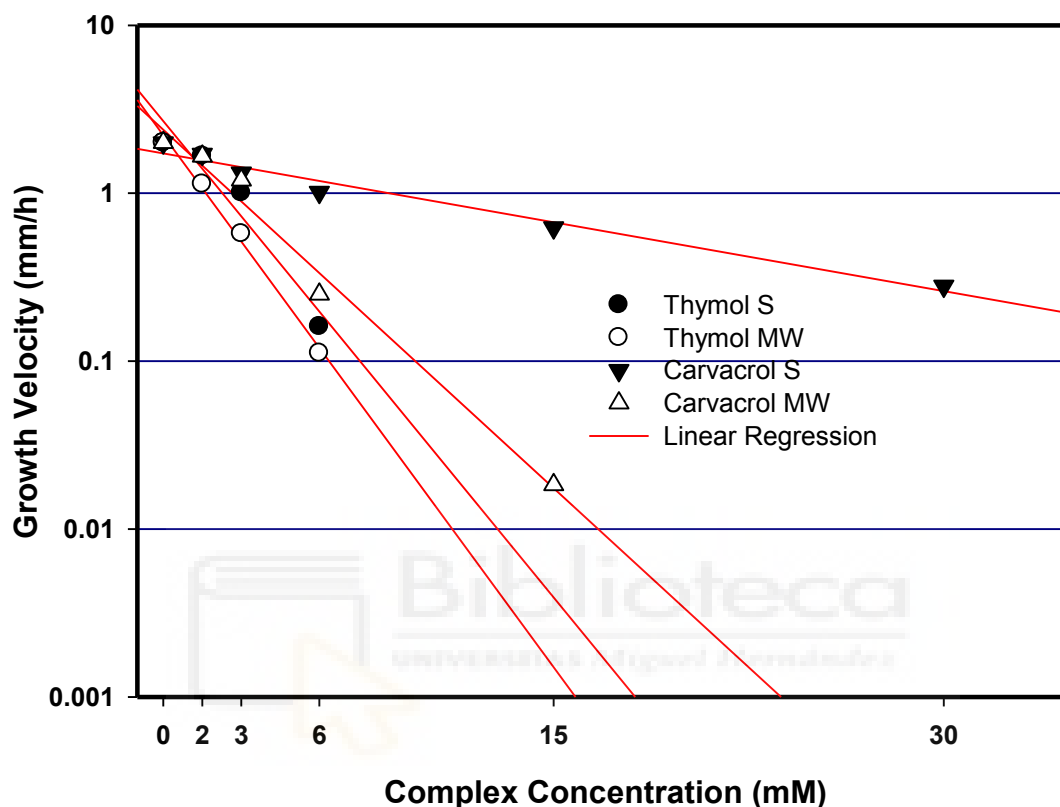
GR vs CDs Concentration	Thymol S	Thymol MW	Carvacrol S	Carvacrol MW
b <sub>0</sub>	0.423	0.344	0.225	0.377
b	-0.189	-0.211	-0.027	-0.142
r <sup>2</sup>	0.93	0.99	0.98	0.98

Minimum fungicide concentration (MFC) (Table 2) and the 3-log decrease in viable *G. citri-aurantii* of the initial inoculum were calculated based on the previous semilogarithmic equations (Table 3). The calculated fungicide doses were different for each of the tested complexes. The sequence of effectiveness of the HP-β-CDs-thymol and HP-β-CDs-carvacrol complexes were similar compared to that shown for fungistatic doses. The lowest MFC was for HP-β-CDs-thymol-MW (52.6 mM), followed by HP-β-CDs-thymol-S (67.7 mM), HP-β-CDs-carvacrol-MW (76.7 mM) and HP-β-CDs-carvacrol-S (115.6 mM).

Thymol and carvacrol applied as volatile phase vapor had strong antifungal activity against *G. candidum*, *Lasiodiplodia* spp., *Pestalotiopsis* spp., and *Phomopsis* spp. exhibiting MIC and MFC in the range of 40 to 80 mg/L (Suwanamornlert, Sangchote, Chinsirikul, Sane, & Chonhenchob, 2018).



However, when the essential oils from *Thymus* plant species are applied via direct contact (Boubaker et al., 2016), the MFC and MIC doses against *G. citri-aurantii* ranged from 500 to 4000  $\mu\text{L/L}$  which were similar to the doses of thymol and carvacrol used in the present experiment.



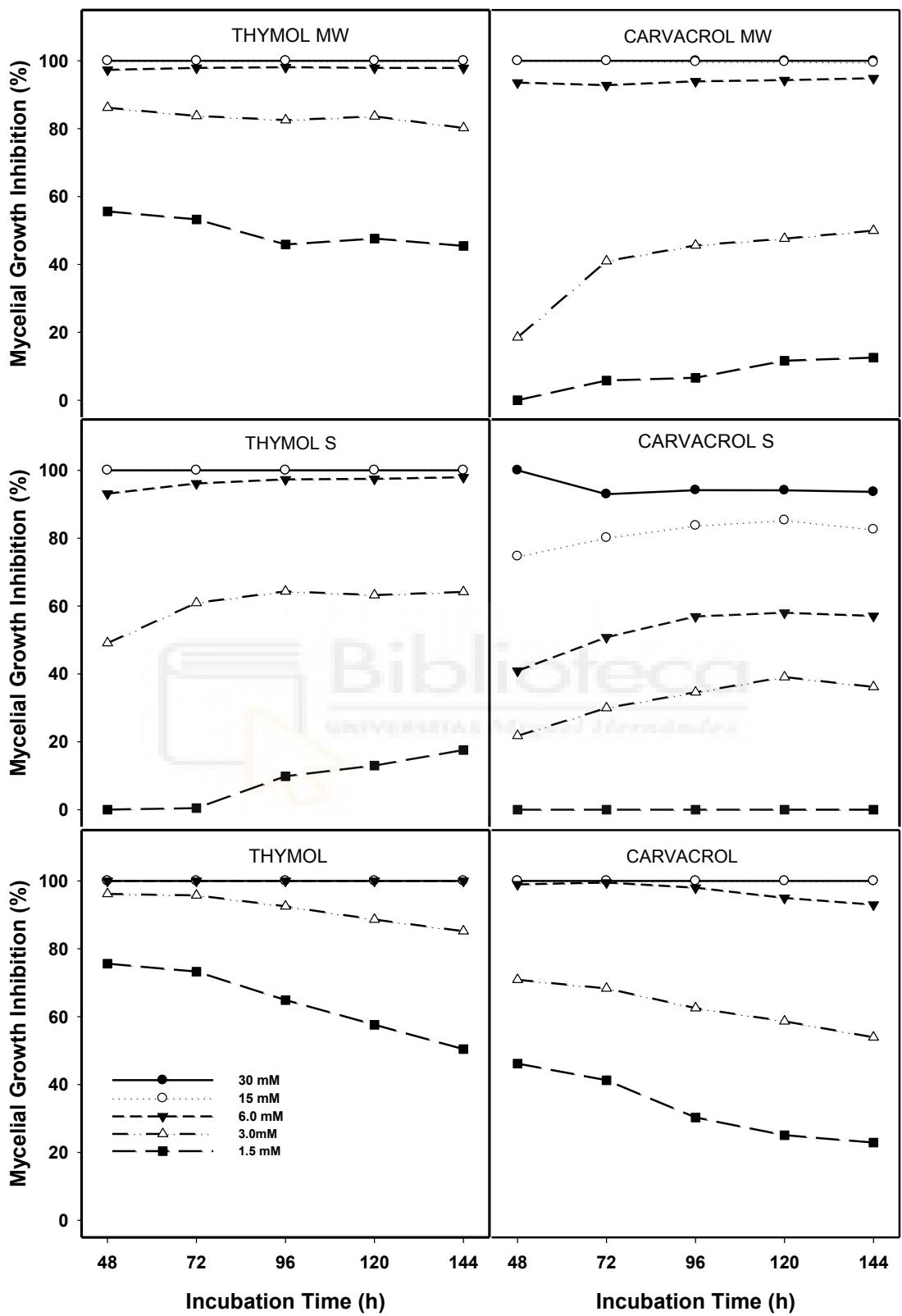
**Figure 3.** Semilogarithmic regression between mycelial growth rates ( $\text{mm h}^{-1}$ ) of *G. citri-aurantii* vs several concentrations of HP- $\beta$ -CDs-thymol or HP- $\beta$ -CDs-carvacrol encapsulated by MW and S inclusion methods. Data are the mean  $\pm$  SE.

In the last *in vitro* experiment using the poisoned food method, the effect of HP- $\beta$ -CDs-thymol and HP- $\beta$ -CDs-carvacrol complexes on *G. citri-aurantii* disk growth diameter was measured every 24 hours for 6 days. The addition of increased concentrations of thymol and carvacrol (encapsulated in HP- $\beta$ -CDs) to the PDA led to a significant reduction ( $P < 0.05$ ) in the growth of the fungus disc diameter (data not shown). It was noted that the diameter of fungus on HP- $\beta$ -CDs-carvacrol encapsulated by the S method was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than those of the discs in the plates containing the other HP- $\beta$ -CDs complexes. In fact, there was always fungus

growth for all tested concentrations of HP- $\beta$ -CDs-carvacrol encapsulated by S method. However, fungus growth was not observed for concentrations higher than 15 mM for HP- $\beta$ -CDs-carvacrol encapsulated by MW, and higher than 6 mM for HP- $\beta$ -CDs-thymol encapsulated by S and MW methods as can be inferred from Figure 4.

The GR was estimated for each fungus diameter measured every 24 h. The highest GR for the same complex concentrations were for HP- $\beta$ -CDs-carvacrol encapsulated by S method followed by HP- $\beta$ -CDs-carvacrol encapsulated by MW, and lastly for HP- $\beta$ -CDs-thymol encapsulated by the S and MW methods (Figure 3). As seen in Table 3, there was a negative dose-dependence between the concentration of HP- $\beta$ -CDs-thymol and HP- $\beta$ -CDs-carvacrol complexes and GR. The fit of every semilogarithmic equation reached a high regression coefficient ( $r^2 > 0.93$ ). In addition, as can be seen in Figure 3 and Table 3, the semilogarithmic equations with the largest slopes (b coefficient) were for the complexes that showed greater effectiveness against *G. citri-aurantii*. The equation slope for the HP- $\beta$ -CDs-thymol encapsulated by MW method was the highest (-0.211), followed by HP- $\beta$ -CDs-thymol encapsulated by S method (-0.189), HP- $\beta$ -CDs-carvacrol encapsulated by MW (-0.142) and lastly the HP- $\beta$ -CDs-carvacrol encapsulated by S (-0.027).

According to the semilogarithmic equations obtained, the lowest necessary complexes concentration to reduce the mycelial GR of *G. citri-aurantii* to 10% (Table 2) was 5 mM for HP- $\beta$ -CDs-thymol encapsulated by MW method and the highest was 8.1 mM for HP- $\beta$ -CDs-carvacrol encapsulated by S method.



**Figure 4.** Effects of different concentrations HP- $\beta$ -CDs-thymol or HP- $\beta$ -CDs-carvacrol encapsulated by MW and S inclusion methods on MGI (%) of *G. citri-aurantii* during 144 hours of incubation. Data are the mean  $\pm$  SE.

Globally, it was observed that MGI was greater as it increased the concentration of each pure oil and its complexes (Figure 4). In addition, the MGI of thymol and carvacrol were higher than HP- $\beta$ -CDs complexes. However, the MGI of thymol was always greater than carvacrol. The concentrations of thymol needed to reach 100% MGI of *G. citri-aurantii* are similar to those found by Dou et al. (2018). Similarly, some studies have shown that thymol MGI was greater than carvacrol MGI for *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum* (Castillo et al., 2014).

The MGI of the HP- $\beta$ -CDs-thymol and HP- $\beta$ -CDs-carvacrol complexes was constant during the incubation time with the highest doses, while with lower doses the MGI increased during the incubation of Petri plates (Figure 4). This is because CDs are capable of releasing their contents at a controlled rate for long periods of time while protecting the encapsulated compounds from degradation (Cabral-Marques, 2010; Abarca et al., 2016; Serrano-Martínez et al., 2016). Carvacrol, thymol, and eugenol are oxidized, decomposed or evaporated in normal ambience.  $\beta$ -CDs complex lead to an improvement of the molecular stability of essential oils, such as physical and chemical stability through the deceleration of volatility, oxidation, and heat-decomposition (Cabral-Marques, 2010).

The means of the MGI for all the incubation days for each of the complexes and concentrations used are recorded in Table 4, where grey shaded areas show a very high MGI (greater than 80%) and very low standards errors (less than 1). These results indicate high effectiveness and persistence of HP- $\beta$ -CDs- thymol-MW complex for doses  $> 3$  mM.

In the results, the MIC for HP- $\beta$ -CDs-thymol encapsulated by MW method was 5.06 mM, the MFC was 52.6 mM, and a 98% MCI was achieved with 6 mM ca. (Table 4), showing that thymol has significantly ( $P < 0.05$ ) more fungicide and fungistatic activities than carvacrol. As shown in Table 1, although both thymol and carvacrol complexes present the same molar ratio, they have significantly different ( $P < 0.05$ ) entrapment efficiencies, showing a

higher amount of active principle for thymol (close to 1.25 times higher in both cases) than for carvacrol. This explains the differences found in the antifungal activity.

**Table 4. Mycelial growth inhibition (MGI %) of *G. citri-aurantii* by HP- $\beta$ -CDs-thymol or HP- $\beta$ -CDs-carvacrol complexes applied at different concentration.** \* Concentration of CDs complexes showing MGI > 80%. Data are the mean  $\pm$  SE of 20 Petri plates from 48 to 144 incubation hours for each complex dose. Different letters within each column show significantly differences among HP- $\beta$ -CDs-thymol or HP- $\beta$ -CDs-carvacrol complexes at  $P < 0.05$  level.

CDs Complex Concentration (mM)	Thymol S	Thymol MW	Carvacrol S	Carvacrol MW
30	100 $\pm$ 0 A	100 $\pm$ 0 A	94.98 $\pm$ 1.26 B	100 $\pm$ 0 A
15	100 $\pm$ 0 A	100 $\pm$ 0 A	81.28 $\pm$ 1.84 C	99.79 $\pm$ 0.09 B
6	96.39 $\pm$ 0.86 B	97.83 $\pm$ 0.13 A	52.75 $\pm$ 3.20 D	93.89 $\pm$ 0.34 C
3	60.33 $\pm$ 2.86 B	83.25 $\pm$ 0.96 A	28.30 $\pm$ 5.43 D	40.53 $\pm$ 5.66 C
1.5	8.18 $\pm$ 3.45 B	51.57 $\pm$ 3.75 A	0 $\pm$ 0 C	6.11 $\pm$ 1.84 C
0	0 $\pm$ 0 A	0 $\pm$ 0 A	0 $\pm$ 0 A	0 $\pm$ 0 A

Similarly, Numpaque et al. (2011) also found that thymol had a greater antifungal effect than carvacrol against *Colleotrichum acutatum*. In fact, below the 15 mM dose, HP- $\beta$ -CDs-carvacrol, encapsulated by S method, showed low MGI and great variability (Table 4). These data are directly related to the MIC and MFC doses of each complex. Nevertheless, thymol was not always the most effective for inhibiting fungi spore germination. Thus, Martínez-Romero et al. (2007) showed that the antifungal activity of carvacrol was higher than thymol for inhibiting spore germination of *Botrytis cinerea* cultivated on PDA. Furthermore, Elshafie et al. (2015) showed that lower doses of carvacrol than thymol were necessary to control the growth of three *Monilinia* species.

Boubaker et al. (2016) used oils from different thyme species and found that MIC concentrations ranged from 500 to 4000  $\mu$ L/L and MFC from 1000 to

4000 for *G. citri-aurantii*. It is worth noting that the MIC and MFC values for each of the complexes used in this research were reached at lower concentrations. For example, for HP- $\beta$ -CDs-Carvacrol, encapsulated by S method, MIC and MFC concentrations were 83 and 8620  $\mu$ L/L, respectively. However, results from other studies (Martínez-Romero et al., 2007; Castillo et al., 2014) indicate that when essential oils, thymol or carvacrol are used, their persistence is lower than those reported in the present research, where thymol and carvacrol were encapsulated.

#### **4. CONCLUSION**

Thymol encapsulated in HP- $\beta$ -CDs was significantly more effective than carvacrol ( $P < 0.05$ ) against *G. citri-aurantii*. Moreover, MW inclusion method was significantly ( $P < 0.05$ ) more effective than the S method for allowing the slow release of thymol and carvacrol and increasing the fungal growth inhibition during the incubation time. Thus, the encapsulation of thymol into HP- $\beta$ -CDs by MW method could be a useful tool to be applied to reduce sour rot in citrus fruits during storage. However, its application towards reducing other fungus species responsible for lemon fruit decay, such as *P. italicum* and *P. digitatum*, deserves further research.

## REFERENCES

- Abarca, R.L., Rodríguez, F.J., Guarda, A., Galotto, M.J. & Bruna, J.E. (2016). Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. *Food Chemistry*, 196, 968-975. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.023>.
- Arras, G. & Usai, M. (2001). Fungitoxic activity of 12 essential oils against four post-harvest citrus pathogens: chemical analysis of *Thymus capitatus* essential oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. *Journal of Food Protection*, 67, 1025-1029. <http://doi.org/10.4315/0362-028X-64.7.1025>.
- Ben Jabeur, M., Somai-Jemmali, L. & Hamada, W. (2017). Thyme essential oil as an alternative mechanism: biofungicide-causing sensitivity of *Mycosphaerella graminicola*. *Journal of Applied Microbiology*, 122, 932-939. <http://doi.org/10.1111/jam.13408>.
- Bouchra, C. Mohamed, A., Mina, I.H. & Hmamouchi, M. (2003). Antifungal activity of essential oils from several medicinal plants against four postharvest citrus pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 42, 251-256. [http://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-1711](http://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1711).
- Boubaker, H., Karim, H., El Hamdaoui, A., Msanda, F., Leach, D., Bombarda, I., Vanloot, P., Abbad, A., Boudyach, E.H. & Ait Ben Aoumar, A. (2016). Chemical characterization and antifungal activities of four *Thymus* species essential oils against postharvest fungal pathogens of citrus. *Industrial Crops and Products*, 86, 95-101. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.036>.
- Cabral-Marques H.M. (2010). A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*, 25, 313-326. <https://doi.org/10.1002/ffj.2019>.
- Castillo, S., Pérez-Alfonso, C.O., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Serrano, M. & Valero, D. (2014). The essential oils thymol and carvacrol applied in the packing lines avoid lemon spoilage and maintain quality during storage. *Food Control*, 35, 132-136. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.052>.
- Dou, S., Ouyang, Q., You, K., Qian, J. & Tao, T. (2018). An inclusion complex of thymol into  $\beta$ -cyclodextrin and its antifungal activity against *Geotrichum citri-aurantii*. *Postharvest Biology and Technology*, 138, 31-36. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.12.011>.
- ECHA. (2015). Proposal for Harmonised Classification and Labelling Substance Name: Propiconazole. [https://echa.europa.eu/documents/10162/13626/clh\\_report\\_propiconazole\\_en.pdf](https://echa.europa.eu/documents/10162/13626/clh_report_propiconazole_en.pdf). Accessed September 2018.
- 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, 929-934. <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.0167>
- Gente, S., Sohier, D., Coton, E., Duhamel, C. & Guéguen, M. (2006). Identification of *Geotrichum candidum* at species and strain level: proposition of a standardized protocol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 1019-1031. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0130-3>.

