(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 375 825**

(51) Int. Cl.:

A23B 7/00	(2006.01)
A23B 7/154	(2006.01)
A23B 7/14	(2006.01)
A01N 65/00	(2009.01)
A01P 3/00	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **06701518 .0**

(96) Fecha de presentación: **26.01.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1848277**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **31.10.2007**

(54) Título: **COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA PROTECCIÓN DE FRUTAS RECOLECTADAS DE LA PUTREFACCIÓN.**

(30) Prioridad:
26.01.2005 US 646604 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.03.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.03.2012

(73) Titular/es:
GAVISH-GALILEE BIO APPLICATIONS LTD.
POB 831
11016 KIRYAT SHMONA, IL

(72) Inventor/es:
KVITNITSKY, Emma;
BEN-ARIE, Ruth;
PALUY, Irina y
SEMENENKO, Olga

(74) Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

ES 2 375 825 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para la protección de frutas recolectadas de la putrefacción

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para la protección de frutas recolectadas contra la putrefacción. En particular, la invención se refiere a la aplicación de aceite esencial de canela de cassia para proteger caquis, fresas o mandarinas recolectadas contra hongos patógenos.

Antecedentes de la invención

Se ha estimado que el deterioro anual después de la cosecha de productos agrícolas muy perecederos tales como frutas produce pérdidas en el intervalo del 20-50% de los cultivos en el mundo, dependiendo de la sofisticación de los servicios de almacenamiento disponibles.

Las frutas en general son susceptibles a una rápida degradación poscosecha debido a las altas velocidades de respiración y deterioro microbiano. Tras la recogida, las frutas experimentan rotura enzimática, volviéndose más blandas o marchitas. Esto se considera como deterioro normal poscosecha y es aceptable hasta cierto nivel. El deterioro inaceptable poscosecha es la aparición de enfermedades causadas principalmente por hongos, que requiere un tratamiento antifúngico especial. Los fungicidas sintéticos son actualmente los agentes principales para controlar el desperdicio poscosecha debido a hongos patógenos y se han usado extensamente durante décadas.

Los tratamientos poscosecha que tienen como fin retrasar el deterioro incluyen lavado, encerado, curado, reguladores de crecimiento vegetal, inhibidores de brotes, desinfectantes, irradiación, maduración controlada, desverdización controlada, procesamiento lumínico (mínimo) y tratamientos químicos.

Los tratamientos químicos para reducir la putrefacción tras la cosecha solo se han hecho de uso significativo en los últimos 30 años. El éxito de estos tratamientos depende de la carga inicial de esporas, el tiempo que pasa desde la infección hasta el tratamiento, la profundidad de la infección dentro de los tejidos del huésped, la velocidad de crecimiento de la infección, temperatura y humedad relativa, y la profundidad a la que puede penetrar el agente químico en los tejidos del huésped.

Además, el producto químico aplicado no debe ser fitotóxico, debe acatar las leyes locales de aditivos alimentarios y debe haber establecido límites máximos de residuos (LMR). Los productos químicos pueden estar impregnados en envoltorios, revestimientos de cajas, aplicados como fumigantes, soluciones y suspensiones, o en cera.

La mayoría de los tratamientos poscosecha actualmente disponibles tienen como fin el tratamiento de frutos cítricos, frutas de pepita tales como manzanas, peras o membrillos, y melones o plátanos. Se ha descrito muy poco éxito en el tratamiento de frutas blandas tales como fresas, frambuesas o uvas, y caquis o melocotones.

Actualmente, la industria agrícola usa una variedad de tratamientos antifúngicos poscosecha basados en productos químicos sintéticos, para evitar o retrasar la enfermedad y prolongar la vida útil de productos agrícolas frescos. Sin embargo, en la mayoría de las industrias envasadoras están presentes cepas resistentes a fungidas, por ejemplo, *Botrytis spp*., *Penicillium spp*., lo que hace los fungicidas sintéticos menos eficaces o totalmente ineficaces (Spotts et al, 1996).

Otro problema acerca del uso de fungicidas sintéticos es el hecho de que dejan residuos, que se pueden considerar carcinógenos y/o medioambientalmente perjudiciales.

Además, en el sector de la agricultura orgánica no se aplica tratamiento poscosecha, ya que ningún producto actualmente cumple los estrictos estándares de las asociaciones internacionales de cultivadores orgánicos. Con la popularidad siempre creciente de los productos agrícolas orgánicamente cultivados, hay una demanda urgente para suministrar a este sector un tratamiento aceptable que alargue el almacenamiento y vida útil de productos agrícolas frescos.

El potencial para la aplicación poscosecha de fungicidas sintéticos está limitado también tanto por los efectos adversos debido al humedecimiento de las frutas como a las estrictas regulaciones respecto al uso de los fungicidas actualmente disponibles. Este problema ha contribuido a una necesidad urgente y significativa para desarrollar métodos alternativos, seguros, ecológicos y eficaces para controlar los patógenos tras la cosecha, capaz de complementar, o incluso sustituir por completo, a los fungicidas sintéticos.

Los métodos de control biológico, que implican una gama de planteamientos diferentes, incluyendo reforzar los mecanismos de defensa naturales del producto y la aplicación de microorganismos antagónicos y sustancias antimicrobianas naturales, se han hecho muy populares en los últimos años.

Los metabolitos secundarios biológicamente activos naturales de plantas son ejemplos de compuestos antimicrobianos y antifúngicos y pueden ofrecer una solución nueva y eficaz para el control de enfermedades poscosecha de productos hortícolas.

Se sabe que los aceites esenciales, una clase de aceites volátiles extraídos de plantas, frutas o flores mediante vapor, destilación o extracción con solventes, poseen actividad antimicrobiana. En el mundo se lleva a cabo trabajo extenso sobre aceites esenciales y sus componentes para varios fines: como fármacos para la industria farmacéutica o para terapia natural no convencional; para fines cosméticos; en agricultura, como pesticidas o para la conservación de productos alimenticios y productos agrícolas.

Numerosos aceites esenciales producidos por diferentes géneros poseen propiedades alelopáticas, antimicrobianas, antioxidantes y/o biorreguladoras (Deans et al, 1992; Piccalgia et al, 1993). El uso de aceites esenciales como agentes antifúngicos en el almacenamiento poscosecha es muy prometedor debido a su toxicidad despreciable hacia mamíferos. Además, debido a su alto grado de volatilidad se pueden usar en envasado activo o en almacenamiento en frío. Tanto el Comité de Expertos sobre Sustancias Saborizantes del Consejo de Europa como la FDA no han recomendado límites sobre el uso de aceites esenciales. Además, los aceites esenciales y sus componentes han sido evaluados por la Asociación de Fabricantes de Extractos Saborizantes de EE UU (FEMA) como GRAS (generalmente considerados como seguros, por sus siglas en inglés).

