

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 715 998**

(51) Int. Cl.:

**A23B 7/16** (2006.01)

**A01N 3/00** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.03.2013 PCT/IL2013/050287**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13144961**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2013 E 13721115 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 2830428**

(54) Título: **Recubrimiento comestible para material vegetal**

(30) Prioridad:

**29.03.2012 US 201261617179 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**07.06.2019**

(73) Titular/es:

**VISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM, LTD. (100.0%)  
Hi-Tech Park Edmond J. Safra Campus Givat Ram P.O.B 39135 91390 Jerusalem, IL**

(72) Inventor/es:

**NUSSINOVITCH, AMOS;  
MARMUR, TAL y  
ELKIND, YONATAN**

(74) Agente/Representante:

**CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes**

### Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 715 998 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

Recubrimiento comestible para material vegetal

### 5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a una composición y a métodos para prolongar la vida útil de la materia vegetal comestible reduciendo la pérdida de peso poscosecha conservando al mismo tiempo el aspecto brillante externo de la materia vegetal, en particular las frutas y hortalizas.

10

### ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los recubrimientos comestibles, que se definen como capas finas de cera u otras sustancias aplicadas a la superficie de los alimentos, se han empleado durante más de 800 años para aumentar la vida útil de los alimentos. 15 En Estados Unidos, los recubrimientos de cera se han utilizado comercialmente desde la década de 1930, cuando las naranjas se recubrieron con ceras de parafina fundidas. Estos primeros recubrimientos se utilizaron para producir la apariencia de una piel brillante. En los últimos años, se han utilizado recubrimientos para conservar atributos relacionados con la calidad de las frutas y hortalizas y para proporcionar una extensión de la vida útil que implica una disminución de la pérdida de peso y la tasa de respiración, proporcionando al mismo tiempo un aspecto brillante 20 y la posible prevención del daño inducido por la penetración de insectos (Nussinovitch in Modern biopolymer science: bridging the divide between fundamental treatise and industrial application. Kasapis et al. (Eds.), New York Academic Press, Elsevier Inc., 295-326, 2009).

El fruto del pimiento (*Capsicum annuum L.*) es naturalmente hueco y, por lo tanto, se caracteriza por una capacidad 25 limitada de reserva de agua. Por consiguiente, la pérdida de pequeñas cantidades de agua puede dar como resultado la pérdida de frescura y firmeza, una reducción en la calidad del fruto, la vida útil y el valor de mercado (Maalekuu et al., J. Am. Soc. Horticult. Sci., 130, 735-741, 2005). El factor principal que acorta la vida poscosecha de los pimientos es la pérdida de agua (Maalekuu et al., Adv. Horticult. Sci., 17, 187-191, 2003). Una vez que se cosecha el fruto, su tejido puede deshidratarse rápidamente ya que el potencial de agua ( $\Psi$ ), que cuantifica el 30 contenido de agua del aire circundante, es mucho menor que el del tejido de la planta, lo que causa la difusión de agua del tejido del fruto hasta el ambiente. En consecuencia, se produce el encogimiento del fruto poscosecha (Dijkink et al., Postharvest Biol. Technol., 32, 311-320, 2004). La flacidez, el encogimiento, el marchitamiento y la descomposición son problemas importantes que disminuyen la comerciabilidad y la aceptación por parte del consumidor de los frutos de pimiento poscosecha. La flacidez también se asocia directamente con la pérdida de 35 agua durante el almacenamiento cuando se produce la respiración, así como la difusión de agua a través de la cutícula. El encogimiento y el marchitamiento son procesos que son evidentes en la pérdida de agua del 5% o más. Por lo tanto, la reducción de la pérdida de agua, especialmente a través de la difusión a través de la cutícula, ayudará a mantener la calidad de la textura y el aspecto externo de la fruta, mejorando así su vida útil de almacenamiento.