- Gerez, C.L., Carbajo, M.S., Rollán, G., Torres Leal, G. & Font de Valdez, G. (2010). Inhibition of citrus fungal pathogens by using lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*. 75:354-359. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01671.x>
- Gould, S. & Scott, R.C. (2005). 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin HP-beta-CD: a toxicology review. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 1451-1459. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.03.007>.
- Hernández-Sánchez, P., López-Miranda, S., Guardiola, L., Serrano-Martínez, A., Gabaldón, J.A. & Nuñez-Delicado, E. (2017). Optimization of a method for preparing solid complexes of essential clove oil with  $\beta$ -cyclodextrins. *J. Sci. Food Agric*. 97, 420-426. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 420-426. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7781>.
- Kfoury, M., Auezova, L., Fourmentin, S. & Greige-Gerges, H. (2014). Investigation of monoterpenes complexation with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 80, 51-60. <https://doi.org/10.1007/s10847-014-0385-7>.
- Lambert, R.J., Skandamis, P.N., Coote, P.J. & Nychas, G.J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453-62. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>.
- Lazar, E.E., Jobling, J.J. & Benkeblia, N. (2010). Postharvest disease management of horticultural produce using essential oils: today's prospects. *Stewart Postharvest Review*, 6, 1-10. <https://doi.org/10.2212/spr.2010.3.15>.
- Lichter, A., Zhou, H.-W., Vaknin, M., Dvir, O., Zutchi, Y., Kaplunov, T. & Lurie, S. (2003). Survival and responses of *Botrytis cinerea* after exposure to ethanol and heat. *Journal of Phytopathology*, 151, 553-563. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2003.00767.x>.
- Liu, X., Wan, L.P., Li, Y.C., Li, H.Y., Yu, T. & Zheng, X.D. (2009). Antifungal activity of thyme oil against *Geotrichum citri-aurantii* *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1450-1456. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04328.x>.
- Liu, X., Fang, W., Liu, L., Yu, T., Lou, B. & Zheng, X. (2010). Biological control of postharvest sour rot of citrus by two antagonistic yeasts. *Letters in Applied Microbiology*, 51, 30-35. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02851.x>.
- Martínez-Romero, D., Guillén, F., Valverde, J.M., Bailén, G., Zapata, P.J., Serrano, M., Castillo, S. & Valero, D. (2007). Influence of carvacrol on survival of *Botrytis cinerea* inoculated in table grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 144-148. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.015>.
- McKay, A.H., Förster, H. & Adaskaveg, J.E. (2012). Efficacy and application strategies for propiconazole as a new postharvest fungicide for managing sour rot and green mold of citrus fruit. *Plant Disease*, 96, 235-242. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-11-0525>.
- Navarro, D., Díaz-Mula, H.M., Guillén, F., Zapata, P.J., Castillo, S., Serrano, M., Valero, D. & Martínez-Romero, D. (2011). Reduction of nectarine decay caused by *Rhizopus*



- stolonifer*, *Botrytis cinerea* and *Penicillium digitatum* with *Aloe vera* gel alone or with the addition of thymol. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 241-246. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.009>.
- Nazerian, E. & Alian, Y.M. (2013). Association of *Geotrichum citri-aurantii* with citrus fruits decay in Iran. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4, 1839–1843.
- Neri, F., Mari, M. & Brigati, S. (2005). Control of *Penicillium expansum* by plant volatile compounds. *Plant Pathology*, 55, 1-6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01312.x>.
- Numpaque, M.A., Oviedo, L.A., Gil, J.H., García, C.M. & Durango, D.L. (2011). Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae*. *Tropical Plant Pathology*, 36, 3–13. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762011000100001>.
- Pérez-Abril, M., Lucas-Abellán, C., Castillo-Sánchez, J., Pérez-Sánchez, H., Cerón-Carrasco, J.P., Fortea, I., Gabaldón, J.A. & Núñez-Delicado, E. (2017). Systematic investigation and molecular modelling of complexation between several groups of flavonoids and HP- $\beta$ -cyclodextrins. *Journal of Functional Foods*, 36, 122-131. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.052>.
- Pérez-Alfonso, C.O., Martínez-Romero, D., Zapata, P.J., Serrano, M., Valero, D. & Castillo, S. (2012). The effects of essential oils carvacrol and thymol on growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* involved in lemon decay. *International Journal of Food Microbiology*, 158, 101–106. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.002>.
- Regnier, T., Combrinck, S., Veldman, W. & Du Plooy, W. (2014). Application of essential oils as multi-target fungicides for the control of *Geotrichum citri-aurantii* and other postharvest pathogens of citrus. *Industrial Crops and Products*, 61, 151–159. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.052>.
- Ritenour, M.A., Zhang, J., Cano, L.M. & Dewdney, M.M. (2017). Decay Control of Florida Fresh Citrus. UF/IFAS Citrus Extension: Florida Citrus Production Guide. <http://edis.ifas.ufl.edu>. Accessed September 2018.
- Rodríguez-López, M.I., Mercader-Ros, M.T., López-Miranda, S., Pellicer, J.A., Pérez-Garrido, A., Pérez-Sánchez, H., Núñez-Delicado, E. & Gabaldón, J.A. (2018). Thorough characterization and stability of HP- $\beta$ -cyclodextrin thymol inclusion complexes prepared by microwave technology: A required approach to a successful application in food industry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <http://doi.org/10.1002/jsfa.9307>
- Serrano-Martínez, A., Fortea, M.I., Lucas-Abellán, C., López-Miranda, S., Mercader, M.T., Núñez-Delicado, E., & Gabaldón, J.A. (2016). Protective effect of cyclodextrins on the quality parameters of roast preserved pepper. *Food Science and Technology International*, 0, 1–9. <https://doi.org/10.1177/1082013216631143>.
- Smilanick, J.L., Mansour, M.F., Gabler, F.M. & Sorenson, D. (2008). Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and

- fungicides. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 226–238. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.06.020>.
- Suwanamornlert, P., Sangchote, S., Chinsirikul, W., Sane, A. & Chonhenchob, V. (2018). Antifungal activity of plant-derived compounds and their synergism against major postharvest pathogens of longan fruit *in vitro*. *International Journal of Food Microbiology*, 271, 8-14. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.009>.
- Ultee, A., Bennik, M.H.J. & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1561–1568. <http://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002>.
- Vardar-Ünlü, G., Candan F., Sokmen, A., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, M., Donmez, E., & Tepe, B. (2003). Antibacterial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey var. *Pectinatus* (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 63–67. <https://doi.org/10.1021/jf025753e>.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B. & Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Shinsky, J.J. & White, T.J. (Eds), *PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual*. Academic Press. New York, pp. 315-322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>.
- Wuryatmo, E., Able, A.J., Ford, C.M. & Scott, E.S. (2014). Effect of volatile citral on the development of blue mould, green mould and sour rot on navel orange. *Australasian Plant Pathology*, 43, 403–411. <https://doi.org/10.1007/s13313-014-0281-z>.
- Xu, S.X., Li, Y.C., Liu, X., Mao, L.J., Zhang, H. & Zheng, X.D. (2012). *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of a water-dilutable cassia oil microemulsion against *Geotrichum citri-aurantii*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 13, 2668-2671. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5686>.

## Supplementary figures

### Supplementary Figure 1

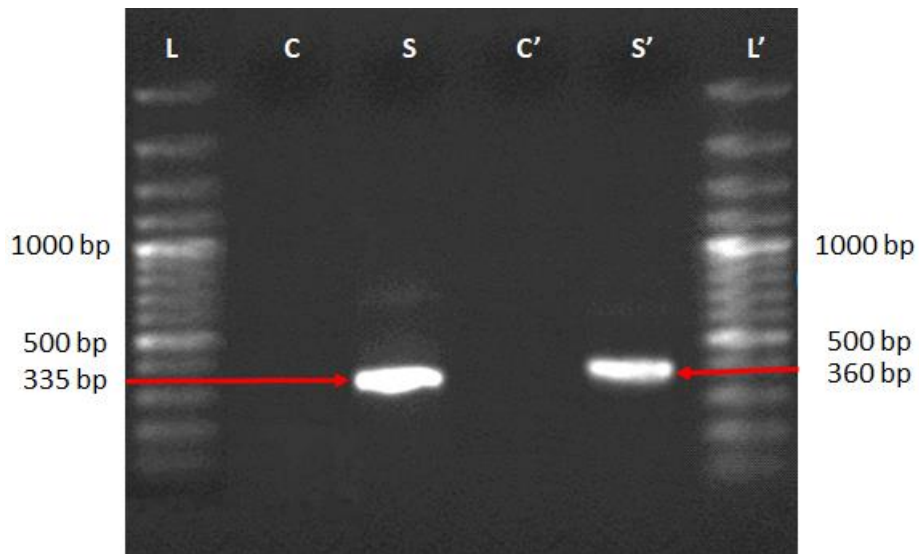
PCR amplification of *Geotrichum* DNA isolated from decayed lemons. Lanes L and L': Ladders (Thermo Scientific 100 bp); Lanes C and C': negative controls; Lanes S and S': extracted sample bands amplified with ITS1 and ITS4 primers (S) and with ITS5 and ITS4 primers (S').

### Supplementary Figure 2

Alignment of ITS sequences. EU131181.1 correspond to *G. citri-aurantii* strain GcaCC015 18S ribosomal RNA gene from GenBank of NCBI. ENA 1/4-335 and ENA 5/4-360 corresponds to the sequences of the extracted of the isolated region using primers ITS1-ITS4 and ITS5-ITS4 respectively.

### Supplementary Figure 3

Phylogenetic tree for the sequences obtained with the primers ITS1-ITS4 (ENA 1-4/335) and ITS5-ITS4 (ENA 5-4/360) and in comparison with the sequences of frequent fungus in citrus fruit from GenBank of NCBI.



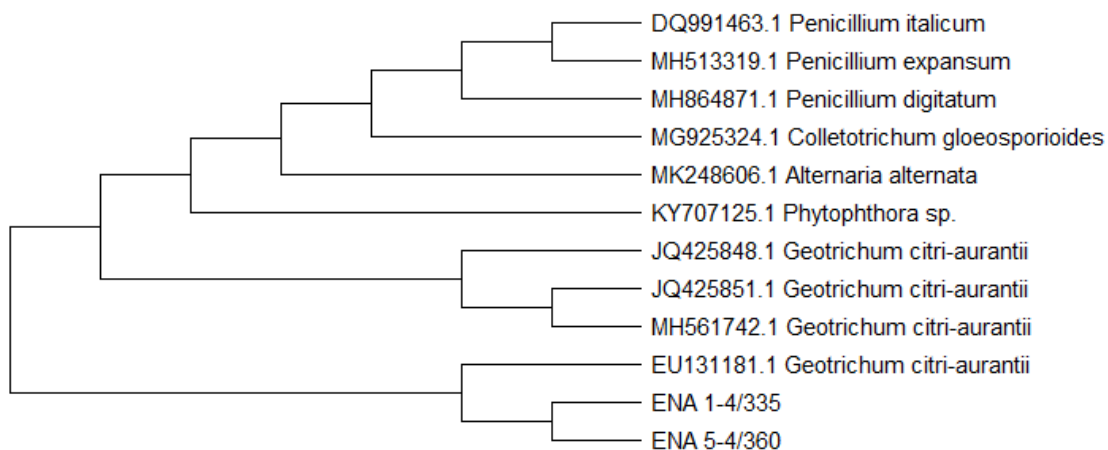
Supplementary Figure 1



EU131181.1	TTTCC	TCCGC	TTATTGATAT	GCTTAAGTTC	AGCGGGTAGT	CCTACTTGAT	CTGAGGTTGA	TTATAAATTA	ATACAAACAA
ENA 1-4/335	-----	-----	-----	-----	-----	NNNNNN	TNNT	CTGAGGTTGA	TTATAAATTA
ENA 5-4/360	-----	-----	-----	-----	-----	NNNN	NNNN	CCTTGAT	CTGAGGTTGA
EU131181.1	TTTTGTTTCG	TTATTTTAGA	AAAGCAATGC	AATTCCAAGA	GAGAAACAAC	GCTCAAACAG	GTATACTTTG	GGGGATACCC	
ENA 1-4/335	TTTTGTTTCG	TTATTTTAGA	AAAGCAATGC	AATTCCAAGA	GAGAAACAAC	GCTCAAACAG	GTATACTTTG	GGGGATACCC	
ENA 5-4/360	TTTTGTTTCG	TTATTTTAGA	AAAGCAATGC	AATTCCAAGA	GAGAAACAAC	GCTCAAACAG	GTATACTTTG	GGGGATACCC	
EU131181.1	CAAAGTGCAA	TGTGCGTTCA	AAAACTGATG	ATTCACCTTCT	GCAATTCACA	AGAAATATCG	CGTTTCGCTG	CGTTCCTCAT	
ENA 1-4/335	CAAAGTGCAA	TGTGCGTTCA	AAAACTGATG	ATTCACCTTCT	GCAATTCACA	AGAAATATCG	CGTTTCGCTG	CGTTCCTCAT	
ENA 5-4/360	CAAAGTGCAA	TGTGCGTTCA	AAAACTGATG	ATTCACCTTCT	GCAATTCACA	AGAAATATCG	CGTTTCGCTG	CGTTCCTCAT	
EU131181.1	CGATACGAGA	ACCAAGAGAT	CCATTGTTAA	AAGTTTTGAT	TTTTAATTTT	TGATTATATA	ATTAAAAGTTT	GGTGAATTTA	
ENA 1-4/335	CGATACGAGA	ACCAAGAGAT	CCATTGTTAA	AAGTTTTGAT	TTTTAATTTT	TGATTATATA	ATTAAAAGTTT	GGTGAATTTA	
ENA 5-4/360	CGATACGAGA	ACCAAGAGAT	CCATTGTTAA	AAGTTTTGAT	TTTTAATTTT	TGATTATATA	ATTAAAAGTTT	GGTGAATTTA	
EU131181.1	TTCACAAATT	TAGTGTATCA	ATAATGATCC	TTCCGCAGGG	TTCACCTACG	GAAG	-----	-----	-----
ENA 1-4/335	TTCCCAAATT	TAATGGAACC	ATAATGANCC	CTCCCAAGG	TCCCTAANG	AANNN	-----	-----	-----
ENA 5-4/360	TTCCCAAATT	TTAGTATCC	ATAATGGACC	TTCCCAAGG	TTCACCTAAG	AAACCTTGGT	ACNAA	NNNNTA	ATTCNN

Supplementary Figure 2





Supplementary Figure 3



---

**4.4. Thymol encapsulated into HP- $\beta$ -Cyclodextrin as an alternative to synthetic fungicides to induce lemon resistance against sour rot decay through increasing phenolic and antioxidant enzymes**

---

**Publicación 4 (Transcripción literal)**

**Thymol encapsulated into HP- $\beta$ -Cyclodextrin as an alternative to synthetic fungicides to induce lemon resistance against sour rot decay through increasing phenolic and antioxidant enzymes**

Vicente Serna-Escolano

María Serrano

Daniel Valero

María Isabel Rodríguez-López

José Antonio Gabaldón

Salvador Castillo

Juan Miguel Valverde

Pedro Javier Zapata

Fabián Guillén

Domingo Martínez-Romero

Molecules, 25 (18), 4348 (2020)

<https://doi.org/10.3390/molecules25184348>

**Thymol encapsulated into HP- $\beta$ -Cyclodextrin as an alternative to chemical compounds to induce lemon resistance against sour rot decay through increasing phenolic and antioxidant enzymes**

Serna-Escolano, V.<sup>a</sup>, Serrano, M.<sup>b</sup>, Valero, D.<sup>a</sup>, Rodríguez-López, M.I.<sup>c</sup>, Gabaldón, J.A.<sup>c</sup>, Castillo, S.<sup>a</sup>, Valverde, J.M.<sup>a</sup>, Zapata, P.J.<sup>a</sup>, Guillén, F.<sup>a</sup>, Martínez-Romero, D.<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Food Technology, University Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3.2, 03312, Orihuela, Alicante, Spain

<sup>b</sup>Department of Applied Biology, University Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3.2, 03312, Orihuela, Alicante, Spain

<sup>c</sup>Department of Food Technology and Nutrition. Universidad Católica San Antonio de Murcia (UCAM). Avenida de los Jerónimos s/n. 30107, Guadalupe. Murcia, Spain.

\*Corresponding author: Domingo Martínez-Romero. E-mail: [dmromero@umh.es](mailto:dmromero@umh.es)



## ABSTRACT

Consumers demand the use of non-chemicals and eco-friendly fungicides to treat fruit and vegetables and governmental authorities have unauthorized the application of chemical antifungals for the efficient control of sour rot. In the present research, the effect of thymol encapsulated in 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD) by microwave irradiation (MW) for controlling sour rot caused by *Geotrichum citri-aurantii* (*G. citri-aurantii*) in citrus fruit was evaluated. Two concentrations of HP- $\beta$ -CD-thymol (25 and 50 mM) were used, and compared with propiconazole (a chemical fungicide widely used in citrus industry), to control the decay of artificially inoculated lemon fruit. All these treatments were performed in curative and preventive experiments. The incidence and severity of *G. citri-aurantii* in 25 and 50 mM HP- $\beta$ -CD-thymol treated fruit were reduced in both experiments. The preventive 50 mM HP- $\beta$ -CD-thymol treatment showed the best effect, reducing the sour rot, respiration rate and fruit weight loss during storage at 20°C. HP- $\beta$ -CD-thymol increased polyphenol concentration and the activity of antioxidant enzymes such as ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) and peroxidase (POD) in lemon peel, the highest effects being found with 50 mM dose. In conclusion, the results show that the use of thymol encapsulated by MW into HP- $\beta$ -CD could be an effective and sustainable tool, substitute to the chemical compounds, for *G. citri-aurantium* control in citrus fruit.

**PRACTICAL APPLICATION:** HP- $\beta$ -CDs-thymol complex is an effective, safe and ecofriendly tool to control the sour rot caused by *G. citri-aurantii* during the post-harvest of lemons. Currently, in some countries, the use of effective chemical fungicides to control this disease have been banned. Thus, HP- $\beta$ -CDs-thymol could be an alternative and useful compound to be used in citrus post-harvest companies.

**Keywords:** *Citrus limon*, L.; Postharvest; Cyclodextrin; *Geotrichum citri-aurantii*; Incidence decay; Severity decay; Microwave irradiation

## 1. INTRODUCTION

Sour rot disease, occasioned by the fungus *Geotrichum citri-aurantii*, is one of the main rot of citrus fruit [1] (Smilanick, Mansour, Gabler, & Sorenson, 2008). This decay is the second cause of post-harvest citrus decay after *Penicillium* spp [2] (Smilanick, Erasmus, & Palou, 2020). *G. citri-aurantii* has serious problems for its control and eradication [3] (McKay, Förster, & Adaskaveg, 2012) because it is present in the soil and it is dispersed by air, by splashing rainwater and irrigation towards the surface of the fruit. The pathogen enters the fruit throughout wounds on the skin caused by mechanical damage, wind or insects during on-tree fruit development, harvesting or postharvest handling, and once the fungus entry to the albedo the disease begins [4] [5] (Liu et al., 2010; Mercier & Smilanick, 2005). *G. citri-aurantii* involves the secretion of extracellular endopolygalacturonases (PG) which quickly macerate the tissues of the fruit and the contact between fruit cells and the secreted juices of the infected area can reach the healthy areas propagating the rot during storage [2] (Smilanick et al., 2020). The ideal conditions for infection to occur are turgid fruit skin with free water, ambient temperatures between 12 and 36 °C, pH ranging from 2.0 to 8.5, high relative humidity (92 to 98 %) and availability of sugars, acids and starch. In addition, the aggressiveness of the fungus increases over degreening and fruit maturation [3] (McKay et al., 2012).

The traditional treatment of avoid fungal diseases has been the use of chemical compounds. However, nowadays there are only a few available fungicides against *G. citri-aurantii* since most of the fungicides used to control other fungal diseases are ineffective against this fungus, have created resistance or have been restricted by administrative authorities, due to different environmental and health problems related to the accumulation of residues in food. For instance, guazatine [3] (McKay et al., 2012) was very effective for managing sour rot, but its use has been banned in different countries (European Union or United States) due to its risks on human health. Propiconazole is also an effective fungicide and authorized by the European Union against *G. citri-aurantii*. However, the use of this fungicide was allowed just until March 2020 in European Union because it is a systemic triazole fungicide with a high environmental risk [6] (Fernández-Calviño et al., 2017).

Non-chemical strategies have been used to control of *G. citri-aurantii*, such as chlorine [7] (Smilanick et al., 2002), gaseous ozone or ozonated water [8] (Palou, Smilanick, & Margosan, 2007), exposures to elevated CO<sub>2</sub> concentration [9] (Montesinos-Herrero, del Río, Rojas-Argudo, & Palou, 2012), inorganic salts which are incorporated in generally recognized as safe compounds list, being the most important ones sodium bicarbonate and potassium sorbate [1] (Smilanick et al., 2008), the antagonists microorganism *Bacillus subtilis* [10] (Yanez-Mendizabal et al., 2011), *Muscodor albus* [5] (Mercier & Smilanick, 2005), *Rhodosporidium paludigenum*, *Cryptococcus laurentii* [4] (Liu et al., 2010), *Pichia pastoris* [11] (Ren et al., 2012) and *Cytosporone B* [12] (Yin et al., 2019), plant extract from *Cistus villosus* and *Halimium antiatlanticum* [13] (Talibi et al., 2012) and essential oils from plant species [14] (Regnier, Combrinck, Veldman, & Du Plooy, 2014).

*Thymus* spp oils [15] (Liu et al., 2009) or thymol as pure compounds [16] (Pérez-Alfonso et al., 2012) have been reported to act as natural fungicides when applied directly on vegetables. However, these strategies to control *G. citri-aurantii* are not totally effective or can cause fruit alteration, such as phytotoxicity, off flavour and odd tastes and aromas [17] (Navarro et al., 2011). On the other hand, it is necessary to find out strategies for essential oil application aimed to surpass the disadvantages derived from the physicochemical properties of thymol or *thyme* oil, such as their low palatability due to its distasteful and potent smell, low water solubility and unsteadiness due to oxygen, light and temperature, all of them limiting their use in postharvest fruit industry [18] (Rodríguez-López et al., 2019).