La actividad pesticida de los aceites esenciales o componentes de los mismos en general se conoce de la bibliografía y se han propuesto varios aceites esenciales para su uso como pesticidas vegetales. La actividad fungicida o fungistática de los aceites esenciales en general se conoce de la bibliografía para la protección y conservación de productos alimenticios (por ejemplo, pan, carne), cereales (por ejemplo, trigo) y productos agrícolas (Wilson et al, 1987).

Estudios anteriores tienen que ver principalmente con el ensayo *in vitro* (en condiciones ideales) de aceites esenciales o sus componentes contra hongos que se sabe causan daño a frutas. Solo un pequeño número de estudios han probado aceites esenciales *in vivo* (en condiciones comerciales) en frutas y hortalizas tras la cosecha.

Los diferentes aceites esenciales muestran diferente actividad fungicida y fungistática. *In vitro*, cada aceite esencial es activo contra algunos tipos de hongos y no es activo contra otros. Diferentes aceites esenciales pueden ser activos contra el mismo patógeno, pero a diferentes concentraciones. *In vivo*, el aceite esencial puede ser activo contra un cierto patógeno en un tipo de fruta, pero no contra el mismo patógeno en una fruta diferente, o al menos no a la misma concentración.

El modo de acción real de los aceites esenciales no se conoce del todo, aunque se especula que implica desorganización de la membrana de los hongos patógenos por los compuestos lipolíticos (Bennis et al, 2004). Los aceites esenciales producen degeneración de las hifas fúngicas, que se vacían de su contenido citoplásmico (Zambonelli et al, 1994). La destrucción de las hifas fúngicas previene la expansión de los micelios en tejido nuevo, mientras que los esporangios no pueden esporular para formar nuevas esporas infectivas. Las esporas que ya se han expandido y están latentes, esperando condiciones favorables para la germinación, también pueden estar afectadas de la misma manera (Lambert et al, 2001).

La actividad biológica de los aceites esenciales evidentemente se debe a la acción sinergística de sus componentes. Las mezclas complejas de los componentes individuales (principalmente monoterpenos y sesquiterpenos) en los aceites son mucho más potentes como barrera a la adaptación del patógeno que el componente individual (Carlton et al, 1992).

Algunos patógenos poscosecha tienen una gama de huésped limitada. Por ejemplo, *Penicillium digitatum* ataca solo frutos cítricos y produce un moho verde. Otros patógenos son omnívoros y tienen una amplia gama de huésped. Los hongos omnívoros incluyen *Alternaria alternata, Botrytis cinerea,* y *Rhizopus spp.,* etc. Todos estos hongos son patógenos económicamente importantes de una gama amplia de frutas.

Actualmente, el moho verde de los cítricos, causado por *Penicillium digitatum,* se controla aplicando fungicidas sintéticos tales como imazalil y tiabendazol. La putrefacción con puntos negros de los caquis está causada por *Alternaria alternata*, que ataca las frutas en desarrollo, pero las infecciones permanecen quiescentes hasta después de la cosecha, cuando los síntomas se vuelven aparentes después de un almacenamiento prolongado a baja temperatura. Una inmersión poscosecha en una solución de hipoclorito proporciona un cierto grado de control (Prusky et al, 2001), pero solo el almacenamiento usando envasado en atmósfera modificada (MAP) ha producido un retraso significativo en el desarrollo del hongo (Ben-Arie et al, 1991). El MAP también disminuye la putrefacción de las fresas producida por *Botrytis cinerea* pero contribuye a olores y sabores extraños (Shamalia et al, 1992). El control eficaz de la putrefacción por Rhizopus en melocotones está proporcionado por diclorano. Pero su uso se paró debido a los residuos visibles en las frutas. Además, el uso extendido de productos químicos en fabricas de envasado comerciales ha producido la proliferación de cepas resistentes de muchos patógenos (Palou et al, 2001).

La investigación reciente se ha enfocado en la búsqueda de nuevos compuestos activos contra estos hongos, que pueden tener potencial en el control de enfermedades. Ya se han identificado algunos compuestos naturales. Caccione y Guizzardi (1994) describieron que varios componentes de extractos de aceites inhibían la germinación y crecimiento de una amplia gama de hongos patógenos poscosecha de frutas y hortalizas. Extractos de aceite de orégano *(Thymus capitatus)* (Arras et al., 1995); salvia *(Salvia officinalis)* (Carta et al., 1996); mejorana *(Oreganum syriacum),* lavanda *(Lavandula angustifolia),* citronela *(Cymbopogon citratus),* árbol de té *(Melaleuca alternifolia),* melisa *(Melissa officinalis),* menta *(Mentha piperita),* poleo *(Mentha pulegium),* jazmín *(Jasminum grandiflorum),* rosa *(Rosa spp.),* naranjo amargo *(Citrus aurantum*), gaulteria *(Gaultheria procumbens)* e hisopo *(Hyssopus officinalis)* (Cutler et al., 1996), inhibieron todos el crecimiento micelial *in vitro* de *Botrytis cinerea*. Sin embargo, la eficacia de estos extractos puede diferir en sistemas *in vivo* bajo la influencia de las condiciones medioambientales. Pueden surgir problemas de fitotoxicidad cuando estos extractos se aplican en forma líquida a tejidos de frutas vivas.

Varias publicaciones y patentes divulgan el uso de aceites esenciales para la conservación de alimentos. La publicación japonesa No. JP59132876 divulga el uso de una mezcla de alcohol etílico y un aceite esencial, componente de aceite esencial, especia o componente de especia tal como aceite de mostaza alilo, o aceite de menta púrpura apoyada en un soporte tal como tela no tejida y zeolita, para conservación de productos alimenticios y hortalizas dentro de un recipiente que se cierra con un material no permeable.

La publicación japonesa No. JP58101670 divulga el uso de una sustancia volátil con efecto conservante tal como alcohol etílico, un ácido orgánico o un aceite esencial, en una bolsa hecha de una película continua macromolecular con permeabilidad controlada, para la conservación de alimentos, en donde la bolsa y el producto alimenticio se envasan juntos y se sellan herméticamente. La publicación japonesa No. JP58063348 describe hortalizas que se pueden proteger del deterioro microbiano mediante adsorción de una sustancia tal como un aceite esencial en zeolita, y envasado de las hortalizas con la zeolita resultante. La publicación japonesa No. JP8205768 divulga el uso de timol o aceite esencial de tomillo para la conservación de la frescura de setas. No se mencionan patógenos.

La solicitud de patente coreana No. KR 2003064575 divulga el uso de aldehído cinámico como un componente principal de aceite de canela de cassia contra *Botrytis cinerea* en fresa.

La patente británica No. GB 1465533 divulga el uso de aceite de cassia o aldehído cinámico en combinación con aceite de ajo o cebolla o un componente de azufre del mismo, para la protección de productos alimenticios, entre otros, frutos cítricos contra los ataques habituales por hongos y bacterias de la putrefacción, tal como *Penicillium*, *Rhizopus*, etc.