40

Se ha empleado la obtención de una atmósfera saturada de agua alrededor del fruto mediante sellado individual, envoltura retráctil o envasado en atmósfera modificada (MAP). Los pimientos envueltos individualmente en una película de plástico mostraron una marcada reducción en la pérdida de peso y el ablandamiento, lo que dio como resultado una vida útil más larga. Aunque el sello individual y el MAP parecían reducir la pérdida de humedad del 45 fruto del pimiento, varias limitaciones impidieron el uso comercial. Una limitación que se ha encontrado es el desarrollo de microorganismos aerobios debido a la condensación del agua causada por las fluctuaciones de la temperatura durante el almacenamiento o el transporte. Se observó que la envoltura de película aumentaba la incidencia de la pudrición blanda bacteriana en el pimiento en comparación con los pimientos no envueltos. También se demostró que los pimientos con envoltura retráctil desarrollaron poblaciones más altas de microorganismos 50 aerobios totales, levaduras y mohos en comparación con los pimientos no envueltos. Otra limitación involucró temores ambientales sobre el uso de materiales plásticos. Por lo tanto, el reemplazo de películas plásticas con materiales comestibles o biodegradables es atractivo desde una perspectiva ambiental.

Los métodos más comunes utilizados hoy en día para reducir la pérdida de agua de la fruta poscosecha incluyen 55 reducir la temperatura y/o elevar la humedad relativa (HR) del entorno de almacenamiento. Sin embargo, estos entornos de almacenamiento pueden causar lesiones por frío, potenciar el desarrollo de la enfermedad y aumentar la incidencia de la descomposición de la fruta. En general, es relativamente difícil conservar la calidad de los pimientos poscosecha en comparación con otros frutos, debido a la sensibilidad de los pimientos<sup>1</sup> a bajas temperaturas (<7°C), la pérdida de agua y el desarrollo de la pudrición (Meir et al., Postharvest Biol. and Technol., 5,

303-309 1995).

La aplicación de recubrimientos y películas comestibles en frutas y hortalizas ha sido reconocida en todo el mundo para mejorar la vida poscosecha (Lerdthanangkul et al., J. Food Sci., 61, 176-179, 1996; Conforti et al., Food Chem.

- 5 Toxicol., 67, 1360-1363, 2002; Özden et al., Euro. Food Res. Technol., 214, 320-326, 2002; Ayrancı et al., Food Chem., 87, 339-342, 2004; Beaulieu et al., Indust. Crops and Products, 30, 271-275, 2009; Sabularse et al., Int. J. Food Sci. Nutr., 60, 206-218, 2009). Sin embargo, a pesar de sus ventajas, los recubrimientos comestibles para frutas también pueden afectar negativamente su calidad. Por ejemplo, un recubrimiento comestible utilizado para reducir la tasa de pérdida de agua podría interferir con la respiración de la fruta, dando como resultado sabores 10 desagradables (Park, Trends Food Sci. Technol., 10, 254-260, 1999; Chen et al., Food Hydrocolloids, 14, 561-568, 2000). Además, el brillo de la superficie de los alimentos es un parámetro muy importante, ya que refleja su calidad en el ojo del consumidor. Los pimientos tienen niveles de brillo natural muy altos en comparación con otros frutos (Nussinovitch et al., Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 29, 184-186, 1995). Cuando las superficies muy brillantes, tales como las del pimiento rojo, se tratan con las formulaciones de recubrimiento disponibles, su brillo 15 natural puede disminuir.

Las patentes de Estados Unidos número 6.299.915 y 6.068.867 de uno de los inventores de la presente invención describen un recubrimiento protector hidrocoloide para alimentos y/o productos agrícolas que comprende gel hidrocoloide seco, uno o más compuestos naturales aislados de la superficie de dicho producto o un compuesto 20 sustancialmente equivalente al mismo y otros aditivos opcionales. El recubrimiento protector proporciona una protección mejorada del producto, prolongando así su vida útil.

La solicitud de patente de Estados Unidos número 2004/0146617 y la patente de Estados Unidos número 7.222.455 describen métodos para suprimir el agrietamiento, el oscurecimiento del tallo y la pérdida de agua en frutas u 25 hortalizas, tales como cerezas. Los métodos comprenden aplicar a frutas u hortalizas una cantidad de una emulsión de cera que comprende una matriz de hidrocarburos complejos, uno o más agentes emulsionantes y agua. En algunas formas de realización, la emulsión de cera comprende de aproximadamente el 0,125% a aproximadamente el 25% (peso/peso) de cera de carnauba, de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 16% (peso/peso) de ácido oleico, y de aproximadamente el 0,03% a aproximadamente el 6% (peso/peso) de morfolina, y de 30 aproximadamente el 53% a aproximadamente el 99,7% (peso/peso) de agua.