Encapsulation of essential oils in different types of cyclodextrins (CD) is a technique that releases the essential oils for long periods of time, avoids their degradation, improves their solubility [19] (Serrano-Martínez et al., 2016) and reduces aroma compound intensity [20] (Ciobanu, Landy, & Fourmentin, 2013). Nevertheless, it is necessary to choose the most suitable CDs and encapsulation methods depending on solubility of the encapsulated compound and the agro-food applications. HP- $\beta$ -CDs showed higher aqueous solubility and stability than  $\alpha$ - and  $\beta$ -CDs [21] (Lucas-Abellán et al., 2008). Moreover, Rodríguez-López et al., [18] (2019) showed that the best encapsulation efficacy of thymol in CDs was reached in HP- $\beta$ -CDs compared with  $\alpha$ - and  $\beta$ -CDs and

creating very stable complexes with microwave (MWI) encapsulation method, which was demonstrated by the high affinity of HP- $\beta$ -CDs for thymol molecule. In this way, it is possible to reduce the negative effects of pure essential oils when are applied directly on fruit surface and, in addition, their effectiveness against microorganisms is maintained. Recently, Serna-Escolano et al., [22] (2019a) and Rodríguez-López et al., [23] (2020) have proposed the use of essential oils like carvacrol and thymol encapsulated in HP- $\beta$ -CD to control the *in vitro* growth of moulds and bacteria, respectively. In both papers, they found that the microwave encapsulation method (HP- $\beta$ -CD-thymol-MW) was the best to encapsulate the essential oils and to control *G. citri-aurantii* growth and its sporulation and bacteria growth. Also Serna-Escolano et al., [22] (2019a) evaluated the *in vitro* effect of carvacrol and thymol on *G. citri-aurantii* and 5.06 and 52.6 mM were obtained as minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicide concentration (MFC), respectively.

Given the known role of HP- $\beta$ -CD-thymol-MW on suppressing *G. citri-aurantii* *in vitro* experiments, the goal of this research is to assess the *in vivo* antifungal effect of the HP- $\beta$ -CD-thymol encapsulated by the microwave method by using inoculated lemons with *G. citri-aurantii*. The curative and preventive effects of the treatment were evaluated as follow. The preventive action is expressed when the antifungal treatment is applied before the pathogen infects the tissues of the plant. The curative action consists in the ability of the fungicide to limit the development of the pathogen inside the tissues, when applied in the latent period, that is, in the interval between the penetration and the appearance of the first symptoms. For this purpose, 50 and 25 mM HP- $\beta$ -CD-thymol complex concentrations were used, which were close to MFC and half of the MCF established in our previous study [22] (Serna-Escolano et al., 2019a)

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1. Thymol encapsulation on HP- $\beta$ -CD**

Thymol (CAS Number 89-83-8) was bought from Sigma (Spain). HP- $\beta$ -CDs (CAS Number 128446-35-5) were provided by AraChem (Holland). HP- $\beta$ -CD-thymol complex was performed according to the best result of Serna-Escolano et al., [22] (2019a). The complexation procedure of thymol in HP- $\beta$ -

CDs was fulfilled by using the microwave method (MW) and dehydrated by spray drying.

## 2.2. Fungus

*G. citri-aurantii* was obtained from decayed lemons as previously reported [22] (Serna-Escolano et al., (2019a)). Pure cultures of the fungus, in potato dextrose agar (PDA) growth media plates with 6 d of incubation, were suspended with detergent (0.05% Tween 20) and sterile distilled water and the arthrospore concentration was tuned to  $10^5$  CFU mL<sup>-1</sup> by employing a hemacytometer and this inoculum was used in curative and preventive experiments.

## 2.3. Fruit

One thousand mature lemon fruit (*Citrus lemon* cv. Fino 49) were harvested from an organic crop (Mundosol Quality SL Company located in Alicante, Spain) on April, 2019. Then, 720 fruits with homogeneous yellow colour and free of visual external damage were selected. Average fruit weight was  $0.062 \pm 0.005$  kg, diameter  $0.068 \pm 0.001$  m, total acidity of  $95 \pm 4$  g citric acid L<sup>-1</sup> and juice total soluble solids (TSS) of  $103 \pm 1$  g L<sup>-1</sup>.

## 2.4. Experimental design

Recently harvested lemons were washed with running water containing  $10 \mu\text{L L}^{-1}$  sodium hypochlorite solution for 3 minutes. The fruit were dried by forced air at 30 °C for 5 minutes and housed at random in 24 cardboard boxes with 30 holes. For each treatment, 180 fruit were used, randomly distributed in three replicates. A hurt (3 mm width and 3 mm deep) was made on the flavedo and albedo (without reaching the pulp of the fruit) in each fruit using a sterile lancet. Preventive and curative experiments were performed on each half of the damaged fruit. The preventive assay was performed by applying the HP-β-CD-thymol treatment before the inoculation of *G. citri-aurantium*. The curative test was performed by inoculating *G. citri-aurantium* before the treatment with HP-β-CD-thymol. In both assays, between inoculation and treatment application, or *vice versa*, there were 10 hours of separation. Inoculation was performed by adding 40 μL of  $10^5$  CFU mL<sup>-1</sup> conidial suspension to fruit peel wound and HP-

$\beta$ -CD-thymol was applied at two concentrations (50 and 25 mM). In addition, these treatments were compared with control (water), and propiconazole (Bravatia from Tecnidex-Valencia) at a concentration of 1 % v/v. All treatments were applied by direct spraying on peel lemon surface and wounds. After treatment, fruit were stored in darkness at 20 °C and 80 % relative humidity throughout the experiment, once they were dried.

After 5, 10 and 15 d of storage, the incidence and severity of fruit damage were evaluated. In addition, each sampling date 5 lemon fruit were taken at random from each replicate, 15 lemon fruit per treatment, to individually analyse weight loss and respiration rate. In lemon from the preventive experiment, a piece of the infected skin surface (flavedo and albedo of 30 x 30 mm) was taken after 10 d of storage in which the infected area was in the middle. The samples were frozen with liquid nitrogen and stored at -20 °C and used to measure total phenolic content and ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) and peroxidase (POD) antioxidant enzymes activity.

## **2.5. Disease incidence and severity**

Disease incidence was determined for each sampling day and treatment by enumerating the lemons with sour rot symptoms and using the next formula:

$$\text{Disease incidence (\%)} = (\text{decayed fruits} / \text{total evaluated fruits}) \times 100.$$

Disease severity was determined for each sampling day and treatment by measuring the external diameter of sour rot area of each decayed fruit and the infect area was determined. The data were expressed as  $m^2$  (mean  $\pm$  SE).

## **2.6. Fruit weight loss a calculated and respiration rate**

The weight losses and respiration rates of lemons were measured individually for each fruit according to Navarro et al., [17] (2011). Weight lemons at 0 d and after the storage period were measured and weight loss was expressed as percentage with respect to the initial weight. Respiration rate was quantified by placing each lemon in a 0.5 L glass container sealed with a rubber stopper for 1800 s. One mL of the holder atmosphere was injected into a Shimadzu<sup>TM</sup> 14A gas chromatograph (Kyoto, Japan), equipped with a thermal conductivity detector and a molecular sieve 5A column, 80-100 mesh

(Carbosieve SII. Supelco Inc., Bellefonte, USA) to quantified CO<sub>2</sub> concentration. Respiration rate was expressed as  $\mu\text{g CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (mean  $\pm$  SE).

## 2.7. Total phenolic quantification

The extraction of total phenolics was performed by homogenising 2 g of skin tissue samples with 0.01 L of water:methanol (2:8) containing 2 mmol L<sup>-1</sup> NaF in order to inactivate polyphenol oxidase activity by using a mortar and pestle. The homogenate was centrifuged at 15 000 g at 4 °C for 15 min and the supernatant was used to quantify total phenolics by using the Folin–Ciocalteu's reagent as described previously [39] (Serna-Escolano et al., 2019b). The results were expressed as g kg<sup>-1</sup> gallic acid equivalent in a fresh weight basis. A calibration curve was made with gallic acid (Sigma-Aldrich) at concentration ranging from 5 to 20 10<sup>-9</sup> kg in the reaction medium, which showed linearity with the absorbance at 760 nm ( $y = 0.0208x + 0.0045$ ;  $r^2 = 0.996$ ).

## 2.8. Activity of the antioxidant enzymes

Antioxidant enzymes such as APX, CAT and POD were extracted by homogenizing 2 g of flavedo and albedo tissue with 0.01 L of phosphate buffer 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 6.8, containing 1 % (w/v) polyvinylpyrrolidone and 1.0 mmol L<sup>-1</sup> ethylenediamine-tetraacetic acid. The extracts were centrifuged at 15 000 g for 30 min at 4 °C and the antioxidant enzyme assays were made on the supernatant according to our previous report [39] (Serna-Escolano et al., 2019b). The reaction mixture for APX quantification contained 1x10<sup>-4</sup> L of extract in 0.003 L of 50 mmol L<sup>-1</sup> potassium phosphate (pH 7.0), 0.5 mmol L<sup>-1</sup> ascorbic acid and 1.0 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The absorbance was measured at 290 nm from time 0 to 60 s and APX activity was expressed as U s<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup>, with one enzymatic unit (U) being defined as 0.01 decrease of absorbance 60 s<sup>-1</sup>. The reaction mixture to measure POD activity contained 2x10<sup>-4</sup> L of extract in 50 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 7.0), 12 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 7 mmol L<sup>-1</sup> guaiacol in a final volume of 0.003 L. The absorbance at 470 nm was measured during 60 s and POD activity was expressed as U s<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup>, where U was defined as 0.01 increase of absorbance 60 s<sup>-1</sup>. Finally, 1x10<sup>-4</sup> L of extract were added to 0.003 L of reaction mixture containing 15 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 50 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 7.0) to measure CAT activity. The decrease of



absorbance at 240 nm during 60 s was measured and CAT activity was expressed as U s<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup>. U was defined as a decrease of 0.01 absorbance 60 s<sup>-1</sup>.

## 2.9. Statistical analysis

An analysis of variance (ANOVA) was performed by using SPSS 15.0 software version 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Tukey's HSD test was used to compare the means considering a statistical significance at  $P < 0.05$ . The semilogarithmic equations ( $\log y = bx + \log b_0$ ) were obtained from the severity infection (m<sup>2</sup>) vs polyphenol contents (g kg<sup>-1</sup> gallic acid equivalent). The equation fit was quantified by the determination of r<sup>2</sup> coefficient.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

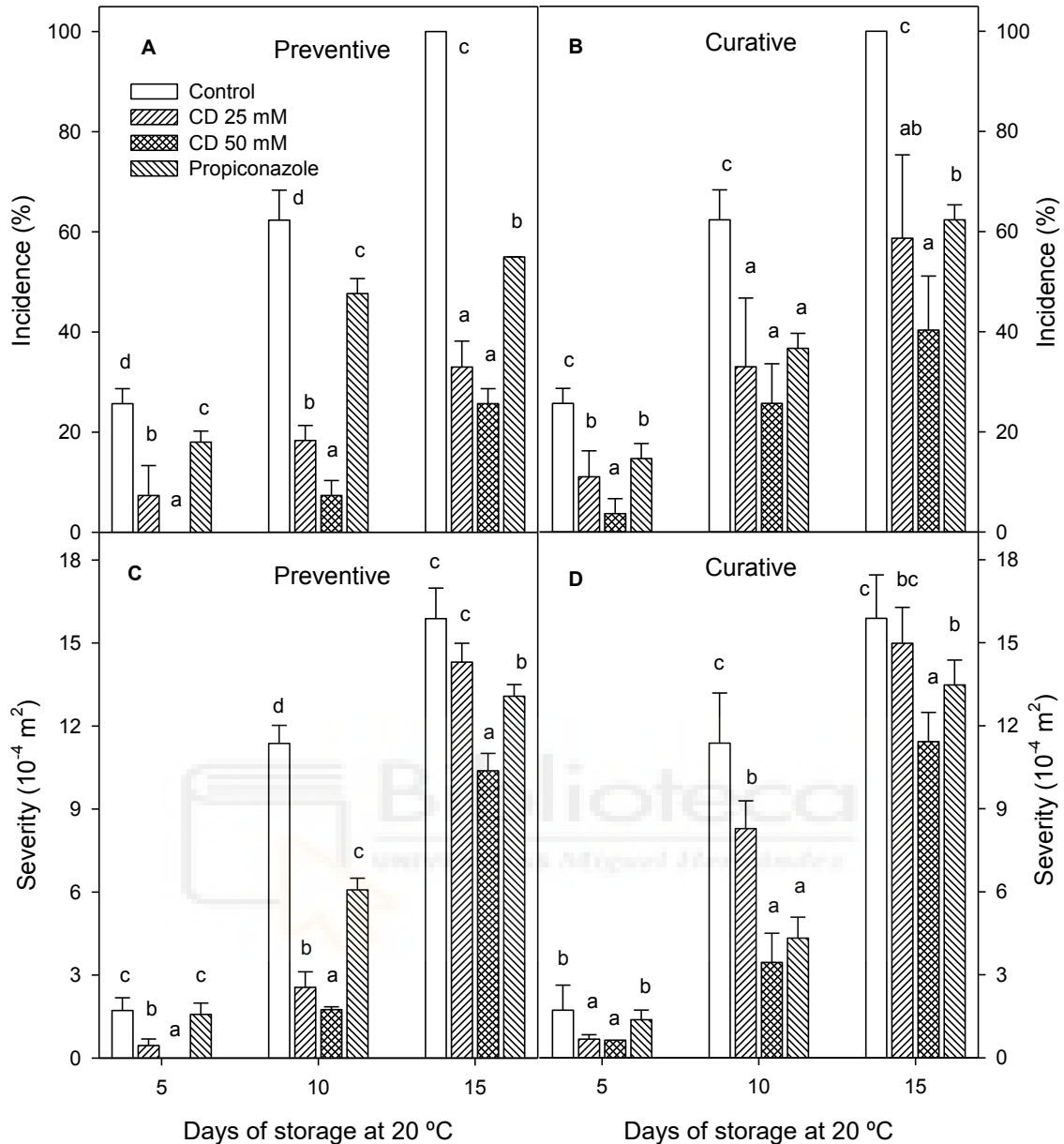
The incidence and severity of sour rot increased significantly throughout storage time in control and treated lemons, although rot incidence in control lemons was always significantly ( $P < 0.05$ ) higher than in treated ones in preventive and curative experiments (Figures 1A and B). Thus, 100 % of control fruit were affected after 15 d of storage in the preventive experiment, while fruit treated with 25, 50 mM HP- $\beta$ -CD-thymol and propiconazole showed a decay incidence of  $33.00 \pm 5.18$ ;  $25.67 \pm 2.99$  and  $55.00 \pm 0.01$  %, respectively. Meanwhile, rot incidence in treated fruit was significantly higher ( $P < 0.05$ ) in the curative than in the preventive experiment with  $58.67 \pm 16.66$ ,  $40.33 \pm 10.79$  and  $62.33 \pm 2.99$  % for 25, 50 mM of HP- $\beta$ -CD-thymol and propiconazole, respectively. In addition, both concentrations of HP- $\beta$ -CD-thymol were more effective than propiconazole in decreasing rot incidence in the preventive experiment throughout storage. Moreover, the lowest incidence occurred with the 50 mM treatment. The severity of damage caused by *G. citri-aurantii* during storage was also significantly reduced in fruit treated with HP- $\beta$ -CD-thymol and propiconazole in both experiments, although the 25 mM HP- $\beta$ -CD-thymol treatment was similar than control ( $P > 0.05$ ) at the last sampling date (Figure 1).

In previous works the use of thyme oil or thymol, applied directly on the peel of citrus fruit as a coating or in vapour, was able to reduce the growth of different fungi species, such as *Penicillium* spp [16] (Pérez-Alfonso et al., 2012), *Alternaria* [24] (Ramezani, Azadi, Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, & Saharkhiz,



2016) and *G. citri-aurantii* [14] (Regnier, et al., 2014). In these papers, higher essential oil concentrations were used than the thymol encapsulated in HP- $\beta$ -CD in the present experiment, showing that encapsulation of essential oils increases their effectiveness. Thymol encapsulated in HP- $\beta$ -CD by MW method is a water soluble compound and more stable than encapsulated in  $\alpha$ - or  $\beta$ -CDs [18] (Rodríguez-López et al., 2019). Thymol is slowly released when the HP- $\beta$ -CD-thymol complex is dissolved in water, and a fungicidal effect on *G. citri auriantium* without altering the organoleptic properties of lemons is observed. It has been proposed that the mechanism of thymol on inhibiting pathogen growth and spore germination is throughout modifying cell membrane permeability by its direct action on phospholipid and protein degradation as well as on inhibiting ergosterol biosynthesis [25] (Hyldgaard, Mygind, & Meyer, 2012). Thus, Bagamboula, Uyttendaele, & Debevere, [26] (2004) indicated that the presence of a delocalized electron system and hydroxyl groups in the thymol and carvacrol molecules could be responsible for their antifungal activity. Perina et al., [27] (2015) demonstrated by image analysis that thymol treatment caused a clear damage on cell wall and plasma membrane disruption, leading to cytoplasm disorganization and organelle death.

On the other hand, Valencia-Chamorro, Pérez-Gago, del Río, and Palou [28] (2009) indicated that the antifungal effect of the essential oil depended on whether the applied treatment was curative or preventive. Perina et al., [27] (2015) showed that the treatment of thymol prevented fungal penetration and caused a delay in the early infection process of *A. alternata* due to its fungistatic capacity and lack of persistence. This behaviour differs from curative commercial fungicides used. Thus, under curative conditions, 10 hours of separation between *G. citri-aurantii* inoculation and lemon treatments could be enough for the fungus to invade the fruit cells and HP- $\beta$ -CD-thymol complex would be less able to control the decay spread. Thus, Sameza et al., [29] (2016) reported that infection control becomes difficult once a pathogen penetrates plant tissues.

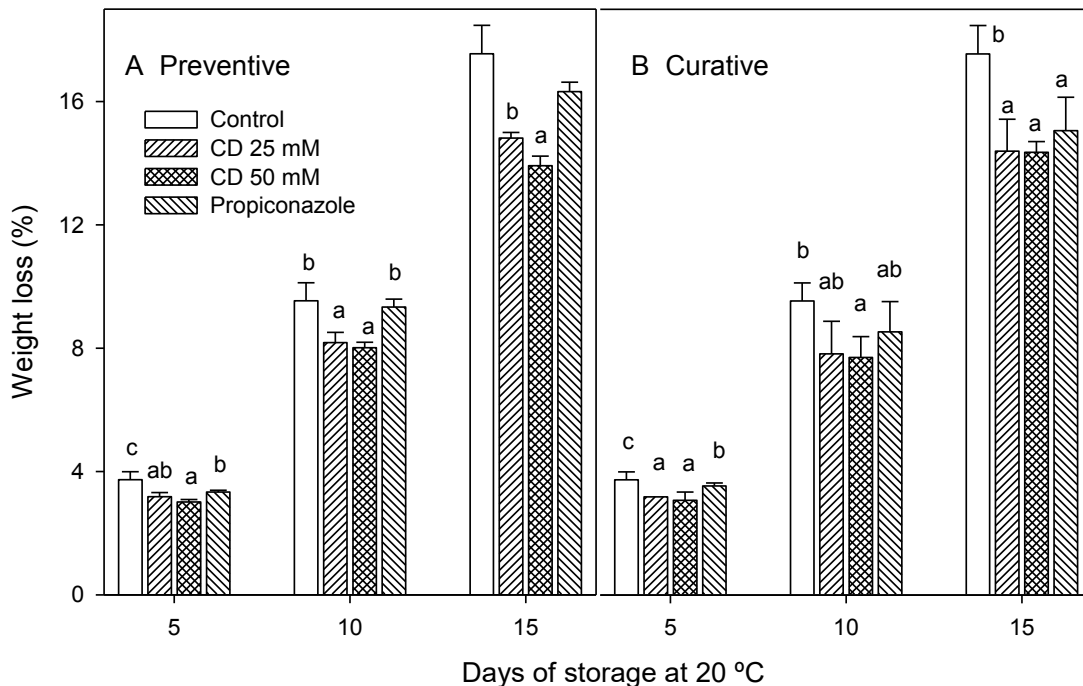


**Figure 1.** Incidence (%) (A-B) and severity ( $m^2$ ) (C-D) in preventive (A-C) and curative (B-D) experiments of 'Fino 49' lemon treated with 25 or 50 mM HP- $\beta$ -CD-thymol or propiconazole during 15 d of storage at 20 °C. Data are the mean  $\pm$  SE. Different letters for each sampling date show significant differences ( $P < 0.05$ ) among treatments.

Montesinos-Herrero and Palou [30] (2010) pointed out that the curative or preventive effects of GRAS compounds used in post-harvest disease control depended more on interplay with the host than on chemical fungicide natures used. Moreover, this interaction largely depends on the physical and

physiological state of the fruit, as well as on fruit species and cultivars. However, although curative control of the sour rot is not as efficient as preventive control, it is beneficial because it can be applied even if an incipient or latent diseases come about.