La patente moldava No. MD682 divulga el uso de aceite esencial de Origanum heracleoticum (0,4-0,5%) en mezcla con etanol (99,5-99,6%) para la protección de frutas (uvas) de la putrefacción causada por hongos patógenos.

La publicación japonesa No. JP10179104 divulga el uso de uno o más aceites esenciales (canela, ajo, tomillo, orégano) para la conservación de alimentos (pan, lácteos, pescado, tartas, etc.), también contra hongos patógenos.

La publicación PCT WO 00/21364 describe aceites esenciales de especies vegetales de las familias *Labiatae* o *Umbelliferae* (por ejemplo, *Origanum*, *Thymbra*, *Pinpinella*) que protegen plantas de insectos, hongos, nematodos y bacterias cuando se aplican a la tierra, hojas, etc.

Las publicaciones PCT WO 96/20596 y WO 96/20595 describen aldehído cinámico para el control de hongos patógenos tal como *Alternaria* o varios hongos de putrefacción de frutas tales como *Botrytis cinerea* y *Alternaria spp*.

La publicación PCT WO 98/53707 divulga un método para restablecer y mejorar el aroma y sabor de productos agrícolas frescos y específicamente se refiere a un método que comprende la aplicación de moléculas volátiles en fase líquida o gaseosa a flores, frutas, etc.

La patente de EE UU No. 5.958.490 describe el uso de carbón activo impregnado con aceites esenciales y benzaldehído para proporcionar liberación controlada de volátiles para el control de enfermedades poscosecha. No se especifican ni patógenos ni aceites esenciales.

La patente de EE UU 6.482.455 divulga el uso de una composición que consiste en la asociación de timol, eugenol y cinamaldehído y un oligosacárido, para el control de patógenos poscosecha de frutas y hortalizas, aplicada en forma sólida (incorporada en la cera) o en un baño diluido. No se mencionan patógenos.

Los esfuerzos para encontrar aceites esenciales para la protección de frutas de hongos patógenos sin que manchen las frutas o afecten a su sabor y aroma no han tenido éxito hasta ahora.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona un método para proteger caquis recolectados contra *Alternaria alternata,* fresas recolectadas contra *Botrytis cinerea,* o mandarinas recolectadas contra *Penicillium italicum o Penicillium digitatum,*

que comprende aplicar a dichos caquis, fresas o mandarinas recolectados una composición que comprende aceite esencial de canela de cassia en forma vaporizada en una cantidad suficiente para prevenir efectos adversos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para extender la vida útil de caquis, fresas o mandarinas recolectados infectados o propensos a ser infectados por *Alternaria alternata, Botrytis cinerea, Penicillium italicum o Penicillium digitatum,* respectivamente, que comprende aplicar a los caquis, fresas o mandarinas recolectados una composición que comprende aceite esencial de canela de cassia en forma vaporizada en una cantidad suficiente para prevenir efectos adversos.

La aplicación de aceite esencial de canela de cassia en forma vaporizada a las frutas según los métodos de la invención no muestra ningún impacto organoléptico y/o fitotóxico sobre las frutas y no tiene efectos perjudiciales sobre el aroma y/o sabor de la fruta.

Breve descripción de las figuras

La **figura 1** muestra la inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea* por aceite de canela de cassia (CC-1) en un sistema de placas de Petri a diferentes concentraciones del aceite esencial: (1) 71,4 ppm; (2) 357 ppm; (3) 714 ppm; y un control (placas de Petri sin tratar).

La **figura 2** es un gráfico que muestra el efecto inhibidor de aceite esencial de mostaza (M-1) (4 ppm) o aceite de canela de cassia (CC-1) (20 ppm) sobre el porcentaje de putrefacción producido por *Alternaria alternata* en caquis inoculados con 10^6 esporas/ml almacenados a 20ºC hasta 39 días.

La **figura 3** es una fotografía que muestra el efecto inhibidor del aceite de canela de cassia (CC-1) a una concentración de 10 ppm (1) o 20 ppm (2) sobre el desarrollo de la putrefacción en fresas inoculadas con *Botrytis cinerea* 10^6 esporas/ml, después de almacenamiento a 4ºC durante 31 días.

La **figura 4** es un gráfico que muestra el efecto inhibidor de aceite esencial de mostaza (M-1) (4 ppm) o aceite de canela de cassia (CC-1) (20 ppm) sobre el porcentaje de putrefacción en mandarinas infectadas con *Penicillium italicum* 10^6 esporas/ml almacenadas a 4ºC hasta 9 días.

La **figura 5** es un cromatograma de CG-EM de aceite esencial de canela de cassia que muestra la relación de los productos químicos de sus componentes y la fiabilidad de la determinación de cada componente (calidad).

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona composiciones que comprenden compuestos naturales que pueden retrasar marcadamente el desarrollo de la putrefacción poscosecha en frutas y por tanto representa una alternativa atractiva a los productos químicos sintéticos usados actualmente. Se ha identificado y caracterizado la canela de cassia entre varios aceites esenciales específicos potentes que extienden drásticamente la vida útil de los productos en condiciones de alta humedad y temperatura, sin manchar la fruta o afectar su sabor u olor, según la presente invención. Puesto que las composiciones son productos naturales, son candidatos prometedores para su uso como alternativas generalmente reconocidas como seguras (GRAS).

Como se usa en el presente documento, los términos “volátil verde” y “aceite esencial” se usan de forma intercambiable y se refieren a un aceite natural de origen natural. La eficacia fungicida de un volátil verde se determina en el presente documento para sistema(s) huésped-patógeno específico(s), es decir, un hongo o un número pequeño de hongos muy relacionados, por fruta y por concentración. Pruebas estadísticamente válidas han mostrado que el aceite esencial de canela de cassia, a concentraciones mínimas, podría ser instrumental en la supresión del crecimiento patogénico de hongos en caquis, fresas y mandarinas, sin tener un efecto perjudicial en su aroma, color, textura y sabor, y ser fitotóxico para la fruta tratada.

Aunque se conoce el efecto fungicida de algunos aceites esenciales, las dosis eficaces descritas en la bibliografía no se pueden aplicar a frutas recolectadas debido tanto a su fitotoxicidad como a su efecto sobre el aroma y el sabor de los productos tratados.

Se ha encontrado, según la presente invención, que si un cierto aceite esencial muestra actividad fungicida contra un hongo fitopatogénico *in vitro*, no protegerá necesariamente cualquier fruta de la putrefacción producida por dicho hongo. Aún es necesario probar el aceite esencial *in vivo* sobre frutas recolectadas inoculadas o propensas a ser infectadas por dicho hongo fitopatogénico, para establecer que dicho aceite esencial protegerá dichas frutas de la putrefacción causada por dicho hongo y no tendrán ningún efecto perjudicial sobre la forma, aroma y sabor de las frutas.