Weight losses increased during the storage of fruit in both assays (Figure 2). However, treated lemons showed significantly ( $P < 0.05$ ) lower weight losses than controls. Treated lemons with 25 and 50 mM of encapsulated thymol in preventive experiment exhibited significantly lower weight loss percentage, with final values of  $14.81 \pm 0.18$  and  $13.91 \pm 0.31\%$  respectively, with respect to control and propiconazole treated fruit ( $17.55 \pm 0.92$  and  $16.32 \pm 0.31\%$ , respectively) (Figure 2A). Weight loss was also reduced in thymol and propiconazole treated fruit in curative experiment, although no significant ( $P < 0.05$ ) differences were observed among treatments at the last sampling date (Figure 2B). Lemon weight losses are according to those described in previous papers. It has been observed that the treatments with eugenol, menthol and thymol of cherries [31] (Serrano, Martinez-Romero, Castillo, Guillen, & Valero, 2005) and table grapes [32] (Valverde et al., 2005) or the treatments with eucalyptol and cinnamon oil of tomato and strawberry [33] (Tian et al., 2011) reduced postharvest weight loss of fruit. In addition, mandarins inoculated with *P. digitatum* and *P. italicum* [34] (Jhalegar, Sharma, & Singh, 2015) and inoculated oranges with *A. citri* [24] (Ramezani et al., 2016) and treated with essential oils from *Zataria multiflora* and *Thymus vulgaris*, showed lower weight losses than control fruit. These effects were related with the reduction of both, incidence and severity of decay, as well as with the reduced metabolism (respiration rate and ethylene production) of the inoculated and treated with essential oils fruit with respect to controls.

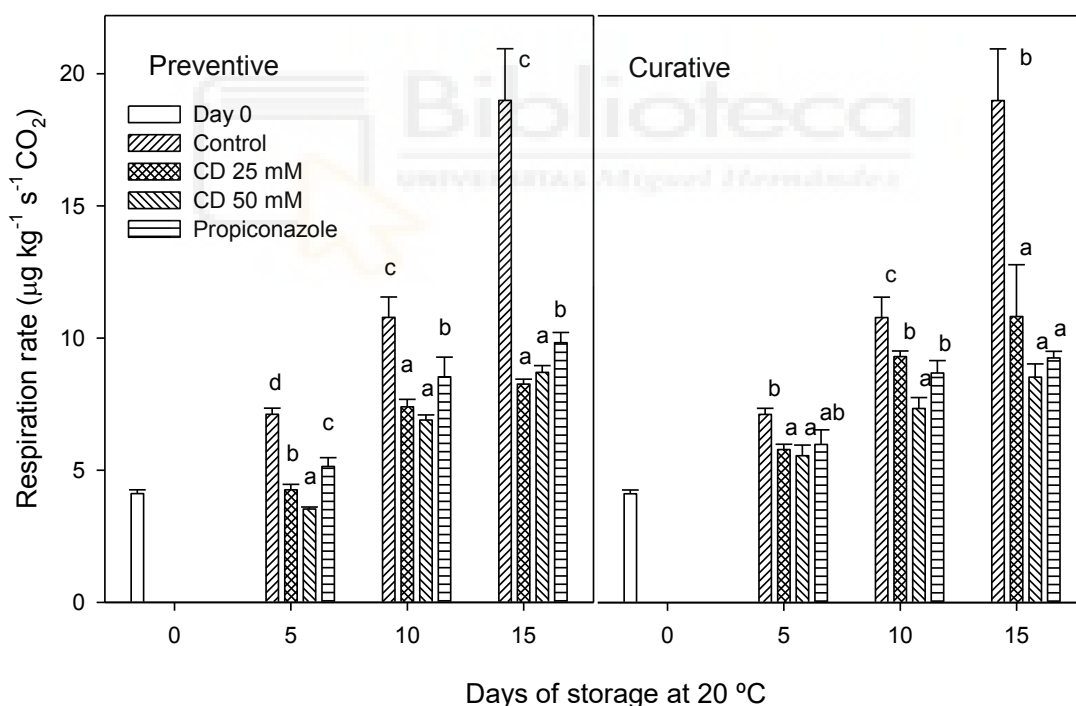


**Figure 2.** Weight loss (%) of 'Fino 49' lemon fruit treated with 25 or 50 mM HP- $\beta$ -CD-thymol or propiconazole during 15 d of storage at 20 °C in preventive (A) and curative (B) experiments. Data are the mean  $\pm$  SE. Different letters for each sampling date show significant differences ( $P < 0.05$ ) among treatments.

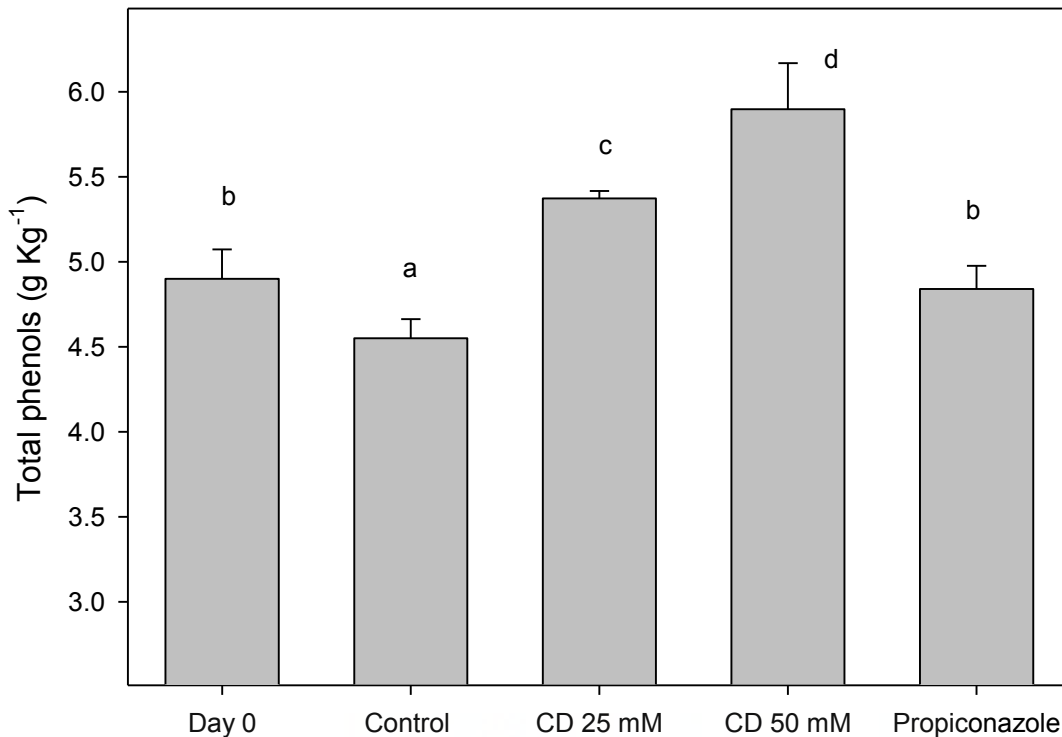
The respiration rate of all fruit in both experiments increased throughout storage (Figure 3), although control fruit exhibited the highest respiration rate throughout the experiment, reaching values of  $19.00 \pm 1.95 \mu\text{g kg}^{-1} \text{s}^{-1}$  after 15 d of storage at 20 °C. However, fruit treated with HP- $\beta$ -CD-thymol or propiconazole showed significant ( $P < 0.05$ ) lower respiration rate than control ones, with no significant differences between treated fruit at the end of storage in the curative experiment ( $\sim 9.2 \mu\text{g kg}^{-1} \text{s}^{-1}$ ). However, 25 and 50 mM HP- $\beta$ -CD-thymol treated fruit showed lower respiration rate than propiconazole treated ones in the preventive experiment,  $8.25 \pm 0.19$ ;  $8.70 \pm 0.26$  and  $9.82 \pm 0.39 \mu\text{g kg}^{-1} \text{s}^{-1}$ , respectively. In addition, treated lemons with 25 and 50 mM of HP- $\beta$ -CD-Thymol in the preventive assay showed lower respiration rate than in the curative assay. Navarro et al., [17] (2011) found in two varieties of nectarine inoculated with 3 filamentous fungus species (*B. cinerea*, *P. digitatum* and *R. stolonifer*) that the respiration rate increased exponentially to the volume of damaged flesh tissue in each fruit. In addition, they observed that there was a

decrease in rotten fruit percentage and respiration rate after treatments with *Aloe vera* and/or thymol. Similarly, Martínez-Romero et al., [35] (2007) found a positive correlation between the increased rotten area caused by *Botrytis cinerea* and ethylene and respiration rate in tables grapes.

The highest differences in decay incidence and severity, weight losses and fruit respiration rate between lemon fruit treated with 25 or 50 mM of HP- $\beta$ -CD-thymol and controls were found in preventive experiment after 10 d of storage. Then, the determinations of total phenolic content and antioxidant enzyme activities (CAT, POD and APX) were performed in lemons fruit of the preventive experiment after 10 d of storage at 20 °C. Results showed that total phenolic content in the peel (flavedo + albedo) of control lemons decreased (Figure 4) with respect to values at 0 d by approximately 10% after 10 d of storage at 20 °C.

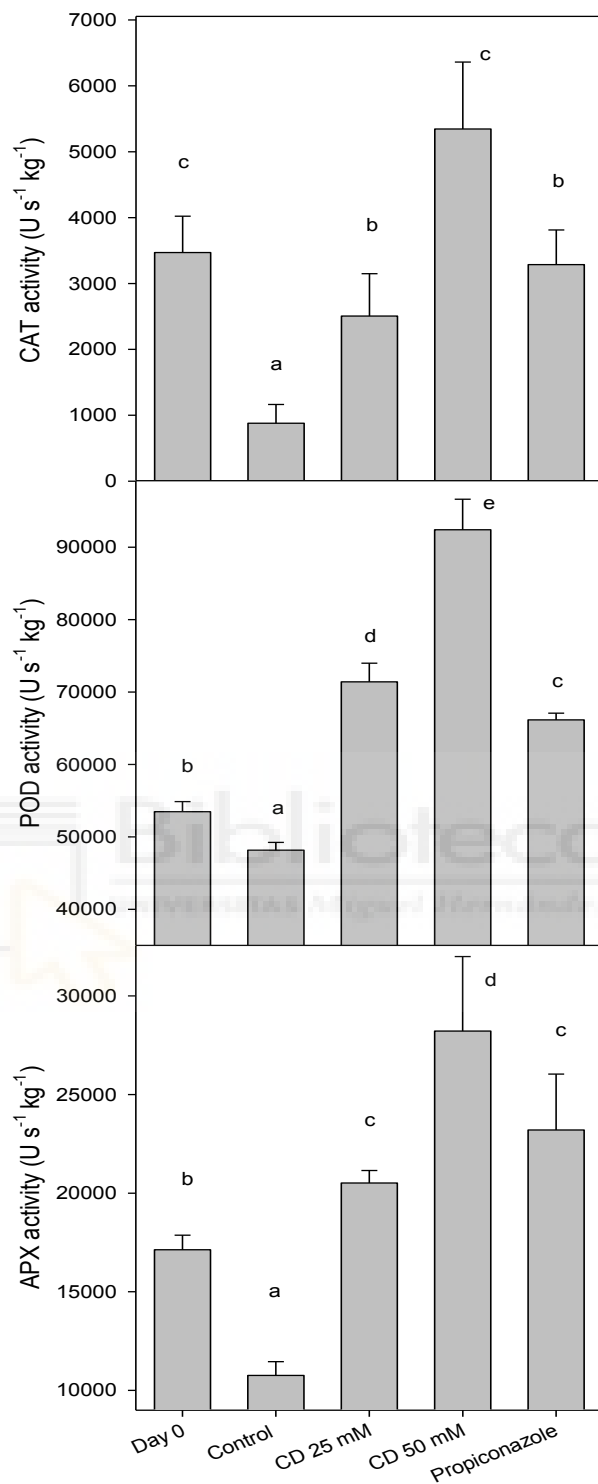


**Figure 3.** Respiration rate ( $\mu\text{g kg}^{-1} \text{s}^{-1} \text{CO}_2$ ) of 'of control, 25 or 50 mM HP- $\beta$ -CD-thymol or propiconazole treated 'Fino 49' lemon fruits during 15 d of storage at 20 °C in preventive (A) and curative (B) experiments. Data are the mean  $\pm$  SE. Different letters for each sampling date show significant differences ( $P < 0.05$ ) among treatments.



**Figure 4.** Total phenolics concentration (g kg<sup>-1</sup> gallic acid equivalent), in peel of control, 25 or 50 mM of HP-β-CD-thymol or propiconazole treated 'Fino 49' lemon fruits at harvest and after 10 d of storage at 20 °C, in preventive experiment. Data are the mean ± SE. Different letters show significant differences (P <0.05) among treatments.

However, in fruit treated with propiconazole no change (P <0.05) in phenolic content occurred, while in lemons treated with 25 and 50 mM of encapsulated thymol the levels of polyphenols increased, reaching values of  $5.37 \pm 0.04$  and  $5.89 \pm 0.27$  g kg<sup>-1</sup> gallic acid equivalent, respectively. Moreover, the severity of the skin damage of infected fruit was negatively correlated with the polyphenol content, following the semilogarithmic equation  $\log y = -6.03X + \log 3.74$  ( $r^2 = 0.96$ ). This negative correlation between the severity of the lemon decay and the polyphenol contents could be due to the antifungal capacity of the polyphenolic compounds and the important role that their accumulation in vegetable tissues plays as a protection mechanism against the attack of microorganism [36] (Jin et al., 2017).



**Figure 5.** Activity of the antioxidant enzymes catalase (CAT), peroxidase (POD) and ascorbate peroxidase (APX), in control and 25 or 50 mM HP- $\beta$ -CD-thymol and propiconazole treated ‘Fino 49’ lemon fruit at harvest and after 10 d of storage at 20 °C in preventive experiment. Data are the mean  $\pm$  SE. Different letters show significant differences ( $P < 0.05$ ) among treatments.

The phenylalanine ammonia-lyase is the initial enzyme implicated in the phenylpropanoid pathway leading to the synthesis of phenolic compounds, which are a polyphenols source involved in defense mechanisms [37] (Singh, Rastogi, & Dwivedi, 2010). Bill, Sivakumar, Korsten, & Thompson [38] (2014) observed that there was a decrease in the anthracnose severity in avocados treated with chitosan and/or thyme oil coatings, which was attributed to increases in PAL activity, total polyphenol content and antioxidant activity. Thus, the role of encapsulated thymol on decreasing incidence and severity of sour rot could be due, at least partly, to the increased phenolic biosynthesis.

The activity of antioxidant enzymes (APX, POD and CAT) of control lemons decreased after 10 d of storage at 20 °C compared to activities measured in freshly harvested fruit (0 d) (Figure 5). However, in fruit treated with 25 and 50 mM of HP- $\beta$ -CD-thymol or propiconazole for these antioxidant enzyme activities increase during storage, the highest values being observed with 50 mM HP- $\beta$ -CD-thymol treatment for the three enzymes (Figure 5). Serna-Escolano et al., [39] (2019b) indicated that the activity of antioxidant enzymes (CAT, POD and APX) decreased during on-tree lemon fruit development. However, the increased antioxidant enzyme activities found in treated lemons agrees with previous reports, in which treatments of mango [40] (Perumal, Sellamuthu, Nambiar, & Sadiku, 2017) and avocados [38] (Bill et al., 2014) with thymol or thyme essential oils improved antioxidant enzyme activities and free radical scavenging activity and enhanced resistance of fruit tissues against fungal decay. The role of antioxidant enzymes on improving disease resistance in fruit and vegetables has been reported to be throughout regulation of reactive oxygen species metabolism [36] (Jin et al., 2017). Thus, it has been described that SOD activity catalyzes the  $O_2^{\cdot -}$  dismutation reaction into  $H_2O_2$  and  $O_2$  and the enzymes POD and CAT convert  $H_2O_2$  into  $O_2$  and  $H_2O$  [41] (Jin et al., 2012). POD activity is also involved in lignin accumulation and participates in processes associated with cell wall reinforcement (lignification and suberization), as defensive physical barrier against pathogenic microorganisms [42] (Li et al., 2017). Therefore, the increase in antioxidant enzymes (SOD, POD and CAT) together with the increased phenolic content induced by HP- $\beta$ -CD-thymol treatment would cause a delay in the degeneration of cell walls in fruit tissues infected by *G. citri-aurantium* and protect the membrane cellular



structure against lipid peroxidation. However, the decrease in antioxidant enzyme activities in control fruit is related with the sour rot severity. All these biochemical modifications would participate on improving the resistance of the peel fruit against the attack of *G. citri-aurantium* and decrease the spread of the sour rot.

#### **4. CONCLUSIONS**

Thymol encapsulated in HP- $\beta$ -CD could be an efficient tool, substitute to chemical compounds, against *G. citri-aurantium* since its role on reducing the decay incidence and severity in artificially inoculated lemons was even higher than that of the commercial fungicide propiconazole. This effect could be due to its direct antifungal action, its effect on increasing polyphenol content in fruit peel and its action increasing the activity of antioxidant enzymes, leading to increases on cell fruit protection against the attack of this pathogen. In addition, these three effects could be a consequence of the slow liberation of thymol from the HP- $\beta$ -CD-thymol complex, which in future work could be analysed.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors want to thank to Mundosol Quality Company located in Alicante- Spain for financial and technological support.

## REFERENCES

1. Smilanick, J. L., Mansour, M. F., Gabler, F. M., & Sorenson, D. (2008). Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 226–238. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.06.020>
2. Smilanick, J.L., Erasmus, A., & Palou, L. (2020). Citrus fruits, In L., Palou, J.L. & Smilanick, (Ed.), *Postharvest pathology of fresh horticultural produce*, (pp. 3-54) CRC Pres, Taylor & Francis Group. Boca Raton. <https://doi.org/10.1201/9781315209180>
3. McKay, A. H., Förster, H., & Adaskaveg, J. E. E. (2012). Efficacy and application strategies for propiconazole as a new postharvest. *Plant Disease*. 96, 235-242. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-11-0525>
4. Liu, X., Fang, W., Liu, L., Yu, T., Lou, B., & Zheng, X. (2010). Biological control of postharvest sour rot of citrus by two antagonistic yeasts. *Letters in Applied Microbiology*, 51, 30–35. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02851.x>
5. Mercier, I., & Smilanick, J. L. (2005). Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscodor albus*. *Biol. Control*. 32, 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.12.002>
6. Fernández-Calviño, D., Rousk, J., Bååth, E., Bollmann, U. E., Bester, K., & Brandt, K. K. (2017). Ecotoxicological assessment of propiconazole using soil bacterial and fungal growth assays. *Applied Soil Ecology*, 115, 27-30. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.03.009>
7. Smilanick, J. L., Aiyabei, J., Mlikota Gabler, F., Doctor, J., Sorenson, D., & Mackey, B. (2002). Quantification of the toxicity of aqueous chlorine to spores of *Penicillium digitatum* and *Geotrichum citri-aurantii*. *Plant Disease*, 86, 509-514. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.5.509>
8. Palou, L., Smilanick, J. L., & Margosan, D. A. (2007). Ozone application for sanitation and control of postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. In: R., Troncoso-Rojas, M. E., Tiznado-Hernández, A., González-León, (Ed.), *Recent advances in alternative postharvest technologies to control fungal diseases in fruits & vegetables*. (pp. 39-70). Trivandrum, Kerala, India: Transworld Research Network
9. Montesinos-Herrero, C., Del Río, M. A., Rojas-Argudo, V., & Palou, L. (2012). Short exposure to high CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> at curing temperature to control postharvest diseases of citrus fruits. *Plant Disease*. 96, 423-430. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-11-0595>
10. Yanez-Mendizabal, V., Usall, J., Viñas, I., Casals, C., Marin, S., Solsona, C., & Teixido, N. (2011). Potential of a new strain of *Bacillus subtilis* CPA-8 to control the major postharvest diseases of fruit. *Biocontrol Science and Technology*, 21, 409–426. <https://doi.org/10.1080/09583157.2010.541554>
11. Ren, X., Kong, Q., Wang, H., Yu, T., Zhou, W.-W., & Zheng, X. (2012). Biocontrol of fungal decay of citrus fruit by *Pichia pastoris* recombinant strains expressing cecropin A. *Food Chemistry*, 131, 796-801. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.046>

12. Yin, C., Liu, H., Shan, Y., Gupta, V.K., Jiang, Y., Zhang, W., Tan, H., & Gong, L. (2019). *Cytosporone B* as a biological preservative: purification, fungicidal activity and mechanism of action against *Geotrichum citri-aurantii*. *Biomolecules*, 9, 125; <https://doi.org/10.3390/biom9040125>
13. Talibi, I., Askarne, L., Boubaker, H., Boudyach, E. H., Msanda, F., Saadi, B., & Ait Ben Oumar, A. (2012). Antifungal activity of some Moroccan plants against *Geotrichum candidum*, causal agent of postharvest citrus sour rot. *Crop Protection*, 35, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.12.016>
14. Regnier, T., Combrinck, S., Veldman, W., & Du Plooy, W. (2014). Application of essential oils as multi-target fungicides for the control of *Geotrichum citri-aurantii* and other postharvest pathogens of citrus. *Industrial Crops and Products*, 61, 151–159. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.052>
15. Liu, X., Wang, L., Li, Y., Li, H., Yu, T., & Zheng, X. (2009). Antifungal activity of thyme oil against *Geotrichum citri-aurantii* *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1450–1456. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04328.x>
16. Pérez-Alfonso, C. O., Martínez-Romero, D., Zapata, P.J., Serrano, M., Valero, D., & Castillo, S. (2012). The effects of essential oils carvacrol and thymol on growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* involved in lemon decay. *International Journal of Food Microbiology*, 158, 101–106. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.002>.
17. Navarro, D., Díaz-Mula, H. M., Guillén, F., Zapata, P. J., Castillo, S., Serrano, M., Valero, D., & Martínez-Romero, D. (2011). Reduction of nectarine decay caused by *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea* and *Penicillium digitatum* with *Aloe vera* gel alone or with the addition of thymol. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.009>
18. Rodríguez-López, M. I., Mercader-Ros, M. T., López-Miranda, S., Pellicer, J.A., Pérez-Garrido, A., Pérez-Sánchez, H., Núñez-Delicado, E., & Gabaldón, J.A. (2019). Thorough characterization and stability of HP- $\beta$ -cyclodextrin thymol inclusion complexes prepared by microwave technology: A required approach to a successful application in food industry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 1322–1333. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9307>
19. Serrano-Martínez, A., Fortea, M. I., Lucas-Abellán, C., López-Miranda, S., Mercader, M. T., Núñez-Delicado, E., & Gabaldón, J.A. (2016). Protective effect of cyclodextrins on the quality parameters of roast preserved pepper. *Food Science and Technology International*, 22, 565–573. <https://doi.org/10.1177/1082013216631143>
20. Ciobanu, A., Landy, D., & Fourmentin, S. (2013). Complexation efficiency of cyclodextrins for volatile flavor compounds. *Food Research International*, 53, 110–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.048>
21. Lucas-Abellán, C., Mercader-Ros, M. T., Zafrilla, M. P., Fortea, M. I., Gabaldón, J. A., & Núñez-Delicado, E. (2008). ORAC-fluorescein assay to determine the oxygen radical absorbance capacity of resveratrol complexed in cyclodextrins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2254–2259

22. Serna-Escolano, V., Serrano, M., Valero, D., Rodríguez-López, M. I., Gabaldón, J. A., Castillo, S., Guillén F., Zapata, P. J., & Martínez-Romero, D. (2019a). Effect of thymol and carvacrol encapsulated in HP- $\beta$ -cyclodextrin by two inclusion methods against *Geotrichum citri-aurantii*. *Journal of Food Science*, 84, 1513-1521. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14670>
23. Rodríguez-López, M. I., Mercader-Ros, M. T., Pellicer, J. A., V. M. Gómez-López, V. M., Martínez-Romero, D., Núñez-Delicado, E., & Gabaldón, J. A. (2020). Evaluation of monoterpene-cyclodextrin complexes as bacterial growth effective hurdles. *Food Control*, 108, 106814. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106814>
24. Ramezani, A., Azadi, M., Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R., & Saharkhiz, M. J. (2016). Effect of *Zataria multiflora* Boiss and *Thymus vulgaris* L. essential oils on black rot of 'Washington Navel' orange fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 112, 152-158. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.10.011>
25. Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R.L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and Interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3, 12.1-24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>
26. Bagamboula, C. F., Uyttendaele, M., & Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21, 33-42. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00046-7)
27. Perina, F. J., Amaral, D. C., Fernandes, R. S., Labory, C. R. G. Teixeira, G. A., & Alves, E. (2015). *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, 1371-1378. <https://doi.org/10.1002/ps.3933>
28. Valencia-Chamorro, S. A., Pérez-Gago, M. B., del Río, M. A., & Palou, L. (2009). Curative and preventive activity of hydroxypropyl methylcellulose lipid edible composite coatings containing antifungal food additives to control citrus postharvest green and blue moulds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2770-2777. <https://doi.org/10.1021/jf803534a>
29. Sameza, M. L., Nguemng Mabou, L. C., Tchameni, S. N., Boat Bedine, M. A., Tchoumboungang, F., Jazet Dongmo, P. M., & Boyom Fekam, F. (2016). Evaluation of clove essential oil as a mycobiocide against *Rhizopus stolonifer* and *Fusarium solani*, tuber rot causing fungi in yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Journal of Phytopathology*, 164, 433-440
30. Montesinos-Herrero, C., & Palou, L. (2010). Combination of physical and low-toxicity chemical postharvest treatments for integrated disease management of citrus fruit: a review. *Stewart Postharvest Review*, 6, 1-11. <https://doi.org/10.2212/spr.2010.1.1>
31. Serrano, M., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Guillén, D., & Valero, M. (2005). The use of the natural antifungal compounds improves the beneficial effect of MAP in sweet cherry storage. *Innovative Food Science and Emerging*, 6, 115-123. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.09.001>
32. Valverde, J. M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Serrano, M., & Valero, D. (2005). Improvement of table grapes quality and safety by the combination of modified

atmosphere packaging (MAP) and eugenol, menthol, or thymol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7458-7464. <https://doi.org/10.1021/jf050913i>

33. Tian, J., Ban, X. Q., Zeng, H, He, J. S., Huang, B., & Wang, Y. W. (2011). Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 464–470. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.023>

34. Jhalegar, M. D. J., Sharma, R. R., & Singh, S.D. (2015). In vitro and in vivo activity of essential oils against major postharvest pathogens of Kinnow (*Citrus nobilis* × *C. deliciosa*) mandarin. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 229–2237. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1281-2>

35. Martínez-Romero, D., Guillén, F., Valverde, J.M., Bailén, G., Zapata, P.J., Serrano, M., Castillo, S., & Valero, D. (2007). Influence of carvacrol on survival of *Botrytis cinerea* inoculated in table grapes. *Int. J. Food. Microbiol.* 115, 144–148. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.015>

36. Jin, P., Wang, H., Zhang, Y., Huang, Y., Wang, L., Wang, L., & Zheng, Y. (2017). UV-C enhances resistance against gray mold decay caused by *Botrytis cinerea* in strawberry fruit. *Scientia Horticulturae*, 225, 106-111. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.06.062>

37. Singh, R., Rastogi, S., & Dwivedi, U. N. (2010). Phenylpropanoid metabolism in ripening fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 398–416. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00116.x>

38. Bill, M., Sivakumar, D., Korsten, L., & Thompson, A. K. (2014). The efficacy of combined application of edible coatings and thyme oil in inducing resistance components in avocado (*Persea americana* Mill.) against anthracnose during post-harvest storage. *Crop Protection*, 64, 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.015>

39. Serna-Escolano, V., Valverde, J. M., García-Pastor, M. E., Valero, D., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Zapata, P. J., & Serrano, M. (2019b). Pre-harvest methyl jasmonate treatments increase antioxidant systems in lemon fruit without affecting yield or other fruit quality parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 5035-5043. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9746>

40. Perumal, A. B., Sellamuthu, P. S., Nambiar, R. B., & Sadiku, E. R. (2017). Effects of essential oil vapour treatment on the postharvest disease control and different defence responses in two mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *Food and Bioprocess Technology*, 10, 1131-1141. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1891-6>

41. Jin, P., Wu, X., Xu, F., Wang, X., Wang, J., & Zheng, Y. (2012). Enhancing antioxidant capacity and reducing decay of Chinese bayberries by essential oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60, 3769-3775. <https://doi.org/10.1021/jf300151n>

42. Li, H., Sou, J., Han, Y., Liang, C, Jin, M., Zhang, Z., & Rao, J. (2017). Effects of oxalic acid treatment on lignification and related enzymes activities in 'Huayou' kiwifruit during cold storage. *Acta Horticulturae Sinica*, 44, 1085-1093. <https://doi.org/10.16420/j.issn.0513-353x.2016-0718>

---

# CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---





## CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cultivo del limón (*Citrus limon* (L.) Burm. f) se localiza principalmente en los países que forman parte de la región tropical y subtropical del planeta. Es un fruto muy apreciado por consumidores de todo el mundo, con un crecimiento constante que se inicia en la década de 1980 y se mantiene hasta la actualidad (El-Otmani y col., 2011). El aspecto visual, la frescura y la firmeza son factores clave que definen la calidad externa del limón, mientras que los principales parámetros de calidad interna son la acidez y el potencial antioxidante, siendo estos atributos en su conjunto los que definen en gran medida la aceptación y la decisión de compra por parte del consumidor (Lado y col., 2018). Una de las características más importantes es el sabor, el cual depende principalmente de la proporción entre azúcares y ácidos orgánicos, mientras que el aroma depende de los compuestos volátiles presentes en los aceites esenciales (monoterpenos y sesquiterpenos), acumulados en las glándulas oleosas de la piel del limón (Asencio y col., 2018) Estos factores hacen que el limón sea muy utilizado en cocina como aderezo, aromatizante y también consumido en forma de zumo.

Por otra parte el limón es un fruto rico en compuestos bioactivos, siendo los más relevantes los carotenoides, el ácido ascórbico y los compuestos fenólicos, principalmente flavonoides (eriocitrina y hesperidina), los cuales determinan su actividad biológica (González-Molina y col., 2010). Los limones son frutos conocidos por su potencial antioxidante, el cual está directamente relacionado con el contenido en fenoles totales (CFT), que varía en un rango de 100 a 700 mg 100 g<sup>-1</sup> de peso fresco en el flavedo y de 20 a 200 mg 100 g<sup>-1</sup> en el zumo en el momento de la recolección comercial (Asencio y col., 2018; Klimek-Szczykutowicz y col., 2020). En las variedades utilizadas en esta Tesis Doctoral el mayor CFT se encontró en el flavedo de la variedad 'Verna' (≈ 500 mg 100 g<sup>-1</sup> peso fresco) mientras que en el zumo fue mayor en la variedad 'Fino' (≈ 60 mg 100 g<sup>-1</sup>). Estos atributos están determinados, en parte, por diferentes factores como el manejo del cultivo o el patrón, pero tal y como se ha podido observar en los experimentos que se han realizado, la etapa de crecimiento y maduración en la que se encuentre el fruto en el momento de su



recolección es fundamental, ya que el potencial antioxidante del fruto en el flavedo y el zumo puede disminuir más de un  $\approx 30$  % durante el desarrollo.

En los últimos años, se han aplicado diferentes compuestos en precosecha para incrementar los atributos de calidad en naranjas y mandarinas en el momento de la recolección, siendo los principales efectos un mayor tamaño, peso, firmeza, color y potencial antioxidante (Garmendia y col., 2019). Sin embargo, para el limón no se ha publicado ningún resultado sobre el efecto del uso de elicitores en pre-cosecha o en post-cosecha.

Por esta razón se inició un experimento en el que fueron aplicados jasmonato de metilo (JaMe) y ácido oxálico (AO) durante la pre-cosecha con el objetivo de mejorar la calidad del fruto y en consecuencia su vida útil. JaMe es un compuesto orgánico volátil que regula la germinación de las semillas, el crecimiento de plantas, los sistemas de defensa y el proceso de maduración y senescencia de los frutos (Ahmad y col., 2016). Mientras que el AO es un ácido orgánico presente de forma natural en las plantas, cuyo mecanismo de acción es aún desconocido. Sin embargo, en mangos ya recolectados que fueron tratados con AO mediante inmersión en baño, relacionaron su efecto con la activación de los sistemas antioxidantes del fruto que intervinieron en la eliminación de los compuestos reactivos del oxígeno (ROS) (Ding y col., 2007). Además, en kiwis tratados con AO en post-cosecha se logró mantener unos niveles de ácido ascórbico y ATP más elevados (Liang y col., 2017). La mayoría de los resultados publicados sobre frutos tratados con JaMe y AO se han realizado en experimentos post-cosecha, con el objetivo de mejorar su resistencia al estrés abiótico producido durante el período de almacenamiento, aumentando la resistencia sistémica adquirida, lo que al mismo tiempo también reducía la incidencia de podredumbres causadas por el ataque de hongos fitopatógenos (García-Pastor y col., 2020; Wang y col., 2020). Consiguiendo importantes avances en la cereza y la ciruela tratadas con AO en post-cosecha, en las cuales se indujo un retraso en el proceso de senescencia del fruto durante la etapa de almacenamiento refrigerado, aumentando así su vida útil (Matínez-Esplá y col., 2014; Martínez-Esplá y col., 2019).

Uno de los efectos más importantes en los frutos de árboles tratados con JaMe y AO se observó cuando se midió la actividad de las principales enzimas

antioxidantes, catalasa (CAT), peroxidasa (POD) y ascorbato peroxidasa (APX) en el flavedo y el CFT en el flavedo y el zumo del limón. En los frutos de los árboles tratados con JaMe, los mejores resultados se obtuvieron a la dosis 0,1 mM, en los cuales se incrementó el CFT un 65 % y un 39 % en el flavedo y el zumo, respectivamente, en la variedad 'Fino'. En cuanto a la variedad 'Verna' el efecto fue parecido, con una mejora del 36 % en el flavedo y del 10% en el zumo. La dosis con los mejores resultados en limón coincide con la utilizada en frambuesa (Flores y Ruiz Del Castillo., 2015), y además es parecida a la concentración más efectiva publicada para ciruela, que fue de 0,5 mM (Zapata y col., 2014), en ambos frutos se produjo un aumento notable del CFT. Mientras, en los frutos de los árboles tratados con AO los mejores resultados en el CFT se consiguieron a la concentración 1 mM, la cual fue la mitad de la dosis más efectiva aplicada en cereza y también fue 5 veces menor que la mejor dosis aplicada en melocotón, para conseguir un incremento en el CFT parecido (Martínez-Esplá y col., 2014; Razavi y Hajilou., 2016). Esta respuesta al aplicar dichos elicitores fue atribuida a la estimulación de la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa, la cual es una enzima clave de la ruta de biosíntesis de fenoles, lo que conduce a la acumulación de terpenoides, alcaloides y compuestos fenólicos (Serrano y Valero., 2010).

Además, en el momento de la recolección se pudo observar que en los frutos de árboles tratados con JaMe 0,1 mM y AO 1 mM la actividad de las enzimas antioxidantes fue mayor que en los frutos control. Este efecto ha sido observado en ciruelas tratadas en pre-cosecha con JaMe, donde el incremento de la actividad de las enzimas POD, CAT y APX se relacionó con un retraso en el proceso de maduración del fruto y un incremento en su vida útil (Zapata y col., 2014). Además, en berenjenas tratadas con se describió cómo un incremento de actividad de las enzimas CAT y POD provocado por los tratamientos con JaMe estaba relacionado con un aumento en la expresión de sus genes codificantes (Fan y col., 2016). En cuanto a los tratamientos pre-cosecha con AO, en ciruelas se publicó su utilidad retrasando el proceso de maduración al mejorar la actividad de las enzimas antioxidantes, además de otros compuestos como los fenoles, los carotenoides y las antocianinas (Martínez-Esplá y col., 2019). Tanto los fenoles como las enzimas antioxidantes

están involucradas en la captación de compuestos ROS, los cuales son los responsables del estrés oxidativo y cuya acción puede desestabilizar los lípidos que forman parte de la membrana celular, participando así en el proceso de maduración de la fruta, en los daños por frío o en el mecanismo que utilizan gran parte de los hongos fitopatógenos para iniciar su proceso de infección (Das y Roychoudhury., 2016). Es fundamental añadir que durante el almacenamiento refrigerado se mantuvieron los incrementos que se encontraron en el momento de la recolección entre los frutos de árboles tratados con JaMe, AO y los controles. Lo que repercutiría en que los frutos con tratamiento tuvieran más capacidad para neutralizar los compuestos ROS que intervienen en el proceso de maduración del fruto, como ya se ha mencionado previamente.

En los frutos que fueron tratados con AO se pudo observar un efecto claro sobre los parámetros de calidad del limón en el momento de la recolección y tras el almacenamiento refrigerado. Estos frutos experimentaron menores pérdidas de peso y mantuvieron una firmeza superior a los frutos sin tratamiento desde el inicio hasta el final del experimento, lo que coincide con lo publicado en granadas (García-Pastor y col., 2020) y mangos (Razzaq y col., 2015). En cuanto a los SST y la AT fueron un  $\approx 7\%$  superiores en los frutos con tratamiento, lo que podría indicar que se consiguió ralentizar el ritmo metabólico del fruto, reduciendo el consumo de estos sustratos (Hodges y col., 2004). Este incremento en la calidad inicial de los frutos tratados con AO 1 mM influyó en una menor incidencia de podredumbres. Estos resultados coinciden con los publicados en kiwis tratados con AO 5 mM en precosecha, encontrando un aumento significativo de los SST y los sistemas antioxidantes respecto a los controles, resultados que se pudieron relacionar con una menor incidencia de *Penicillium expansum* durante la conservación a temperatura ambiente (Zhu y col., 2016). Los tratamientos con JaMe no afectaron a los parámetros de calidad de los frutos en el momento de la recolección, ni durante el almacenamiento refrigerado, estando al mismo nivel que los frutos sin tratar. Lo que contrasta con lo observado en uva de mesa donde los tratamientos con JaMe incrementaron el contenido en SST y disminuyeron las pérdidas de

firmeza, dando como resultado unas bayas más turgentes (García-Pastor y col., 2019).

Los resultados que se obtuvieron hasta el momento nos indicaron la importancia de los sistemas antioxidantes en la vida útil del fruto durante la post-cosecha. Con el objetivo de optimizar los tratamientos en campo y, a continuación, encontrar el momento adecuado en el que el fruto tuviera la máxima estimulación de los sistemas antioxidantes para ser recolectado, se inició un experimento que estudiaba en profundidad el efecto de los tratamientos con JaMe y AO a las dosis con los mejores resultados 0,1 mM y 1 mM, respectivamente, sobre la actividad de las enzimas antioxidantes y el CFT durante el crecimiento y la maduración de los frutos en árboles de la variedad 'Fino'.

Cuando se aplicó JaMe 0,1 mM se observó que la activación de las enzimas era diferente, la CAT permaneció activa desde el primer tratamiento hasta el último, mientras que la APX y la POD aumentaban significativamente a los 3-4 días e iban disminuyendo hasta el nivel de los controles prácticamente hasta el siguiente tratamiento, momento en el que su actividad volvía a aumentar. En el caso del CFT en el flavado de limones de árboles tratados con JaMe, el incremento se observó desde el primer tratamiento y se mantuvo estable durante todo el tiempo que duró el muestreo, en el caso del CFT en el zumo fue a partir del segundo tratamiento cuando las diferencias fueron apreciables. De forma general se pudo observar cómo durante el crecimiento y la maduración del fruto en el árbol tanto la actividad de las enzimas antioxidantes como el CFT iba disminuyendo.

Respecto a los árboles tratados con AO 1 mM se comprobó que la actividad de las enzimas antioxidantes se expresaba de diferente manera. Mientras que la actividad de las enzimas APX y POD disminuían durante el desarrollo del fruto en el árbol, la actividad de la enzima CAT se mantenía más estable desde el inicio hasta el final del experimento. Por otra parte, el CFT también aumentó en los frutos de árboles tratados con AO 1 mM tanto en el flavado como en el zumo respecto a los frutos de árboles sin tratamiento, manteniéndose las diferencias estables durante el periodo de crecimiento y maduración del fruto en el árbol hasta el momento de la recolección. Durante

los 35 días de almacenamiento aumentó la actividad de las enzimas antioxidantes y el CFT tanto en los frutos de árboles tratados con AO como en los controles, pero las diferencias se mantuvieron estables.

Finalmente, no se observó ningún efecto sobre la producción y maduración del fruto en el árbol (color o tamaño) cuando se aplicó JaMe y AO a las concentraciones 0,1, 0,5 y 1 mM. Efecto contrario a lo publicado en granadas tratadas con JaMe y AO a las concentraciones 1, 5 y 10 mM, donde se consiguió mejorar significativamente ( $p < 0,05$ ) la producción (García-Pastor y col., 2019; García-Pastor y col., 2020). Sin embargo, los resultados vistos en limón son semejantes a los publicados en ciruela, en cuyo caso tampoco se incrementó la producción ni se aceleró el proceso de maduración del fruto en el árbol (Martínez-Esplá y col., 2019).

Estos resultados mostraron por primera vez la respuesta de los sistemas antioxidantes a los tratamientos mensuales con JaMe y AO en pre-cosecha, y la importancia de añadir un último tratamiento 3 o 4 días antes de la recolección, lo que permitió estimular los sistemas antioxidantes de forma que se consiguió un fruto más resistente al estrés oxidativo. Dicho efecto fue relacionado con un retraso en el proceso de maduración del fruto durante el almacenamiento, que en el caso de los tratamientos con AO resultó en una menor incidencia de podredumbres. Sin embargo, para mantener el efecto conseguido con los tratamientos pre-cosecha y limitar el ataque producido por los hongos fitopatógenos es necesario desarrollar una estrategia de control en post-cosecha.