La composición y efecto antifúngico de un aceite esencial puede variar drásticamente debido a diferencias entre variedades y plantes individuales, las condiciones de crecimiento y medioambientales de la planta y los

procedimientos de extracción usados. Además, la composición de un aceite esencial del mismo origen puede variar incluso entre lotes producidos por el mismo fabricante.

Según la presente invención, se probó el aceite esencial de canela de cassia y se encontró que era eficaz para la protección de caquis, fresas y mandarinas contra los hongos *Botrytis cinerea, Alternaria alternata, Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum,* que son responsables de enfermedades poscosecha en dichas frutas. Cada especie de fruta se inoculó con el patógeno específico de mayor importancia económica.

La presente invención proporciona, por tanto, en una forma de realización, un método para proteger caquis recolectados contra la putrefacción producida por *Alternaria alternata,* fresas recolectadas contra la putrefacción producida por *Botrytis cinerea,* o mandarinas recolectadas contra la putrefacción producida por *Penicillium italicum o Penicillium digitatum,* que comprende aplicar a dichos caquis, fresas o mandarinas recolectados una composición que comprende aceite esencial de canela de cassia en forma vaporizada en una cantidad suficiente para prevenir efectos adversos.

En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un método para extender la vida útil de caquis, fresas o mandarinas recolectados infectados o propensos a ser infectados por *Alternaria alternata, Botrytis cinerea, Penicillium italicum o Penicillium digitatum,* respectivamente, que comprende aplicar una composición que comprende aceite esencial de canela de cassia en forma vaporizada a los caquis, fresas o mandarinas recolectadas, como se ha descrito anteriormente.

Según la presente invención, se analizaron muestras de aceite esencial de canela de cassia de diferentes fuentes y lotes, y se determinaron los intervalos de concentración de cada componente del aceite que se encontraron esenciales para su actividad protectora contra la putrefacción causada por diferentes hongos en diferentes frutas y se identificaron sus propiedades organolépticas. Estos componentes se designan en el presente documento “componentes marcadores” y los intervalos definidos en el presente documento son los que se muestra en los presentes experimentos que muestran rendimiento superior. Las composiciones que contienen aceite esencial de canela de cassia, por supuesto, incluyen componentes e ingredientes adicionales.

Se ha caracterizado el aceite esencial de canela de cassia de varios fabricantes y los componentes marcadores de los mismos y se ha determinado el perfil de su liberación en fase vapor, durante un periodo de 24 horas. Se observó una fuerte correlación entre la composición de un aceite esencial en la fase líquida, componentes marcadores bien definidos en la fase vapor y su eficacia en controlar hongos patógenos. En experimento *in vitro*, la mayoría de los componentes únicos aplicados individualmente no mostraron actividad antifúngica fuerte. Esto indica que existe un efecto sinergístico de los componentes marcadores individuales en la fase vapor y que el modo de acción del aceite esencial de canela de cassia en la fase vapor puede diferir del modo de acción tras el contacto directo del aceite esencial con los hongos patógenos, y se podría explicar como un desencadenante del sistema de autodefensa en la fruta huésped.

Por tanto, en una forma de realización preferida de la invención, el aceite de canela de cassia comprende al menos los siguientes componentes marcadores; aldehído cinámico (60,0-98,0%), acetato de cinamilo (1,0-4,0%), aldehído metoxicinámico (0,5-15,0%), linalol (0,3-8,0%), beta-cariofileno (0,2-6,0%), alfa-pineno (0,2-1,0%), dl-limoneno (0,2-1,5%) y canfeno (0,1-0,7%).

Según la presente invención, la composición que comprende aceite esencial de canela de cassia se aplica sin contacto directo con las frutas, es decir, la composición se aplica en forma volátil. La aplicación de la composición en forma volátil se puede alcanzar directamente vaporizando aceite esencial de canela de cassia en la atmósfera que rodea las frutas. Por ejemplo, puede ser suficiente colocar una hoja de papel que se ha sumergido en aceite esencial de canela de cassia en el almacén o en los recipientes de las frutas, para lograr el efecto protector en almacenamiento en masa. Esta técnica, además de conferir seguridad, es significativamente más económica que las técnicas actuales ya que las frutas se pueden tratar en masa mediante la aplicación de una concentración extremadamente baja de un aceite esencial. De forma alternativa, se puede pasar aire sobre una fuente remota del aceite esencial y circularlo alrededor de las frutas. Otras técnicas de aplicación incluyen, pero no están limitadas a, impregnación del aceite esencial en el material de envasado mismo, o incorporación del aceite esencial en un vehículo o soporte de liberación lenta, por ejemplo, por encapsulación o colocación en un recipiente, película o saquito permeable cerrado. Sin embargo, cualquier otra forma de aplicación que pudiera ser adecuada tal como un espray o una emulsión acuosa o cualquier otra forma para proteger frutas durante el transporte o almacenamiento, están abarcadas por la presente invención.

La metodología de la presente invención se puede resumir mediante los siguientes pasos:

(i) Cribado de muestras de materia prima de aceite esencial de canela de cassia y determinación de sus datos analíticos;
(ii) Caracterización química del aceite esencial de canela de cassia (estado líquido) usando métodos en serie de cromatografía de gases (CG)/espectrometría de masas (EM);

(iii) Validación *in vitro* de la actividad del aceite esencial de canela de cassia contra diferentes hongos fitopatogénicos en experimentos de dosis-respuesta;
(iv) Pruebas organolépticas;
(v) Caracterización química de la fase vapor del aceite esencial de canela de cassia y determinación de su perfil de liberación usando métodos de cromatografía de gases de espacio de cabeza;
(vi) Validación *in vivo* de la actividad del aceite esencial de canela de cassia sobre frutas inoculadas con hongos;
(vii) Análisis estadísticos del aceite esencial de canela de cassia para su uso en la invención.

Los resultados obtenidos según la presente invención claramente demuestran el gran potencial del aceite esencial de canela de cassia para aplicación en forma vaporizada para la protección de frutas tras la cosecha. La aplicación de aceite esencial de canela de cassia en forma vaporizada a las frutas no muestra ningún impacto organoléptico y/o fitotóxico sobre las frutas probadas y no tuvo efectos perjudiciales sobre el aroma y/o sabor de la fruta. La composición de aceite esencial de canela de cassia de la invención no es tóxica y se puede usar fácilmente y con seguridad para la protección de frutas contra hongos fitopatogénicos.

La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Materiales y Métodos

(i) Aceite esencial de canela de cassia y componentes individuales del mismo. El aceite esencial usado en la presente invención fue: aceite de canela de cassia (Florasynth Inc. NY, EE UU; Tamar Shivuk, Israel. La determinación de componentes marcadores y su intervalo de concentración en el aceite esencial de canela de cassia se realizó mediante análisis de CG-EM (cromatografía de gases-espectrometría de masas) usando CG/EM en serie Hewlett Packard 5890 Series II Plus Gas Chromatograph — HP 5972 Series -MSD, equipado con una columna HP-5 MS de volumen 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm.