Las pérdidas económicas provocadas por infecciones postcosecha representan uno de los problemas principales en la citricultura española y mundial (Eckert y Eaks, 1989). La probabilidad de que se inicie una infección depende de la cantidad de inóculo presente en la superficie del fruto, de la susceptibilidad del fruto y de las condiciones ambientales, principalmente. Se desconoce el límite crítico de contaminación fúngica a partir de la cual el riesgo de generar la enfermedad aumenta. Sin embargo, una correcta limpieza y desinfección de las centrales hortofrutícolas colabora en reducir la incidencia de podredumbres, ya que se minimiza la posibilidad de que se encuentren cepas resistentes a los tratamientos post-cosecha (Salvador y col., 2012).

En este sentido la actividad microbiana es una de las principales causas de pérdida de calidad y de seguridad en muchos alimentos. En el caso de los cítricos estas pérdidas están atribuidas principalmente a los hongos *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* y *Geotrichum citri-aurantii* (Baldwin y col., 2014). En concreto, *G. citri-aurantii* es un hongo cuya incidencia aumenta exponencialmente cuando las condiciones de campo son de alta humedad. Su acción se desarrolla en las capas más profundas de la piel del fruto, por lo que la efectividad de los tratamientos post-cosecha se reduce (Salvador y col., 2012).

En las últimas décadas el interés por la utilización de compuestos naturales en la industria alimentaria está aumentando, con el objetivo de mejorar la sostenibilidad de los procesos actuales, ya que existe una percepción negativa en los consumidores hacia los conservantes 'artificiales' (Baldwin y col., 2014). Al efecto, los aceites esenciales (AEs) han sido utilizados de forma tradicional como aromatizantes, pero en los últimos años se ha relacionado su uso con una importante actividad antimicrobiana, lo que apoya su utilización como conservante en alimentación (D' agostino y col., 2019). Además, muchos AEs han sido reconocidos como seguros (GRAS) para la salud de la población general por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) en Estados Unidos y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (Prakash y col., 2012).

Los AEs están constituidos por multitud de compuestos diferentes, sin embargo, hay dos compuestos con una extensa bibliografía que los relaciona con una potente actividad antimicrobiana, timol y carvacrol. Por ejemplo, se utilizó timol para controlar el crecimiento de *Salmonella entérica*, relacionando su función principal con un efecto sobre las proteínas que forman parte de la membrana celular, lo que modifica la permeabilidad (Di Pasqua y col., 2010). Respecto al carvacrol su función se relacionó principalmente con la modificación de la composición de los ácidos grasos que forman la membrana celular. Tanto la función de timol como la de carvacrol están relacionadas con los grupos hidroxilo y el sistema de electrones deslocalizados que forman parte de su estructura aromática (Chavan y Tupe., 2014).

El principal inconveniente al utilizar timol y carvacrol es que son compuestos muy volátiles y químicamente lábiles como resultado de la oxidación o debido a otras interacciones químicas. Además, son compuestos con una solubilidad en agua muy reducida, por lo que para conseguir un efecto homogéneo se requieren elevadas concentraciones. Y finalmente, poseen un olor y sabor intensos, lo que podría modificar las características sensoriales del fruto (Pandey y col., 2017). Para intentar solventar estos problemas la literatura ofrece la encapsulación como alternativa, ya que esta técnica protege el principio activo de la humedad y las condiciones ambientales, mejorando así su estabilidad, solubilidad y efectividad.

Por lo tanto, se evaluó el efecto de timol y carvacrol encapsulados en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrinas (HP- $\beta$ -CDs) utilizando dos metodologías, 'Microondas' (MO) y 'Slurry' (S), en relación con su actividad fungicida. Para realizar estos experimento se seleccionó el hongo *G. citri-aurantii* por ser un microorganismo difícil de controlar en las centrales hortofrutícolas con los tratamientos actuales, como ya se ha mencionado previamente.

Los resultados mostraron que el método de encapsulación más efectivo fue el de MO, lo que coincidió con resultados previos sobre la inhibición de *Staphylococcus aureus* con timol y carvacrol encapsulados en HP- $\beta$ -CDs utilizando dicha metodología, se requirió una menor concentración para alcanzar una tasa de inhibición parecida (Rodríguez-Lopez y col., 2018). Las diferencias observadas entre ambos métodos de encapsulación pudieron estar relacionadas con la velocidad de liberación del monoterpeno, lo que fue descrito por Tao y col (2014), el cual mencionó la importancia de la formación del complejo y la liberación de la sustancia activa para un control microbiológico más efectivo. Respecto a los compuestos activos, timol controló el crecimiento mejor que carvacrol a concentraciones por encima de los 25 mM, lo que se debió, en parte, a que el timol presentó un mejor ratio de encapsulación que el carvacrol. En este sentido estudios realizados para el control de *Colletotrichum acutatum* obtuvieron resultados parecidos a los mencionados en esta Tesis, ya que el timol tenía mayor efecto fungicida que el carvacrol (Numpaque-Espinosa y col., 2011). Sin embargo, no siempre el timol tiene el mejor efecto controlando el crecimiento de los microorganismos, ya que



en cultivos en placa con *Botrytis cinerea*, el carvacrol redujo la formación de esporas en mayor proporción (Martínez-Romero y col., 2007).

El siguiente paso fue intentar controlar el crecimiento de *G. citri-aurantii* en frutos inoculados utilizando el tratamiento y la dosis con los mejores resultados observados en los experimentos previos. Así, se realizaron tratamientos preventivos y curativos con timol encapsulado en HP- $\beta$ -CDs utilizando la metodología de MO, a las concentraciones 25 y 50 mM. Además se incorporó propiconazol como agente de control comercial específico para dicho hongo.

El efecto de los tratamientos aplicados de forma preventiva redujo la incidencia de podredumbres y la severidad de los daños causados por el hongo en mayor proporción que cuando los tratamientos fueron aplicados de forma curativa, en este sentido la eficacia de los tratamientos para el control de la enfermedad se redujo visiblemente, efecto que se ajustó a lo publicado por Sameza y col., (2016). Es importante señalar que con independencia del modo en el que se aplicó el tratamiento, timol-HP- $\beta$ -CDs 50 mM es el que mejor controló el desarrollo del hongo en ambas situaciones. Estos resultados coincidieron con los publicados previamente por Perina y col., (2015) en *Alternaria alternata*, que mostraron cómo los tratamientos con timol previnieron la formación del apesorio, lo que redujo la velocidad durante la etapa de infección temprana.

También se pudo observar cómo los tratamientos post-cosecha tuvieron efecto sobre los parámetros de calidad del fruto, por ejemplo, las pérdidas de peso se vieron reducidas debido, probablemente, a una disminución en la tasa de respiración. Siendo el tratamiento con timol-HP- $\beta$ -CDs 50 mM el que mejor resultado produjo, lo que coincidió con lo publicado en naranjas tratadas con aceites esenciales extraídos de *Thymus vulgaris* e inoculadas con *Alternaria citri* (Ramezani y col., 2016)

Además, se observó que los limones tratados con timol-HP- $\beta$ -CDs 50 mM presentaron mayor CFT que los otros tratamientos, lo que pudo ser relacionado con la activación de la enzima fenilalanina amonio liasa, puesto que estos resultados coincidieron con lo publicado recientemente al aplicar



aceite esencial de clavo para el control de *P. digitatum* en mandarinas, donde se estimulaba la expresión del gen codificante (Jin y col., 2017; Chen y col., 2019). En relación a las enzimas antioxidantes (APX, CAT y POD) de los frutos tratados con timol-HP- $\beta$ -CDs 50 mM, tuvieron una actividad superior al resto de tratamientos. Este efecto también ha sido descrito en mangos y aguacates tratados con timol, en los cuales el compuesto induce la producción de peróxido de hidrógeno que a su vez induce la expresión de las enzimas antioxidantes, por lo que aumenta la capacidad de neutralizar compuestos ROS (Bill y col., 2014; Perumal y col., 2017). Por lo tanto, el tratamiento con timol-HP- $\beta$ -CDs 50 mM no sólo tiene un efecto directo controlando el crecimiento de *G. citri-aurantii*, sino que también estimula los sistemas antioxidantes del fruto, lo que retrasa el proceso de maduración y limita la pérdida de calidad.



---

# CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

---





## CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

1. En el flavedo de los frutos de árboles tratados en pre-cosecha con jasmonato de metilo (JaMe) y ácido oxálico (AO) a las dosis 0,1, 0,5 y 1 mM, se incrementó tanto el contenido en fenoles totales (CFT) como la actividad de las enzimas antioxidantes (CAT, POD y APX) en el momento de la recolección. Encontrando los mejores resultados a las concentraciones de JaMe 0,1 mM y AO 1 mM. Se observó que este efecto se mantuvo durante los 35 días que duró el almacenamiento a 10 °C. Además, en la etapa de crecimiento y maduración del fruto en el árbol se pudo establecer que el CFT y la actividad de las enzimas antioxidantes comenzaron a estimularse a partir de la primera aplicación.
2. En el momento de la recolección, los frutos de árboles tratados con AO tuvieron mayor firmeza, sólidos solubles totales y acidez titulable que los controles, siendo la mejor dosis de AO 1 mM. Además, durante los 35 días de almacenamiento a 10 °C, los tratamientos con AO 1 mM tuvieron menores pérdidas de peso y mantuvieron una firmeza, sólidos solubles totales y acidez titulable más elevadas. Finalmente, en los lotes tratados con AO 1 mM se pudo establecer un efecto sobre la disminución en la incidencia de podredumbres. Mientras que en los frutos de árboles tratados con JaMe no se observaron efectos negativos sobre la calidad del fruto en el momento de la recolección y durante el almacenamiento a 10 °C, ya que los parámetros se encontraban en valores similares a los controles.
3. Los tratamientos pre-cosecha con JaMe y AO no afectaron a la producción total del cultivo ni al proceso de maduración de los limones en el árbol, ya que parámetros como el tamaño, el peso o el color fueron idénticos a los controles, recolectándose todos los frutos en la misma fecha.

4. Los monoterpenos (timol y carvacrol) encapsulados en HP- $\beta$ -CDs mediante el método de microondas (MO), presentaron un mayor nivel de inclusión al formar el complejo, lo que relacionado con una mayor velocidad de liberación permitió un mejor control del hongo *Geotrichum citri-aurantii* que el método de encapsulación conocido como 'Slurry'. Además, al comparar ambos monoterpenos timol controló de forma más efectiva el crecimiento de *G. citri-aurantii* que carvacrol a concentraciones superiores a 25 mM.
5. El tratamiento preventivo con el complejo timol-HP- $\beta$ -CD a la concentración 50 mM utilizando la metodología de encapsulación con MO, controló de forma más efectiva la enfermedad en limones inoculados con *G. citri-aurantii* que el resto de tratamientos, incluido el compuesto recomendado comercialmente, el propiconzol.
6. Durante el almacenamiento a 10 °C, los limones tratados con timol-HP- $\beta$ -CD a la concentración 50 mM presentaron menores pérdidas de peso y tasa de respiración que el resto de tratamientos. Además, el CFT y la actividad de las enzimas antioxidantes fueron también superiores.
7. Por lo tanto, los tratamientos con JaMe y AO aplicados en pre-cosecha junto a los tratamientos post-cosecha con timol encapsulado en HP- $\beta$ -CDs, podrían ser considerados como unas herramientas seguras y respetuosas con el medio ambiente, con el potencial para mejorar los atributos de calidad de los frutos durante el crecimiento y maduración del fruto en el árbol, en el momento de la recolección y durante el almacenamiento, reduciendo las pérdidas producidas por la acción de los hongos fitopatógenos.

---

# CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA

---





## CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA

### - A -

- Agustí-Fonfria, M., Mesejo-Conejo, C., Reig-Valor, C (Eds). (2000). Citricultura. Mundi-prensa (Madrid).
- Ahmad, P., Rasool, S., Gul, A., Sheikh, S. A., Akram, N. A., Ashraf, M., Kazi, A. M., & Gucl, S. (2016). Jasmonates: Multifunctional roles in stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 7: 813. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00813>
- Al-Rawashdeh, N. A. F., Al-Sadeh, K. S., & Al-Bitar, M. B. (2013). Inclusion complexes of sunscreen agents with  $\beta$ -cyclodextrin: Spectroscopic and molecular modeling studies. *Journal of Spectroscopy*, 1: 841409. <https://doi.org/10.1155/2013/841409>
- Amoros-Castañer, M (Ed). (2003). Producción de agrios. Mundi-prensa (Madrid).
- Ancillo, G., y Medina, A. (2015). Monografías botánicas: los cítricos. Universidad de València (Valencia).
- AOAC. (1990). Official methods of analysis of the AOAC. Method 962.19. Association of official analytical chemists (Arlington).
- Arena, M., Auteri, D., Barmaz, S., Bellisai, G., Brancato, A., Brocca, D., Bura, L., Byers, H., Chiusolo, A., Court Marques, D., Crivellente, F., De Lentdecker, C., De Maglie, M., Egsmose, M., Erdos, Z., Fait, G., Ferreira, L., Goumenou, M., Greco, L., Ippolito, A., Istace, F., Jarrah, S., Kardassi, D., Leuschner, R., Lythgo, C., Oriol-Magrans, J., Medina, P., Miron, I., Molnar, T., Nougadere, A., Padovani, L., Parra-Morte, J.M., Pedersen, R., Reich, H., Sacchi, A., Santos, M., Serafimova, R., Sharp, R., Stanek, A., Streissl, F., Sturma, J., Szentes, C., Tarazona, J., Terron, A., Theobald, A., Vagenende, B., Verani, A., & Villamar-Bouza, L. (2017). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance propiconazole. *EFSA Journal*, 15: 4887. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4887>
- Asencio, A. D., Serrano, M., García-Martínez, S., & Pretel, M. T. (2018). Organic acids, sugars, antioxidant activity, sensorial and other fruit characteristics of nine traditional Spanish Citrus fruits. *European Food Research and Technology*, 244: 1497-1508. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3064-x>
- AILIMPO. (2020). Histórico de precios del limón 'Fino' y 'Verna' en origen. Disponible en: [https://www.ailimpo.com/documentos/Historico\\_Precios\\_Origen\\_AILIMPO.pdf](https://www.ailimpo.com/documentos/Historico_Precios_Origen_AILIMPO.pdf). (Acceso 27/01/2021).



Aziz, Z. A. A., Ahmad, A., Setapar, S. H. M., Karakucuk, A., Azim, M. M., Lokhat, D., Rafatullah, M., Ganash, M., Kamal, M. A., & Ashraf, G. M. (2018). Essential oils: extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential - a review. *Current Drug Metabolism*, 19: 1100-1110. <https://doi.org/10.2174/1389200219666180723144850>

**- B -**

Bai, C. C., Tian, B. R., Zhao, T., Huang, Q., & Wang, Z. Z. (2017). Cyclodextrin-catalyzed organic synthesis: reactions, mechanisms, and applications. *Molecules*, 22: 1475. <https://doi.org/10.3390/molecules22091475>

Baldwin, E. A., Bai, J., Plotto, A., & Ritenour, M. A. (2014). Citrus fruit quality assessment; producer and consumer perspectives. *Stewart Postharvest Review*, 10: 1-7.

Barkai-Golan, R., & Karadavid, R. (1991). Cellulolytic Activity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* Related to Fungal Growth and to Pathogenesis in Citrus Fruits. *Journal of Phytopathology*, 131: 2872-e. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1991.tb04572.x>

Bill, M., Sivakumar, D., Korsten, L., & Thompson, A. K. (2014). The efficacy of combined application of edible coatings and thyme oil in inducing resistance components in avocado (*Persea americana* Mill.) against anthracnose during post-harvest storage. *Crop Protection*, 64: 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.015>

Bodbodak, S., & Moshfeghifar, M. (2016). Advances in modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. In *Eco-Friendly Technology for Postharvest Produce Quality*. Wasim Siddiqui M. (Ed). Academic Press (Cambridge). 127-183 pp. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804313-4.00004-9>

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 1-2. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Brash, A. R., Baertschi, S. W., Ingram, C. D., & Harris, T. M. (1988). Isolation and characterization of natural allene oxides: Unstable intermediates in the metabolism of lipid hydroperoxides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85: 3382. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.10.3382>

Brewster, M. E., & Loftsson, T. (2007). Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 59: 645-666. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.012>

- C -

- Cai, X. F., Xu, C. X., Wang, X. L., Ge, C. H., & Wang, Q. H. (2015). The oxalic acid in plants: biosynthesis, degradation and its accumulation regulation. *Zhiwu Shengli Xuebao/Plant Physiology Journal*, 51: 267-272. <https://doi.org/10.13592/j.cnki.ppj.2014.0526>
- CAECV. (2020). Agricultura Ecológica (CAECV). Disponible en: <https://www.caecv.com/produccion-agraria/>. (Acceso: 08/04/2021)
- Castillo, S., Pérez-Alfonso, C. O., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Serrano, M., & Valero, D. (2014). The essential oils thymol and carvacrol applied in the packing lines avoid lemon spoilage and maintain quality during storage. *Food Control*, 35: 132–136. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.052>
- Castle, W. S. (1995). Rootstock as a fruit quality factor in citrus and deciduous tree crops. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 23: 383-394. <https://doi.org/10.1080/01140671.1995.9513914>
- Castle, W. S. (2010). A career perspective on citrus rootstocks, their development, and commercialization. *HortScience*, 45: 11-15. <https://doi.org/10.21273/hortsci.45.1.11>
- Chaudhary, V. B., & Patel, J. K. (2013). Cyclodextrin inclusion complex to enhance solubility of poorly water soluble drugs: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4: 68-76. [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.4\(1\).68-76](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.4(1).68-76)
- Chavan, P. S., & Tupe, S. G. (2014). Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. *Food Control*, 46: 115-120. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.007>
- Chen, C., Cai, N., Chen, J., & Wan, C. (2019). Clove essential oil as an alternative approach to control postharvest blue mold caused by *Penicillium italicum* in citrus fruit. *Biomolecules*, 9: 0197. <https://doi.org/10.3390/biom9050197>
- Chillet, M., Minier, J., Hoarau, M., & Meile, J.-C. (2020). Optimisation of the postharvest treatment with thymol to control mango anthracnose. *American Journal of Plant Sciences*, 11: 118087. <https://doi.org/10.4236/ajps.2020.118087>
- Compton, S. J., & Jones, C. G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, 151: 369-374. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90190-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90190-3)

Conesa, A., Manera, F. C., Brotons, J. M., Fernandez-Zapata, J. C., Simón, I., Simón-Grao, S., Alfosea-Simón, M., Martínez Nicolás, J. J., Valverde, J. M., & García-Sánchez, F. (2019). Changes in the content of chlorophylls and carotenoids in the rind of Fino 49 lemons during maturation and their relationship with parameters from the CIELAB color space. *Scientia Horticulturae*, 243: 252-260. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.08.030>

Cronjé, P. J. R. (2015). Could ethylene metabolism in lemon fruit influence peteca incidence. *Acta Horticulturae*, 1065: 184. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1065.184>

## - D -

D'agostino, M., Tesse, N., Fripiat, J. P., Machouart, M., & Debourgogne, A. (2019). Essential oils and their natural active compounds presenting antifungal properties. *Molecules* 24: 3713. <https://doi.org/10.3390/molecules24203713>

D'Aquino, S., Palma, A., Angioni, A., & Schirra, M. (2013). Residue levels and efficacy of fludioxonil and thiabendazole in controlling postharvest green mold decay in citrus fruit when applied in combination with sodium bicarbonate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 296-306. <https://doi.org/10.1021/jf304081z>

Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2: 53. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>

De Castro, R. D., de Souza, T. M. P. A., Bezerra, L. M. D., Ferreira, G. L. S., de Brito Costa, E. M. M., & Cavalcanti, A. L. (2015). Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* spp involved with infections in the oral cavity: An in vitro study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15: 417. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0947-2>

Deepthi-Priya, Y., Chowdary, Y.A., Murthy, T.E.G.K., & Seshagiri, B. (2011) Approaches for taste masking of bitter drugs: a review. *Journal of Advances in Drug Research*, 1: 58-67.

Deliopoulos, T., Kettlewell, P. S., & Hare, M. C. (2010). Fungal disease suppression by inorganic salts: a review. *Crop Protection*, 29: 1059-1075. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.05.011>

Dempsey, D. A., Vlot, A. C., Wildermuth, M. C., & Klessig, D. F. (2011). Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *The Arabidopsis Book*, 9: 0156. <https://doi.org/10.1199/tab.0156>

Di Pasqua, R., Mamone, G., Ferranti, P., Ercolini, D., & Mauriello, G. (2010). Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. *Proteomics*, 10: 0568. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900568>

Ding, Z. S., Tian, S. P., Zheng, X. L., Zhou, Z. W., & Xu, Y. (2007). Responses of reactive oxygen metabolism and quality in mango fruit to exogenous oxalic acid or salicylic acid under chilling temperature stress. *Physiologia Plantarum*, 130: 112-121. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00893.x>

Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., & Wilson, C. (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm?. *Postharvest Biology and Technology*, 52: 137-145. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.11.009>

## - E -

Eckert, J.W., y Eaks, I.L. (1989). Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. In the citrus industry. Reuter W., Calavan E.C. & Carman G.E. (Eds). California Press University (Berkeley). 179-260 pp.