Los componentes individuales del aceite esencial de canela de cassia usados fueron: alfa-pineno, aldehído cinámico, aldehído o-metoxicinámico, acetato de cinamilo (Aldrich Chem Co) y dl-limoneno (Aromor, Israel).

El perfil de liberación de aceite esencial de canela de cassia se determinó mediante análisis usando un cromatógrafo de gases HP6890 Series GC-System (FID) acoplado a un muestreador de espacio de cabeza HP 7694, equipado con una columna HP-5 Trace Analysis (PH Me Siloxano al 5%) de volumen 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, a temperatura ambiente. Se desarrolló y calibró el siguiente sistema modelo: se colocaron tiras de papel de filtro (Whatman No. 1) adsorbidas con un volumen apropiado de aceite esencial de canela de cassia para alcanzar las concentraciones deseadas, es decir, similares a las usadas para experimentos in vivo, en viales de 20 ml y 100 ml. Los viales se sellaron herméticamente y se marcaron para indicar el experimento temporal de vaporización (1, 3, 14 y 24 horas). Estos viales se mantuvieron en la oscuridad a una temperatura de 20ºC hasta su análisis por cromatografía de gases.

(ii) Hongos probados. Los hongos usados en los experimentos fueron: *Botrytis cinerea, Alternaria alternata, Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*. Todos los hongos se aislaron de las frutas apropiadas y los aislados se cultivaron durante 2-3 semanas en medio agar patata dextrosa (PDA, Difco Laboratories, Detroit, MI, EE UU) a 25ºC.

(iii) Frutas probadas. Las frutas probadas, caquis, fresas y mandarinas, maduras y sanas, se obtuvieron de fincas o marcados locales en Israel. Las fresas usadas en los experimentos se cultivaron de forma orgánica. Cada especie de fruta se inoculó con un hongo patógeno característico de importancia económica.

(iv) Cribado in vitro de aceite esencial de canela de cassia y los componentes individuales del mismo. La técnica se basaba en las propiedades volátiles del aceite esencial de canela de cassia o los componentes individuales del mismo probados. Una tira de papel de filtro esterilizada (Whatman No. 1; 0,5 cm x 1 cm) se centró en el interior de un tapa de una placa de Petri de vidrio. Se colocaron discos miceliales (~0,8 cm de diámetro) de los hongos (*Alternaria alternata* o *Botrytis cinerea*) en medio agar-patata-dextrosa (PDA) en el centro de placas de Petri esterilizadas. Para probar la inhibición de crecimiento de las cepas de *Penicillium*, se prepararon suspensiones de *Penicillium italicum* o *Penicillium digitatum* a una concentración de ~10^4 esporas/ml y se extendió uniformemente 0,1 ml de la suspensión, usando un asa de Drigalski, en medio PDA en placas de Petri. Se aplicaron aceite esencial de canela de cassia (6-60 µl) o componentes individuales del mismo al papel de filtro, las placas se sellaron herméticamente para evitar intercambio de gas y se dejó que los componentes se evaporaron. Las placas se incubaron en una posición invertida a 25ºC en la oscuridad. Todos los experimentos se realizaron en triplicado con un control negativo. El control negativo se preparó añadiendo 60 µl de agua al papel de filtro. Se midieron el diámetro de la colonia o el número de colonias (para *Penicillium*) después de 5-10 días, dependiendo de la especie de hongo. Se calculó el área de la colonia basado en el diámetro de la colonia restando el área del disco micelial inicial. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico como la relación del diámetro de la colonia, después de restar el diámetro del disco inicial, y el diámetro de la colonia del control.

(v) Prueba in vivo de aceite esencial de canela de cassia. La concentración de la suspensión de esporas de los hongos patógenos para la inoculación de los frutos fue de 10^6 esporas/ml en todos los casos. Se desinfectó la piel de la fruta en el sitio de inoculación con etanol al 96% y se marcaron y numeraron círculos equidistantes en el ecuador de la fruta (en caquis, se marcaron cuatro círculos equidistantes en el extremo distal plano). Para simular una infección de herida, las frutas (melocotones y caquis) se perforaron en el sitio de inoculación con una aguja de 0,5 mm a una profundidad de 5 mm, después se aplicaron 10 µl de suspensión de esporas usando una pipeta, y se dejaron secar las frutas durante 1 hora. En mandarinas, cada sitio de inoculación se hirió con una aguja de 0,5 mm que se había sumergido en la suspensión de esporas, a una profundidad de 5 mm. Las fresas se sumergieron para la inoculación en la suspensión de esporas específica sin herida. Las frutas se colocaron después en recipientes de polipropileno (PP, grado alimentario). Se unió un disco de papel de filtro estéril (Whatman No. 1; 2 cm de diámetro) al interior de la tapa del recipiente. Se añadió el aceite esencial de canela de cassia, en forma líquida, al disco de papel de filtro a un intervalo de concentración final de 0,4-20 ppm. El recipiente se cerró inmediatamente para evitar el escape de volátiles y se dejó evaporar el aceite esencial de canela de cassia durante 3-48 horas a 4-20ºC. Se usaron las frutas inoculadas cerradas en un recipiente sin la presencia del aceite esencial de canela de cassia como el control negativo. La HR (humedad relativa) en todas las pruebas fue del 65-90%. La temperatura varió dependiendo del tipo de frutas. Después de este tratamiento, las frutas se almacenaron en recipientes ligeramente abiertos durante 7-39 días.

(vi) Evaluación de la putrefacción en frutas inoculadas y análisis estadístico. Se calculó el área de putrefacción en las frutas como porcentaje del área total de la fruta. El diámetro del área infectada se midió en momentos específicos durante el almacenamiento. La putrefacción en fresas se evaluó calculando el porcentaje de bayas podridas.

Análisis estadístico – Se realizó análisis de varianza (ANOVA) usando el paquete estadístico SPSS. Los datos son las medias de al menos 30 replicaciones de frutas individuales.

(vii) Pruebas organolépticas. Las pruebas organolépticas incluyen color, sabor, textura y aroma. Las comparaciones de sabor se realizaron usando un panel de jueces entrenados para evaluar sabor y aroma. Para la evaluación de los resultados de sabor, se especificó una escala poco fina que variaba de 1 a 2 para indicar en términos generales la aparición de cambios en sabor y aroma, en donde 1 significa un sabor original, similar al control, y 2 un sabor fuertemente alterado. Una segunda escala más fina desde 1 a 5 también sirvió para estimar el sabor, en donde: 1. excelente, 2. bueno, 3. solo aceptable/medio moderado o neutro; 4. malo; y 5. incomible. Las pruebas organolépticas se realizaron en una sesión en todas las frutas en un cierto momento.