El Guilli, M., Hamza, A., Clément, C., Ibriz, M., & Barka, E. A. (2016). Effectiveness of postharvest treatment with chitosan to control citrus green mold. *Agriculture (Switzerland)*, 6: 0012. <https://doi.org/10.3390/agriculture6020012>

El-Otmani, M., Ait-Oubahou, A., & Zacarías, L. (2011). *Citrus spp.*: orange, mandarin, tangerine, clementine, grapefruit, pomelo, lemon and lime. *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*, 62: 437. <https://doi.org/10.1533/9780857092762.437>

Eurostat. (2019). Organic crop area by agricultural production methods and crops (from 2012 onwards). Disponible en: [https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/org\\_cropar/default/table?lang=en](https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/org_cropar/default/table?lang=en). (Acceso: 03/03/2021).

## - F -

Fan, L., Shi, J., Zuo, J., Gao, L., Lv, J., & Wang, Q. (2016). Methyl jasmonate delays postharvest ripening and senescence in the non-climacteric eggplant (*Solanum melongena* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 120: 76-83. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.05.010>

Ferraz, L. P., Cunha, T. da, da Silva, A. C., & Kupper, K. C. (2016). Biocontrol ability and putative mode of action of yeasts against *Geotrichum citri-aurantii* in citrus fruit. *Microbiological Research*, 188–189: 72-79. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.012>

- Flores, G., & Ruiz del Castillo, M. L. (2015). Variations in ellagic acid, quercetin and myricetin in berry cultivars after preharvest methyl jasmonate treatments. *Journal of Food Composition and Analysis*, 39: 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.11.007>
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C., & Solano, R. (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology*, 5: 344-350. <https://doi.org/10.1038/nchembio.161>
- Faostat. (2019). Estadísticas del área y la producción de los cultivos en el mundo. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. (Acceso: 13/03/2021)
- FDA. (2014). US Food and Drug Administration. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/food-additive-status-list>. (Acceso: 08/03/2021)
- Francenia Santos-Sánchez, N., Salas-Coronado, R., Hernández-Carlos, B., & Villanueva-Cañongo, C. (2019). Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds. *IntechOpen*, 83815. <https://doi.org/10.5772/intechopen.83815>
- Fratemale, D., Giamperi, L., & Ricci, D. (2003). Chemical Composition and antifungal activity of essential oil obtained from in vitro plants of *Thymus mastichina* L. *Journal of Essential Oil Research*, 15: 278-281. <https://doi.org/10.1080/10412905.2003.9712142>
- Fuentes, L., Figueroa, C. R., & Valdenegro, M. (2019). Recent advances in hormonal regulation and cross-talk during non-climacteric fruit development and ripening. *Horticulturae*, 5: 45. <https://doi.org/10.3390/horticulturae5020045>

## - G -

- García Lidón, A., del Río-Conesa, J.A., Porrás-Castillo I., Fuster-Soler M.D., Ortuño-Tomás A. (2003). El limón y sus componentes bioactivos. *Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente (Murcia)*. 1-127 pp.
- García-Lor, A. (2013). Organización de la diversidad genética de los cítricos. Tesis Doctoral. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias y Universidad Politécnica de Valencia. (Valencia). 3-10 pp.
- García-Martín, J. F., Olmo, M., & García, J. M. (2018). Effect of ozone treatment on postharvest disease and quality of different citrus varieties at laboratory and at industrial facility. *Postharvest Biology and Technology*, 137: 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.11.015>

- García-Pastor, M. E., Giménez, M. J., Valverde, J. M., Guillén, F., Castillo, S., Martínez Romero, D., Serrano, M., Valero, D., & Zapata, P. J. (2020). Preharvest application of oxalic acid improved pomegranate fruit yield, quality, and bioactive compounds at harvest in a concentration dependent manner. *Agronomy*, 10: 1522. <https://doi.org/10.3390/agronomy10101522>
- García-Pastor, M. E., Serrano, M., Guillén, F., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Valero, D., & Zapata, P. J. (2019). Methyl jasmonate effects on table grape ripening, vine yield, berry quality and bioactive compounds depend on applied concentration. *Scientia Horticulturae*, 247: 380-389. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.12.043>
- García-Pastor, M. E., Serrano, M., Guillén, F., Giménez, M. J., Martínez-Romero, D., Valero, D., & Zapata, P. J. (2020). Preharvest application of methyl jasmonate increases crop yield, fruit quality and bioactive compounds in pomegranate 'Mollar de Elche' at harvest and during postharvest storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100: 145-153. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10007>
- García-Pastor, M. E., Zapata, P. J., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Valero, D., Serrano, M., & Guillén, F. (2020). Preharvest salicylate treatments enhance antioxidant compounds, color and crop yield in low pigmented-table grape cultivars and preserve quality traits during storage. *Antioxidants*, 9: 0832. <https://doi.org/10.3390/antiox9090832>
- Garmendia, A., Beltrán, R., Zornoza, C., García-Breijo, F. J., Reig, J., & Merle, H. (2019). Gibberellic acid in *Citrus spp.* Flowering and fruiting: A systematic review. *Plos One*, 14: e0223147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223147>
- Ghosh, A., Biswas, S., & Ghosh, T. (2011). Preparation and evaluation of silymarin  $\beta$ -cyclodextrin molecular inclusion complexes. *Journal of Young Pharmacists*, 3: 205-210. <https://doi.org/10.4103/0975-1483.83759>
- Giménez, M. J., Martínez-Esplá, A., Gironés-Vilaplana, A., Valverde, J. M., Martínez-Romero, D., & Castillo, S. (2019). Effect of preharvest application of methyl salicylate, oxalic acid and methyl jasmonate on yield and quality of 'Sweet Heart' cherries. *Acta Horticulturae*, 1256: 71. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1256.71>
- Golding, J. (2019). A newsletter for Australian citrus growers and packers. *Packer Newsletter*, 119: 1-4
- González-Molina, E., Domínguez-Perles, R., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2010). Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51: 327-345. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.07.027>

Graham, J., & Feichtenberger, E. (2015). Citrus *Phytophthora* spp diseases: Management challenges and successes. *Journal of Citrus Pathology*, 2: 1-11.

Gündüz, G. T., Juneja, V. K., & Pazir, F. (2015). Application of Ultraviolet-C light on oranges for the inactivation of postharvest wound pathogens. *Food Control*, 57: 9-13. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.04.003>

## - H -

Hanif, S., Hafeez, R., Akram, W., Ashfaq, M., & Ali, A. (2016). First report of sclerotinia fruit rot of *Citrus paradisi* caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in Pakistan. *Plant Disease*, 100: 1165. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-15-1165-PDN>

Hodges, D. M., Lester, G. E., Munro, K. D., & Toivonen, P. M. A. (2004). Oxidative stress: Importance for postharvest quality. *HortScience*, 39: 924. <https://doi.org/10.21273/hortsci.39.5.924>

Hyltdgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3: 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>

## - I -

Inglese, P., & Sortino, G. (2019). Citrus history, taxonomy, breeding, and fruit quality. *Oxford Research Encyclopedia of Environmental Science*, 13: 221. <https://10.1093/acrefore/9780199389414.013.221>

Ismail, M., & Zhang, J. (2004). Post-harvest citrus diseases and their control. *Outlooks on Pest Management*, 15: 29-35. <https://doi.org/10.1564/15feb12>

IUPAC. (1997). *Compendium of Chemical Terminology*, (the "Gold Book"). McNaught, A. D., & Wilkinson A (Eds). Blackwell Scientific Publications (Oxford). Online version (2019-) created by Chalk S. J. <https://doi.org/10.1351/goldbook>

## - J -

Janisiewicz, W. J., & Bors, B. (1995). Development of a microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound-invading postharvest pathogens of fruits. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1995. <https://doi.org/10.1128/aem.61.9.3261-3267.1995>



Jawandha, S. K., Singh, H., Arora, A., & Singh, J. (2014). Effect of modified atmosphere packaging on storage of baramasi lemon (*Citrus limon* (L.) Burm) . International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology, 7: 635-638. <https://doi.org/10.5958/2230-732x.2014.01369.2>

Jin, P., Wang, H., Zhang, Y., Huang, Y., Wang, L., & Zheng, Y. (2017). UV-C enhances resistance against gray mold decay caused by *Botrytis cinerea* in strawberry fruit. Scientia Horticulturae, 225: 106-111. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.06.062>

Jin, P., Zhu, H., Wang, L., Shan, T., & Zheng, Y. (2014). Oxalic acid alleviates chilling injury in peach fruit by regulating energy metabolism and fatty acid contents. Food Chemistry, 161: 87-93. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.103>

## - K -

Kabbage, M., Williams, B., & Dickman, M. B. (2013). Cell death control: the interplay of apoptosis and autophagy in the pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum*. PLoS Pathogens, 9: e03287. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003287>

Kader, A. A. (1995). Regulation of fruit physiology by controlled/ modified atmospheres. Acta Horticulturae, 398: 6. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1995.398.6>

Kader, A.A. (2002). Post-harvest technology of horticultural crops. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources Publication, (Oakland), 535 pp.

Kalunke, R. M., Tundo, S., Benedetti, M., Cervone, F., De Lorenzo, G., & D'Ovidio, R. (2015). An update on polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), aleucine-rich repeat protein that protects crop plants against pathogens. Frontiers in Plant Science, 6: 146. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00146>

Kamatou, G. P. P., & Viljoen, A. M. (2008). Linalool: a review of a biologically active compound of commercial importance. Natural Product Communications, 3: 727. <https://doi.org/10.1177/1934578x0800300727>

Kamatou, G. P. P., Vermaak, I., Viljoen, A. M., & Lawrence, B. M. (2013). Menthol: a simple monoterpene with remarkable biological properties. Phytochemistry, 96: 15-25. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.08.005>

Kanetis, L., Förster, H., & Adaskaveg, J. E. (2007). Comparative efficacy of the new postharvest fungicides azoxystrobin, fludioxonil, and pyrimethanil for managing citrus green mold. Plant Disease, 91: 1502. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-11-1502>



Kfoury, M., Auezova, L., Greige-Gerges, H., & Fourmentin, S. (2015). Promising applications of cyclodextrins in food: improvement of essential oils retention, controlled release and antiradical activity. *Carbohydrate Polymers*, 131: 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.014>

Klimek-szczykutowicz, M., Szopa, A., & Ekiert, H. (2020). *Citrus limon* (Lemon) phenomenon—a review of the chemistry, pharmacological properties, applications in the modern pharmaceutical, food, and cosmetics industries, and biotechnological studies. *Plants*, 9: 119. <https://doi.org/10.3390/plants9010119>

Knight, T. G., Klieber, A., & Sedgley, M. (2002). Structural basis of the rind disorder oleocellosis in 'Washington' navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Annals of Botany*, 90: 765-773. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf258>

Kostman, T. A., Tarlyn, N. M., Loewus, F. A., & Franceschi, V. R. (2001). Biosynthesis of L-ascorbic acid and conversion of carbons 1 and 2 of L-ascorbic acid to oxalic acid occurs within individual calcium oxalate crystal idioblasts. *Plant Physiology*, 125: 634. <https://doi.org/10.1104/pp.125.2.634>

- L -

Ladaniya, M. S. (2008). Preparation for fresh fruit market. In *Citrus Fruit: Biology, Technology and Evaluation*. Ladaniya, M. S (Ed). Academic Press (Cambridge). 229-286 pp. <https://doi.org/10.1016/b978-012374130-1.50011-5>

Lado, J., Gambetta, G., & Zacarias, L. (2018). Key determinants of citrus fruit quality: metabolites and main changes during maturation. *Scientia Horticulturae*, 233: 238-248. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.01.055>

Lado, J., Rodrigo, M. J., & Zacarías, L. (2014). Maturity indicators and citrus fruit quality. In *Stewart Postharvest Review*, 10.

Lafuente, M. T., Zacarías, L., Sala, J. M., Sánchez-Ballesta, M. T., Gosalbes, M. J., Marcos, J. F., González-Candelas, L., Lluch, Y., & Granell, A. (2005). Understanding the basis of chilling injury in citrus fruit. *Acta Horticulturae*, 682: 108. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.682.108>

- Lefevre, H., Bauters, L., & Gheysen, G. (2020). Salicylic acid biosynthesis in plants. *Frontiers in Plant Science*, 11: e00338. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00338>
- Legua, P., Martinez-Cuenca, M. R., Bellver, R., & Forner-Giner, M. A. (2018). Rootstock's and scion's impact on lemon quality in southeast Spain. *International Agrophysics*, 32: 325-333. <https://doi.org/10.1515/intag-2017-0018>
- Lehner, A., Meimoun, P., Errakhi, R., Madiona, K., Barakate, M., & Bouteau, F. (2008). Toxic and signalling effects of oxalic acid: oxalic acid - natural born killer or natural born protector?. *Plant Signaling and Behavior*, 3: 6634. <https://doi.org/10.4161/psb.3.9.6634>
- Li, P., Lee, S. H., & Hsu, H. Y. (2011). Review on fruit harvesting method for potential use of automatic fruit harvesting systems. *Procedia Engineering*, 23: 351-366. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2011.11.2514>
- Li, P., Yu, X., & Xu, B. (2017). Effects of UV-C light exposure and refrigeration on phenolic and antioxidant profiles of subtropical fruits (Litchi, Longan, and Rambutan) in different fruit forms. *Journal of Food Quality*, 2017: 8785121. <https://doi.org/10.1155/2017/8785121>
- Li, P., Zheng, X., Liu, Y., & Zhu, Y. (2014). Pre-storage application of oxalic acid alleviates chilling injury in mango fruit by modulating proline metabolism and energy status under chilling stress. *Food Chemistry*, 142: 72-78. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.132>
- Liang, C., Lü, J., Jin, M., Li, H., & Rao, J. (2017). Effects of oxalic acid treatment on chilling injury, antioxidant capacity and energy status in harvested kiwifruits under low temperature stress. *Acta Horticulturae Sinica*, 44: 279-287. <https://doi.org/10.16420/j.issn.0513-353x.2016-0451>
- Lima, W. G., Spósito, M. B., Amorim, L., Gonçalves, F. P., & de Filho, P. A. M. (2011). *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. *European Journal of Plant Pathology*, 131: 157. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9795-1>
- Liu, Y., Dong, M., Yang, Z., & Pan, S. (2016). Anti-diabetic effect of citrus pectin in diabetic rats and potential mechanism via PI3K/Akt signaling pathway. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89: 484-488. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.015>
- Lo'ay, A. A., & Dawood, H. D. (2019). Chilling injury, fruit color maturity stages, and antioxidant enzyme activities of lemon "Baladi" var. fruits under cold storage stress. *Scientia Horticulturae*, 257: 108676. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108676>

Loftsson, T., & Brewster, M. E. (2011). Pharmaceutical applications of cyclodextrins: Effects on drug permeation through biological membranes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63: 1119-1135. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01279.x>

**- M -**

Mahmoud, A. M., Hernández Bautista, R. J., Sandhu, M. A., & Hussein, O. E. (2019). Beneficial effects of citrus flavonoids on cardiovascular and metabolic health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019: 5484138. <https://doi.org/10.1155/2019/5484138>

Marchese, A., Barbieri, R., Coppo, E., Orhan, I. E., Daglia, M., Nabavi, S. F., Izadi, M., Abdollahi, M., Nabavi, S. M., & Ajami, M. (2017). Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: a mechanistic viewpoint. *Critical Reviews in Microbiology*, 43: 668-689. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1295225>

Martí, N., Mena, P., Cánovas, J. A., Micol, V., & Saura, D. (2009). Vitamin C and the role of citrus juices as functional food. *Natural Product Communications*, 4: 677-700. <https://doi.org/10.1177/1934578x0900400506>

Martínez-Cuenca, M.-R., Primo-Capella, A., & Forner-Giner, M. A. (2016). Influence of rootstock on citrus tree growth: effects on photosynthesis and carbohydrate distribution, plant size, yield, fruit quality, and dwarfing genotypes. *IntechOpen*, 1: 64825. <https://doi.org/10.5772/64825>

Martínez-Esplá, A., Serrano, M., Martínez-Romero, D., Valero, D., & Zapata, P. J. (2019). Oxalic acid preharvest treatment increases antioxidant systems and improves plum quality at harvest and during postharvest storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99: 235-243. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9165>

Martínez-Esplá, A., Serrano, M., Valero, D., Martínez-Romero, D., Castillo, S., & Zapata, P. J. (2017). Enhancement of antioxidant systems and storability of two plum cultivars by preharvest treatments with salicylates. *International Journal of Molecular Sciences*, 18: 1911. <https://doi.org/10.3390/ijms18091911>

Martínez-Esplá, A., Valero, D., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Giménez, M. J., García-Pastor, M. E., Serrano, M., & Zapata, P. J. (2017). Preharvest application of methyl jasmonate as an elicitor improves the yield and phenolic content of artichoke. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65: 9247-9254. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03447>

- Martínez-Esplá, A., Zapata, P. J., Valero, D., García-Viguera, C., Castillo, S., & Serrano, M. (2014). Preharvest application of oxalic acid increased fruit size, bioactive compounds, and antioxidant capacity in sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 3432-3437. <https://doi.org/10.1021/jf500224g>
- Martínez-Esplá, A., Zapata, P. J., Valero, D., Martínez-Romero, D., Díaz-Mula, H. M., & Serrano, M. (2018). Preharvest treatments with salicylates enhance nutrient and antioxidant compounds in plum at harvest and after storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98: 2742-2750. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8770>
- Martínez-Romero, D., Castillo, S., Guillén, F., Díaz-Mula, H. M., Zapata, P. J., Valero, D., & Serrano, M. (2013). *Aloe vera* gel coating maintains quality and safety of ready-to-eat pomegranate arils. *Postharvest Biology and Technology*, 86: 107-112. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.06.022>
- Martínez-Romero, D., Guillén, F., Valverde, J. M., Bailén, G., Zapata, P., Serrano, M., Castillo, S., & Valero, D. (2007). Influence of carvacrol on survival of *Botrytis cinerea* inoculated in table grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 115: 144-148. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.015>
- Matencio, A., Navarro-Orcajada, S., García-Carmona, F., & López-Nicolás, J. M. (2020). Applications of cyclodextrins in food science. A review. *Trends in Food Science and Technology*, 104: 132-143. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.009>
- Mayuoni, L., Tietel, Z., Patil, B. S., & Porat, R. (2011). Does ethylene degreening affect internal quality of citrus fruit?. *Postharvest Biology and Technology*, 62: 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.04.005>
- Miller, F. A., Silva, C. L. M., & Brandão, T. R. S. (2013). A Review on ozone-based treatments for Fruit and vegetables preservation. *Food Engineering Reviews*, 5: 77-106. <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9064-5>
- MAPA. (2019). Producción ecológica, estadísticas provisionales de 2019. Disponible en: [https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/produccion-eco/estadisticas\\_ae\\_2019\\_word\\_ver31\\_tcm30-540808.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/produccion-eco/estadisticas_ae_2019_word_ver31_tcm30-540808.pdf). (Acceso: 03/03/2021)
- Mitalo, O. W., Otsuki, T., Okada, R., Obitsu, S., Masuda, K., Hojo, Y., Matsuura, T., Mori, I. C., Abe, D., Asiche, W. O., Akagi, T., Kubo, Y., & Ushijima, K. (2020). Low temperature modulates natural peel degreening in lemon fruit independently of endogenous ethylene. *Journal of Experimental Botany*, 71: 4778-4796. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa206>

Montero, C. R. S., Schwarz, L. L., dos Santos, L. C., dos Santos, R. P., & Bender, R. J. (2012). Oleocellosis incidence in citrus fruit in response to mechanical injuries. *Scientia Horticulturae*, 134: 227-231. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.10.026>

Montesinos-Herrero, C., & Palou, L. (2016). Synergism between potassium sorbate dips and brief exposure to high CO<sub>2</sub> or O<sub>2</sub> at curing temperature for the control of citrus postharvest green and blue molds. *Crop Protection*, 81: 43-46. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.12.005>

Mulas, M. (2011). Combined effects of fungicides and thermotherapy on post-harvest quality of horticultural commodities. In *Fungicides Beneficial and Harmful Aspects*. Thajuddin, N., (Ed). IntechOpen (London). 133-166 pp. <https://doi.org/10.5772/25823>

Muñoz-Shugulí, C., Vidal, C. P., Cantero-López, P., & Lopez-Polo, J. (2021). Encapsulation of plant extract compounds using cyclodextrin inclusion complexes, liposomes, electrospinning and their combinations for food purposes. *Trends in Food Science and Technology* 108: 177-186. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.020>

## - N -

Nagoor-Meeran, M. F., Javed, H., Tae, H. Al, Azimullah, S., & Ojha, S. K. (2017). Pharmacological properties and molecular mechanisms of thymol: prospects for its therapeutic potential and pharmaceutical development. *Frontiers in Pharmacology*, 8: 380. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00380>

Nazerian, E., y Alian Y.M. (2013). Association of *Geotrichum citri-aurantii* with citrus fruits decay in Iran. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4: 1839-1843.

NCBI. (2021). PubChem Compound Summary. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acceso: 05-04-2021.

Numpaque, M. A., Oviedo, L. A., Gil, J. H., García, C. M., & Durango, D. L. (2011). Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae*. *Tropical Plant Pathology*, 36: 3-13. <https://doi.org/10.1590/s1982-56762011000100001>

## - P -

Palou, L. (2014). *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* (Green Mold, Blue Mold). In *Postharvest Decay: Control Strategies*. Bautista-Baños, S., (Ed). Academic Press (Cambridge). 45-102 pp. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00002-8>

- Palou, L., Smilanick, J. L., & Droby, S. (2008). Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds. *Stewart Postharvest Review*, 4: 1-16. <https://doi.org/10.2212/spr.2008.2.2>
- Palou, L., Valencia-Chamorro, S. A., & Pérez-Gago, M. B. (2015). Antifungal edible coatings for fresh citrus fruit: a review. *Coatings*, 5: 962. <https://doi.org/10.3390/coatings5040962>
- Pandey, A. K., Kumar, P., Singh, P., Tripathi, N. N., & Bajpai, V. K. (2017). Essential oils: sources of antimicrobials and food preservatives. *Frontiers in Microbiology*, 7: e02161. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02161>
- Pardo, J., Soler, G., Buj, A. (2015). Variedades comerciales de cítricos. Instituto valenciano de investigaciones agrarias. <http://ivia.gva.es/va/variedades/>. Acceso: 03/03/2021.
- Paroul, N., Biasi, A., Rovani, A. C., Prigol, C., Dallago, R., Treichel, H., Cansian, R. L., Oliveira, J. V., & De Oliveira, D. (2010). Enzymatic production of linalool esters in organic and solvent-free system. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33: 583-589. <https://doi.org/10.1007/s00449-009-0384-z>
- Pei, S., Liu, R., Gao, H., Chen, H., Wu, W., Fang, X., & Han, Y. (2020). Inhibitory effect and possible mechanism of carvacrol against *Colletotrichum fructicola*. *Postharvest Biology and Technology*, 163: 111126. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111126>
- Pellicer, J. A., Fortea, M. I., Trabal, J., Rodríguez-López, M. I., Carazo-Díaz, C., Gabaldón, J. A., & Núñez-Delicado, E. (2018). Optimization of the microencapsulation of synthetic strawberry flavour with different blends of encapsulating agents using spray drying. *Powder Technology*, 338: 591-598. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.07.080>.
- Pérez-Gago, M. B., González-Aguilar, G. A., & Olivas, G. I. (2010). Edible coatings for fruits and vegetables. *Stewart Postharvest Review*, 6: 1-14. <https://doi.org/10.2212/spr.2010.3.4>
- Perina, F. J., Amaral, D. C., Fernandes, R. S., Labory, C. R. G., Teixeira, G. A., & Alves, E. (2015). *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: 1371:1378. <https://doi.org/10.1002/ps.3933>
- Perumal, A. B., Sellamuthu, P. S., Nambiar, R. B., & Sadiku, E. R. (2017). Effects of essential oil vapour treatment on the postharvest disease control and different defence responses in two mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *Food and Bioprocess Technology*, 10: 1131-1141. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1891-6>

Plaza, P., Torres, R., Usall, J., Lamarca, N., & Vinas, I. (2004). Evaluation of the potential of commercial post-harvest application of essential oils to control citrus decay. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 79: 935-940. <https://doi.org/10.1080/14620316.2004.11511869>

Plaza, P., Usall, J., Smilanick, J. L., Lamarca, N., & Viñas, I. (2004). Combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and curing treatments to control established infections of *Penicillium digitatum* on lemons. *Journal of Food Protection*, 67: 781-786. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.4.781>

Poulose, A. J., & Croteau, R. (1978). Biosynthesis of aromatic monoterpenes. Conversion of  $\gamma$ -terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 187: 307–314. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(78\)90039-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(78)90039-5)

Prakash, B., Singh, P., Kedia, A., & Dubey, N. K. (2012). Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and in vivo efficacy in food system. *Food Research International*, 49: 201-208. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.020>

- R -

Ramallo, A. C., Cerioni, L., Olmedo, G. M., Volentini, S. I., Ramallo, J., & Rapisarda, V. A. (2019). Control of *Phytophthora* spp brown rot of lemons by pre- and postharvest applications of potassium phosphite. *European Journal of Plant Pathology*, 154: 975-982. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01717-y>

Ramezani, A., Azadi, M., Mostowfizadeh-Ghahamfarsa, R., & Saharkhiz, M. J. (2016). Effect of *Zataria multiflora* Boiss and *Thymus vulgaris* L. essential oils on black rot of 'Washington Navel' orange fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 112: 152-158. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.10.011>

Razavi, F., & Hajilou, J. (2016). Enhancement of postharvest nutritional quality and antioxidant capacity of peach fruits by preharvest oxalic acid treatment. *Scientia Horticulturae*, 200: 95-101. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.01.011>

Razzaq, K., Khan, A. S., Malik, A. U., Shahid, M., & Ullah, S. (2015). Effect of oxalic acid application on 'Samar Bahisht Chaunsa' mango during ripening and postharvest. *LWT - Food Science and Technology*, 63: 152-160. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.069>



- Real Decreto 3349/1983, de 30 de noviembre de 1983, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas. Boletín Oficial del Estado, 20, 20 enero de 1984. Documento consolidado del 10 de mayo de 2021.
- Rey, F., Zacarías, L., & Rodrigo, M. J. (2020). Carotenoids, vitamin c, and antioxidant capacity in the peel of mandarin fruit in relation to the susceptibility to chilling injury during postharvest cold storage. *Antioxidants*, 9: 1296. <https://doi.org/10.3390/antiox9121296>
- Ritenour, M.A., Zhang, J., & Dewdney, M. M. (2016). Control of stem-end rot of fresh citrus. *Citrus Industry*, 1: 12-15.
- Rodríguez-López, M. I., Gabaldón-Hernández, J.A., & Mercader-Ros, M.T. (2017). Estudio de los parámetros fisicoquímicos de los complejos de timol, carvacrol y linalol en ciclodextrinas y evaluación del efecto de la complejación en su actividad antimicrobiana. Tesis doctoral. Universidad Católica San Antonio, Murcia.
- Rodríguez-López, M. I., Mercader-Ros, M. T., López-Miranda, S., Pellicer, J. A., Pérez-Garrido, A., Pérez-Sánchez, H., Núñez-Delicado, E., & Gabaldón, J. A. (2019). Thorough characterization and stability of HP- $\beta$ -cyclodextrin thymol inclusion complexes prepared by microwave technology: A required approach to a successful application in food industry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99: 1322-1333. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9307>
- Romanazzi, G., Smilanick, J. L., Feliziani, E., & Droby, S. (2016). Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biology and Technology*, 113: 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.11.003>
- Ruan, J., Zhou, Y., Zhou, M., Yan, J., Khurshid, M., Weng, W., Cheng, J., & Zhang, K. (2019). Jasmonic acid signaling pathway in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20: 2479. <https://doi.org/10.3390/ijms20102479>
- Rudell, D. R., Fellman, J. K., & Mattheis, J. P. (2005). Preharvest application of methyl jasmonate to 'Fuji' apples enhances red coloration and affects fruit size, splitting, and bitter pit incidence. *HortScience*, 40: 1760-1762. <https://doi.org/10.21273/hortsci.40.6.1760>
- Ruiz-García, Y., & Gómez-Plaza, E. (2013). Elicitors: A tool for improving fruit phenolic content. *Agriculture*, 3: 33. <https://doi.org/10.3390/agriculture3010033>



- S -

- Salvador-Pérez, A., Navarro, P., y Pássaro-Carvalho, C.P. (2012). Control de enfermedades de poscosecha. En Cítricos: cultivo, poscosecha e industrialización. Garcés-Giraldo L. F., (Ed). Artes y Letras (Itagüí). 285-303 pp.
- Sameza, M. L., Nguemngang Mabou, L. C., Tchameni, S. N., Boat Bedine, M. A., Tchoumboungang, F., Jazet Dongmo, P. M., & Boyom Fekam, F. (2016). Evaluation of clove essential oil as a mycobiocide against *Rhizopus stolonifer* and *Fusarium solani*, tuber rot causing fungi in yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Journal of Phytopathology*, 164: 433-440. <https://doi.org/10.1111/jph.12468>
- Sanzani, S. M., Reverberi, M., & Geisen, R. (2016). Mycotoxins in harvested fruits and vegetables: Insights in producing fungi, biological role, conducive conditions, and tools to manage postharvest contamination. *Postharvest Biology and Technology*, 122: 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.07.003>
- Schreuder, W., du Plooy, W., Erasmus, A., Savage, C., Basson, E., Lennox, C., & Fourie, P. H. (2018). Postharvest fungicide treatments and cold storage control citrus black spot infections. *Crop Protection*, 112: 332–342. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.06.020>
- Serrano, M., Marinez-Esplá, A., Giménez, M. J., Valero, D., Zapata, P. J., Guillén, F., & Castillo, S. (2018). Preharvest application of oxalic acid improves antioxidant systems in plums. *Acta Horticulturae*, 1194: 4. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1194.4>
- Silverman, P., Seskar, M., Kanter, D., Schweizer, P., Metraux, J. P., & Raskin, I. (1995). Salicylic acid in rice. Biosynthesis, conjugation, and possible role. *Plant Physiology*, 108: 633. <https://doi.org/10.1104/pp.108.2.633>
- Sivakumar, D., & Bautista-Baños, S. (2014). A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Protection*, 64: 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.05.012>
- Smith, O. M., Cohen, A. L., Rieser, C. J., Davis, A. G., Taylor, J. M., Adesanya, A. W., Jones, M. S., Meier, A. R., Reganold, J. P., Orpet, R. J., Northfield, T. D., & Crowder, D. W. (2019). Organic farming provides reliable environmental benefits but increases variability in crop yields: a global meta-analysis. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3: e00082. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00082>
- Soler-Aznar, J. (1999). Reconocimiento de variedades de cítricos en campo. Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación (Ed). 143-171pp.

Soler-Aznar, J., y Soler-Fayos, G. (2006). Cítricos: Variedades y técnicas de cultivo. Mundi-prensa (Madrid). 242 pp.

Sun, Y., Singh, Z., Tokala, V. Y., & Heather, B. (2019). Harvest maturity stage and cold storage period influence lemon fruit quality. *Scientia Horticulturae*, 249: 322-328. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.056>

Suprpta, D. N., Arai, K., & Iwai, H. (1995). Distribution of *Geotrichum candidum* citrus race in citrus groves and non-citrus fields in Japan. *Mycoscience*, 36: 277-282. <https://doi.org/10.1007/BF02268602>

Szejtli, J. (1998). Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews*, 98: 1743-1754. <https://doi.org/10.1021/cr970022c>

## - T -

Tao, F., Hill, L. E., Peng, Y., & Gomes, C. L. (2014). Synthesis and characterization of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications. *LWT - Food Science and Technology*, 59: 247-255. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.037>

Thakur, M., & Sohal, B. S. (2013). Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. *ISRN Biochemistry*, 2013: 762412. <https://doi.org/10.1155/2013/762412>

Timmer, L. W., Peever, T. L., Solel, Z., & Akimitsu, K. (2003). *Alternaria* diseases of citrus: a novel pathosystems. *Phytopathologia Mediterranea*, 42: 99-112. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-1710](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1710)

Tsvetkov, I., Atanassov, A., Vlahova, M., Carlier, L., Christov, N., Lefort, F., Rusanov, K., Badjakov, I., Dincheva, I., Tchamitchian, M., Rakleova, G., Georgieva, L., Tamm, L., Iantcheva, A., Herforth-Rahmé, J., Paplomatas, E., & Atanassov, I. (2018). Plant organic farming research—current status and opportunities for future development. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 32: 241-260. <https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1427509>

Tzortzakis, N. G. (2007). Methyl jasmonate-induced suppression of anthracnose rot in tomato fruit. *Crop Protection*, 26: 1507-1513. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.12.014>

- U -

Undurraga-Martínez, P.M., Oleata, J.A., Retamales, J.A., Brito, A.P. (2006). Effect of dipping in calcium solutions on peteca (rind pitting) in lemons and limes, harvested after a rainfall and cold stored. *Agricultura Técnica*, 66: 3-12.

Unión Europea. Reglamento (CE) 1235/2008 de la Comisión, de 8 de diciembre de 2008 por el que se establecen las disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) 834/2007 del Consejo en lo que se refiere a las importaciones de productos ecológicos procedentes de terceros países. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 334/25, 12 de diciembre de 2008, pp 1-28. Documento consolidado el 18 de marzo de 2021.

Unión Europea. Reglamento (CE) 834/2007 del Consejo, de 28 de junio de 2007, sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el Reglamento (CEE) 2092/91. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 189/1, 20 de julio de 2007, pp 1-23. Documento consolidado el 1 de septiembre de 2013.

Unión Europea. Reglamento (CE) 889/2008 de la Comisión, de 5 de septiembre de 2008, por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) 834/2007 del Consejo sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos, con respecto a la producción ecológica, su etiquetado y su control. *Diario Oficial de la Unión Europea* L 250/1, 18 de septiembre de 2008, pp 1-84. Documento consolidado el 1 de enero de 2021.

Unión Europea. Reglamento (UE) 354/2014 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 8 de abril de 2014, que modifica y corrige el Reglamento (CE) 889/2008, por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) 834/2007 del Consejo, sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos, con respecto a la producción ecológica, su etiquetado y su control. *Diario de la Unión Europea*, L 106/7, 9 de abril de 2014, pp 7-14.

Unión Europea. Reglamento (UE) 543/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 7 de junio de 2011, por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) 1234/2007 del Consejo en los sectores de las frutas y hortalizas y de las frutas y hortalizas transformadas. *Diario Oficial de la Unión Europea* L157/1, 15 de junio de 2011, pp 1-159. Documento consolidado el 1 de enero de 2021.

Unión Europea. Reglamento (UE) 848/2018 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de mayo de 2018, sobre producción ecológica y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el Reglamento (CE) 834/2007 del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea* L 150/1, 14 de junio de 2018, pp 1-92. Documento consolidado el 14 noviembre de 2020.

USDA. (2019). FoodData Central. Disponible en: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/1102594/nutrients>. (Acceso: 20/03/2021).

**- V -**

Valero, D., & Serrano, M (Eds). (2010). Postharvest biology and technology for preserving fruit quality. CRC Press (Florida). 287 pp. <https://doi.org/10.1201/9781439802670>

Valverde, J. M., Giménez, M. J., Guillén, F., Valero, D., Martínez-Romero, D., & Serrano, M. (2015). Methyl salicylate treatments of sweet cherry trees increase antioxidant systems in fruit at harvest and during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 109: 106-113. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.06.011>

Valverde, J. M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Serrano, M., & Valero, D. (2005). Improvement of table grapes quality and safety by the combination of modified atmosphere packaging (MAP) and eugenol, menthol, or thymol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 7458-7464. <https://doi.org/10.1021/jf050913i>

Vilanova, L., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., Jauset, A. M., & Teixidó, N. (2012). Infection capacities in the orange-pathogen relationship: compatible (*Penicillium digitatum*) and incompatible (*Penicillium expansum*) interactions. *Food Microbiology*, 29: 56-66. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.016>

**- W -**

Wang, H., Kou, X., Wu, C., Fan, G., & Li, T. (2020). Methyl jasmonate induces the resistance of postharvest blueberry to gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100: 4272-4281. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10469>

Wang, Z., Cao, J., & Jiang, W. (2016). Changes in sugar metabolism caused by exogenous oxalic acid related to chilling tolerance of apricot fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 114: 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.11.015>

Watanabe, T., (Ed). (2002). Pictorial atlas of soil and seed fungi: Morphologies of cultured fungi and key to species, second edition. CRC Press (Florida). 504 pp. <https://doi.org/10.1201/9781420040821>

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols A Guide to Methods and Applications*. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sminsky, J. J., & White, T. J., (Eds). Academic Press (Cambridge). 315-322 pp. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>.

Wisniewski, M., Droby, S., & Wilson, C. (2014). Feeding a hungry world: the challenge of developing safe and effective methods of food preservation. *Chronica Horticulturae*, 54: 9-13.

Wisniewski, M., Droby, S., Norelli, J., Liu, J., & Schena, L. (2016). Alternative management technologies for postharvest disease control: the journey from simplicity to complexity. *Postharvest Biology and Technology*, 122: 3-10. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.05.012>

Wu, G. A., Terol, J., Ibanez, V., López-García, A., Pérez-Román, E., Borredá, C., Domingo, C., Tadeo, F. R., Carbonell-Caballero, J., Alonso, R., Curk, F., Du, D., Ollitrault, P., Roose, M. L., Dopazo, J., Gmitter, F. G., Rokhsar, D. S., & Talon, M. (2018). Genomics of the origin and evolution of *Citrus spp.* *Nature*, 554: 311-316. <https://doi.org/10.1038/nature25447>

- Y -

Yao, H. J., & Tian, S. P. (2005). Effects of a biocontrol agent and methyl jasmonate on postharvest diseases of peach fruit and the possible mechanisms involved. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 941-950. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02531.x>

Youssef, K., Abd-Elsalam, K. A., Hussien, A., Sanzani, S. M., & Ippolito, A. (2017). Organic and inorganic salts as postharvest alternative control means of *Citrus spp.* *IntechOpen*, 1: 67228. <https://doi.org/10.5772/67228>

- Z -

Zapata, P. J., Martínez-Esplá, A., Guillén, F., Díaz-Mula, H. M., Martínez-Romero, D., Serrano, M., & Valero, D. (2014). Preharvest application of methyl jasmonate (MeJA) in two plum cultivars. 2. Improvement of fruit quality and antioxidant systems during postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology*, 98: 115-122. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.07.012>

Zech-Matterne, V., & Fiorentino, G. (Eds.). (2017). *AGRUMED: Archaeology and history of citrus fruit in the Mediterranean: acclimatization, diversifications, uses*. Publications du Centre Jean Bérard (Naples). <https://10.4000/books.pcbj.2107f>

Zheng, Y., He, S., Yi, S., Zhou, Z., Mao, S., Zhao, X., & Deng, L. (2010). Characteristics and oleocellosis sensitivity of citrus fruits. *Scientia Horticulturae*, 123: 312-317. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.09.018>

Zhu, Y., Yu, J., Brecht, J. K., Jiang, T., & Zheng, X. (2016). Pre-harvest application of oxalic acid increases quality and resistance to *Penicillium expansum* in kiwifruit during postharvest storage. *Food Chemistry*, 190: 537-543. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.001>

Zhu, Z., & Tian, S. (2012). Resistant responses of tomato fruit treated with exogenous methyl jasmonate to *Botrytis cinerea* infection. *Scientia Horticulturae*, 142: 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.05.002>





## **AGRADECIMIENTOS**

---

En las siguientes líneas quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que han colaborado en que la realización de esta Tesis Doctoral fuera posible.

A mis directores, el Dr. Juan Miguel Valverde y el Dr. Domingo Martínez Romero, me gustaría agradecerles su apoyo y confianza durante esta etapa, dándome la oportunidad de realizar esta Tesis en el grupo de Post-Recolección de la UMH.

Agradecer al Dr. Daniel Valero y a la Dra. María Serrano la excelente acogida y la oportunidad de iniciar un proyecto de investigación, cuyo resultado, en parte, culmina con esta Tesis. También agradecer a la Dra. María Serrano su implicación personal, orientación y supervisión de forma continua del trabajo realizado. A los Dres. Salvador Castillo y Fabián Guillén, agradecer su participación y ayuda durante toda esta etapa.

Al Dr. Pedro J. Zapata agradecer la supervisión, guía, motivación y apoyo incansable durante todos estos años, pero por encima de todo lo que más agradezco es tu amistad. Espero estar a la altura y poder devolvarte todo lo que me has dado, que es mucho y muy valioso.

A la Dra. María José Giménez por su apoyo y amistad, eres una magnífica compañera y persona, no podría expresar con palabras lo fácil que es trabajar a tu lado. A la Dra. Alejandra Martínez Esplá por la alegría y vitalidad que siempre me ha transmitido.

A la Doctoranda María Emma por compartir esta experiencia, por el apoyo y la ayuda incondicional. Espero que sigamos creciendo juntos a nivel profesional y personal, una magnífica persona y una trabajadora incansable. Al Doctorando Jorge Medina por la ayuda en las jornadas de trabajo maratonianas.

A los alumnos que han pasado por el laboratorio para realizar sus TFG o TFM, con los que trabajé, Carmen, Paula e Irene.

Agradecer a la Empresa Mundosol Quality S.L., la confianza e implicación en el proyecto que se inició hace 5 años. Con una mención especial a los trabajadores de campo y almacén, que han colaborado en que los objetivos marcados se hayan podido cumplir. Agradecer también a Antonio, José Manuel, Maite y Juan su apuesta por la I+D como motor de cambio y mejora de la empresa que dirigen.

Agradecer a mis padres y hermana estar siempre cerca de mí apoyándome en mis decisiones y ayudándome a superar cualquier obstáculo. A mi compañera de vida, Rosa, agradecer su amor y apoyo en este y otros proyectos.

**A Duna y Nube**