Ejemplo 1. Cribado *in vitro* de aceite esencial de canela de cassia

El cribado del aceite esencial de canela de cassia y los componentes individuales del mismo se llevó a cabo para evaluar su actividad *in vitro* en inhibir el crecimiento de los hongos patógenos. Los hongos patógenos de plantas aislados: *Botrytis cinerea, Alternaria alternata, Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* se hicieron crecer en placas de Petri en presencia de diferentes concentraciones de aceite esencial de canela de cassia. Como se muestra en la figura 1, el aceite esencial de canela de cassia (CC-1) a diferentes concentraciones: 1. 71,4 ppm, 2. 357 ppm y 3. 714 ppm, inhibió significativamente el crecimiento de *Botrytis cinerea* en comparación con el control (placa de Petri sin tratar). La concentración en ppm se define en el presente documento como el volumen en µl de aceite esencial de canela de cassia cargado en el papel de filtro por volumen de la placa de Petri en litros (µl/l).

La tabla 1 resume el porcentaje de inhibición del crecimiento de varios hongos *in vitro* por aceite esencial de canela de cassia.

El aceite de canela de cassia dio lugar a una inhibición del 100% del crecimiento de patógeno específico, *in vitro*, a una concentración de 357 ppm, y por tanto se consideró un candidato potente para estudios *in vivo* adicionales. Al análisis in vitro del aceite de canela de cassia le siguieron pruebas organolépticas para determinar su efecto sobre el color, textura, sabor y aroma de la fruta tratada. Incluso un ligero cambio en el aroma, sabor o textura de las frutas tratadas produjo la descalificación del aceite. Por tanto, aceite esencial de canela de cassia se usó realmente para el tratamiento contra la putrefacción, ya que se encontró tanto potente en las pruebas *in vitro* como que pasó las pruebas organolépticas.

Tabla 1. Inhibición del crecimiento de varios hongos por aceite de canela de cassia

Hongo	Concentración del aceite (µl/l)		
	71,4	**357**	**714**
Botrytis cinerea	10%	100%	100%
Alternaria alternata	50%	100%	100%
Penicillium italicum	100%	100%	100%
Penicillium digitatum	100%	100%	100%

Ejemplo 2. Dosis bajas de aceite de canela de cassia reducen significativamente la enfermedad de los puntos negros producida por *Alternaria alternata* en caquis

Se incubaron caquis (10 replicados de 10 frutas por recipiente) inoculados con *Alternaria alternata* (cuatro sitios de infección inoculados con 10 µl de suspensión, 10^6 esporas/ml, en cada fruta) con aceite de canela de cassia (20 ppm) durante 3 horas en recipientes cerrados, y después de ello se almacenaron en los mismos recipientes ligeramente abiertos durante hasta 39 días a 20ºC. Se usaron como control caquis inoculados sin tratar con aceite esencial de canela de cassia.

Como se muestra en la figura 2, el aceite de canela de cassia (20 ppm) redujo la putrefacción por *Alternaria alternata* en caquis en un 80% durante 39 días de almacenamiento a 20ºC.

Ejemplo 3. Dosis bajas de aceite de canela de cassia reducen significativamente la putrefacción por moho gris (*Botrytis cinerea*) en fresas.

Se inocularon fresas (10 replicados de 10 frutas por recipiente) con *Botrytis cinerea* (10^6 esporas/ml), se incubaron en recipientes cerrados con aceite de canela de cassia (1-20 ppm) durante 3 horas y se almacenaron en los mismos recipientes ligeramente abiertos hasta 34 días a 4ºC o hasta 7 días a 20ºC. Se usaron como control fresas inoculadas sin tratar con aceite esencial de canela de cassia.

El efecto del aceite de canela de cassia a dos concentraciones diferentes (10 ppm y 20 ppm) en la inhibición del desarrollo de la putrefacción en fresas inoculadas con *Botrytis cinerea* y almacenadas a 4ºC durante 31 días se muestra en la figura 3.

Ejemplo 4. Dosis bajas de aceite de canela de cassia reducen significativamente la putrefacción producida por moho azul o verde (*Penicillium italicum*) en mandarinas.

Se inocularon mandarinas (10 replicados de 10 frutas por recipiente) con *Penicillium italicum* (cuatro sitios de inoculación con 10 µl de suspensión, 10^6 esporas/ml, en cada fruta), se incubaron con aceite de canela de cassia (20 ppm) en recipientes cerrados durante 3-24 horas y se almacenaron en los mismos recipientes ligeramente abiertos hasta 9 días a 4ºC o 20ºC. Se usaron como control mandarinas inoculadas sin tratar con los aceites esenciales.

La figura 4 muestra el efecto inhibidor del aceite esencial de canela de cassia en la putrefacción por *Penicillium italicum* en mandarinas. Como se muestra en la figura 4, la putrefacción se suprimió hasta el grado del 50% debido a la exposición a aceite de canela de cassia a 20ºC seguido por 9 días de almacenamiento.

Ejemplo 5. Cuantificación de los componentes marcadores en aceite esencial de canela de cassia.

Se analizaron diferentes lotes de aceite de canela de cassia de diferentes productores mediante análisis de cromatografía de gases (CG)-espectrometría de masas (EM). Se ha compilado una base de datos que contiene los datos cromatográficos del aceite esencial de canela de cassia.

La identificación de cada componente de aceite probado se verificó y confirmó por datos espectrales de masa Wiley 7N.I Library. Solo se consideraron componentes que estaban presentes en el aceite con cantidades relativas mayores del 0,1% y validez por encima del 90%. Se ha hecho la cuantificación de los componentes marcadores basada en los correspondientes estándares de referencia externos.

Los análisis de muestras de aceites esenciales que se encontró que mostraban tanto la protección antifúngica deseada de las frutas recolectadas como que pasaron las pruebas organolépticas, se compararon, y se estableció el intervalo de concentración de los compuestos fungicidas principales, los componentes marcadores, en los aceites esenciales. Los intervalos de concentración de los componentes marcadores del aceite de canela de cassia se muestran en la tabla 2, a continuación. Como ejemplo, el cromatograma de CG-EM del aceite de canela de cassia indicando sus componentes principales se muestra en la figura 5.

Se aplicó análisis GC FID para determinar el perfil de liberación a la fase vapor de componentes marcadores individuales durante in periodo de 24 horas.

Tabla 2. Intervalo de concentración de componentes marcadores en aceite de canela de cassia

Nombre del componente químico	Intervalo de concentración, %
Aldehído cinámico	60,0-98,0
Acetato de cinamilo	1,0-4,0
Aldehído metoxicinámico	0,5-15,0
Linalol	0,3-8,0
beta-cariofileno	0,2-6,0
alfa-pineno	0,2-1,0
Canfeno	0,1-7,0
dl-limoneno	0,2-1,5

REIVINDICACIONES

1. Un método para proteger para proteger caquis recolectados contra *Alternaria alternata,* fresas recolectadas contra *Botrytis cinerea,* o mandarinas recolectadas contra *Penicillium italicum o Penicillium digitatum,* que comprende aplicar a dichos caquis, fresas o mandarinas recolectados una composición que comprende aceite esencial de canela de cassia en forma vaporizada en una cantidad suficiente para prevenir efectos adversos.

2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho aceite esencial de canela de cassia comprende al menos los siguientes componentes marcadores: aldehído cinámico (60,0-98,0%), acetato de cinamilo (1,0-4,0%), aldehído metoxicinámico (0,5-15,0%), linalol (0,3-8,0%), beta-cariofileno (0,2-6,0%), alfa-pineno (0,2-1,0%), canfeno (0,1-0,7%) y dl-limoneno (0,2-1,5%).

3. El método de la reivindicación 1, en donde dichos caquis, fresas o mandarinas recolectados se almacenan en un recipiente cerrado y se ponen en contacto con dicha composición vaporizada.

4. Un método para extender la vida útil de caquis, fresas o mandarinas recolectados infectados o propensos a ser infectados por *Alternaria alternata, Botrytis cinerea, Penicillium italicum o Penicillium digitatum,* respectivamente, que comprende aplicar a los caquis, fresas o mandarinas recolectadas una composición que comprende aceite esencial de canela de cassia en forma vaporizada en una cantidad suficiente para prevenir efectos adversos.

5. El método de la reivindicación 4, en donde dicho aceite esencial de canela de cassia comprende al menos los siguientes componentes marcadores: aldehído cinámico (60,0-98,0%), acetato de cinamilo (1,0-4,0%), aldehído metoxicinámico (0,5-15,0%), linalol (0,3-8,0%), beta-cariofileno (0,2-6,0%), alfa-pineno (0,2-1,0%), canfeno (0,1-0,7%) y dl-limoneno (0,2-1,5%).

6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la aplicación del aceite de canela de cassia en forma vaporizada a las frutas no muestra ningún impacto organoléptico y/o fitotóxico en la frutas y no tiene efecto perjudicial sobre el aroma y/o sabor de las frutas.

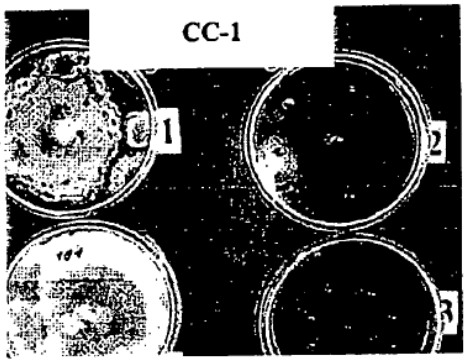


Fig. 1

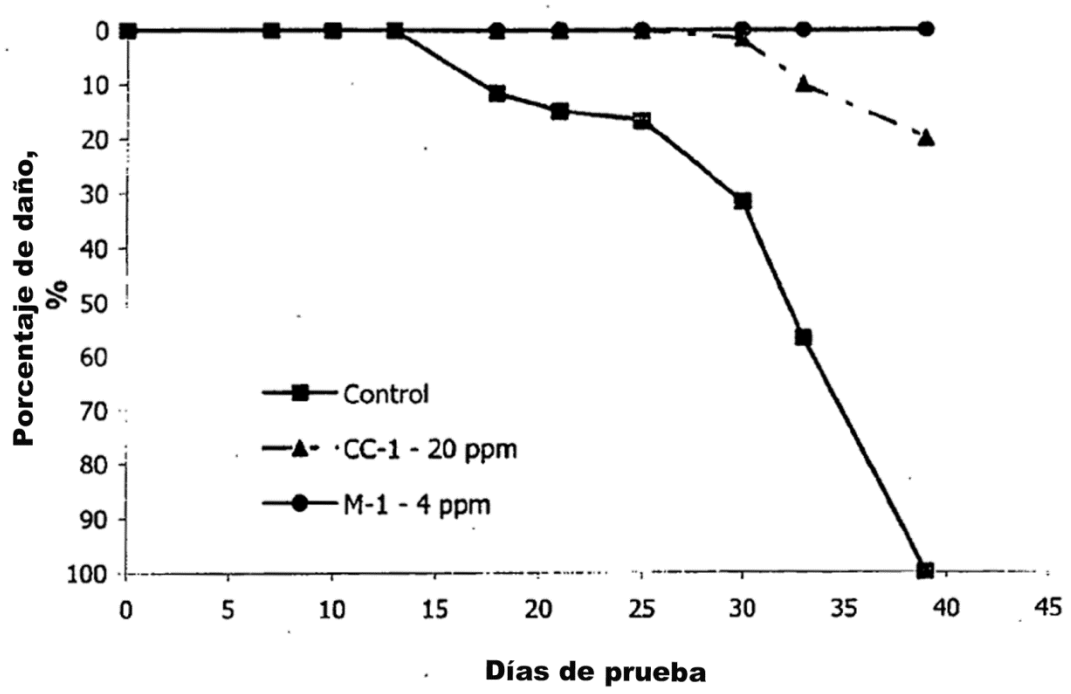

Porcentaje de daño, %
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Días de prueba
Control
CC-1 - 20 ppm
M-1 - 4 ppm

Fig. 2

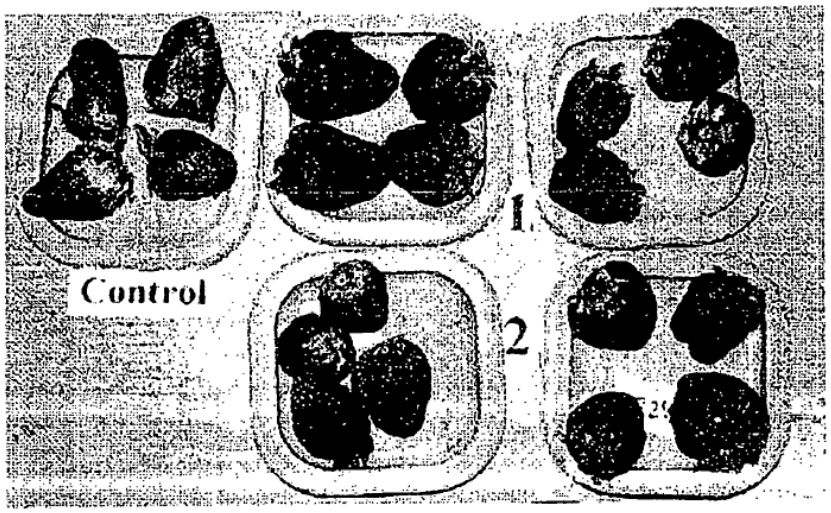


Fig. 3

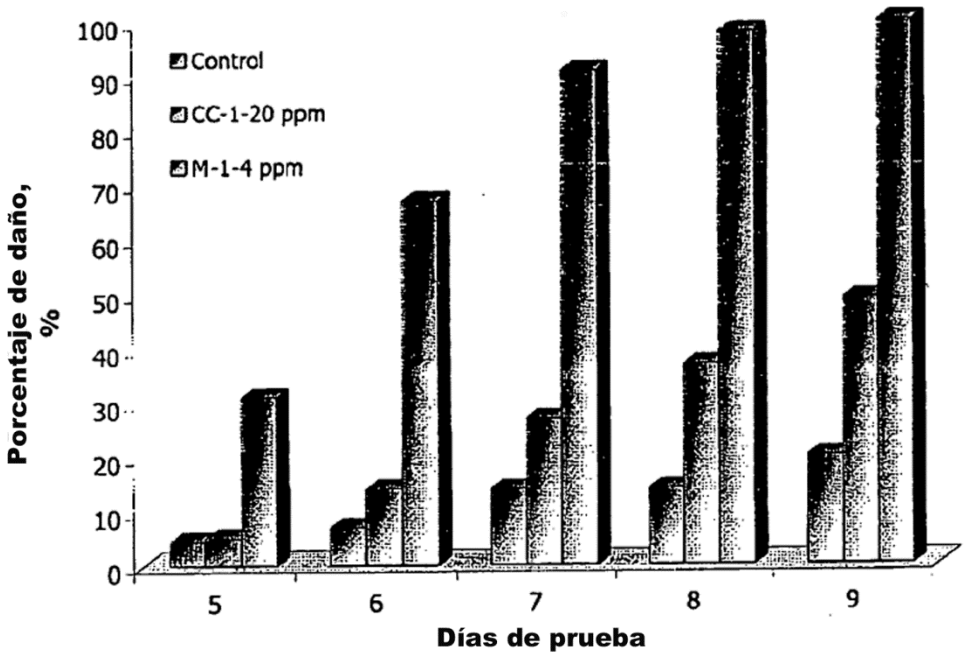
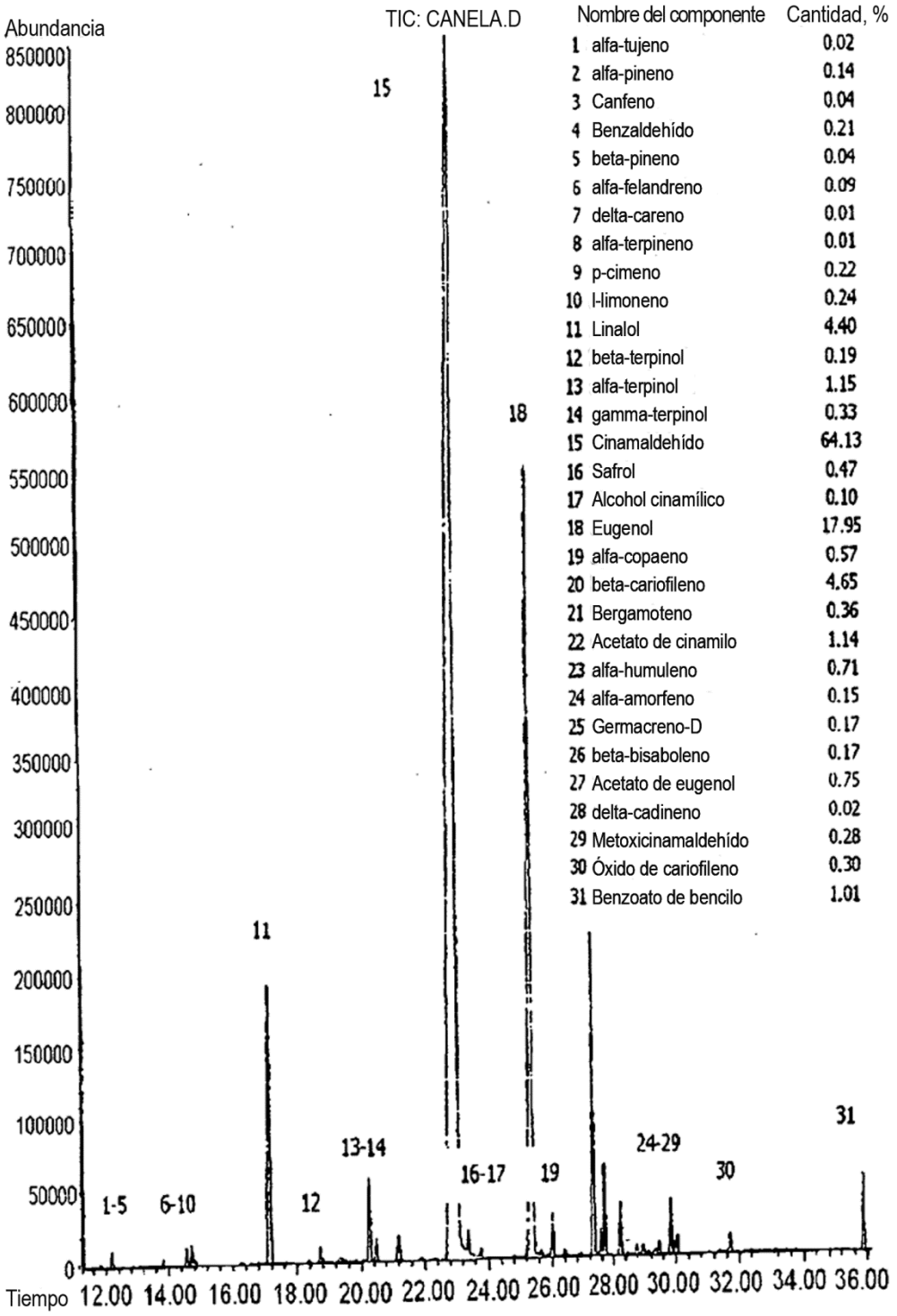

Control
CC-1-20 ppm
M-1-4 ppm
Porcentaje de daño, %
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
5
6
7
8
9
Días de prueba

Fig. 4



	Nombre del componente	Cantidad, %	Calidad, %
1	alfa-tujeno	0.02	93
2	alfa-pineno	0.14	96
3	Canfeno	0.04	97
4	Benzaldehído	0.21	97
5	beta-pineno	0.04	96
6	alfa-felandreno	0.09	97
7	delta-careno	0.01	93
8	alfa-terpineno	0.01	96
9	p-cimeno	0.22	97
10	l-limoneno	0.24	98
11	Linalol	4.40	97
12	beta-terpinol	0.19	98
13	alfa-terpinol	1.15	91
14	gamma-terpinol	0.33	93
15	Cinamaldehído	64.13	95
16	Safrol	0.47	98
17	Alcohol cinamílico	0.10	98
18	Eugenol	17.95	93
19	alfa-copaeno	0.57	99
20	beta-cariofileno	4.65	99
21	Bergamoteno	0.36	99
22	Acetato de cinamilo	1.14	91
23	alfa-humuleno	0.71	98
24	alfa-amorfeno	0.15	97
25	Germacreno-D	0.17	99
26	beta-bisaboleno	0.17	99
27	Acetato de eugenol	0.75	98
28	delta-cadineno	0.02	98
29	Metoxicinamaldehído	0.28	99
30	Óxido de cariofileno	0.30	97
31	Benzoato de bencilo	1.01	93

Fig. 5