Los recubrimientos comestibles en frutas pueden servir como barreras de gas o humedad. Pueden ayudar a disminuir la pérdida de humedad y/o reducir la absorción de oxígeno de la fruta del ambiente y, por lo tanto, retardar la respiración. Se ha informado que los recubrimientos comestibles son eficaces en diversos tipos de frutas y 35 hortalizas (patentes de Estados Unidos número 7.771.763 y 7.169.423). El recubrimiento de quitosano redujo la pérdida de peso, la tasa de respiración, la pérdida de color, el marchitamiento y la infección por hongos del pimiento durante el almacenamiento a 13°C y 20°C al 85% de HR (El Ghaouth et al., Journal of Food Processing and Preservation, 15 (5), 359-368, 1991). Aunque se han realizado varios intentos para diseñar recubrimientos comestibles para el fruto del pimiento, dos problemas principales permanecen sin resolver. En primer lugar, el 40 recubrimiento proporcionó solo una reducción de ~4% en la pérdida de peso del producto recubierto y, segundo, el recubrimiento redujo el brillo natural del pimiento.

El documento de patente US 4.021.262 describe composiciones de recubrimiento para frutas que comprenden cera de candelilla, un jabón inestable, xileno y/o tolueno.

45 El documento de patente WO 01/03511 se refiere a recubrimientos protectores comestibles para su uso con frutas, hortalizas y frutos secos. El recubrimiento se fabrica mezclando un polímero de quitosano con una solución de ácido y agua en una cantidad y peso molecular suficientes para formar una composición comestible que tiene un contenido de sólidos superior al 5% y una viscosidad líquida. Se describe además que se puede añadir una emulsión de cera 50 de carnauba no iónica a la composición antes de aplicar la composición al producto alimenticio. En contraste con la presente invención, se usa cera de carnauba en lugar de cera de abeja; se usa más del 2% de quitosano hidrolizado; no hay ácido graso ni emulsionante presentes.

Chen et al. (Proceedings of the Florida State Horticultural Society, Vol. 108; Jan 1, 1995; pág. 285-288) describe 55 recubrimientos comestibles a base de celulosa comerciales y recubrimientos de cera de almacenamiento para retrasar el amarillamiento de los limones. En contraste con la presente invención, no hay cera de abejas presente y los autores no sugieren o ni siquiera mencionan que un hidrocoloide no gelificante debería estar presente en la composición húmeda en un porcentaje en peso de hasta el 2%.

Sigue habiendo una necesidad no satisfecha en la técnica de un recubrimiento comestible de pimiento que proporcione una prolongación de su vida útil sin alterar el brillo natural y el sabor del mismo.

## **RESUMEN DE LA INVENCIÓN**

5 La presente invención proporciona una composición a base de cera de hidrocoloide comestible útil para el recubrimiento de materia vegetal, particularmente una fruta o una hortaliza que tiene un alto brillo natural y una capacidad limitada de reserva de agua, comprendiendo la composición una cera comestible que tiene una temperatura de fusión inferior a 70°C, siendo dicha cera una cera de abejas, un polímero hidrocoloide no gelificante,

10 10 un ácido graso, un emulsionante y agua. La cera comestible está presente en un porcentaje en peso que varía del 10% al 25% del peso total de dicha composición, y el hidrocoloide está presente en un porcentaje en peso de hasta el 2% de la composición húmeda. La composición de la presente invención extiende la vida útil de la materia vegetal recubierta con la composición al reducir la pérdida de agua poscosecha de la planta mientras se mantiene el aspecto brillante natural de la materia vegetal, preferiblemente cepillando o puliendo el producto recubierto.

15 15 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento inesperado de que el recubrimiento de frutas y hortalizas, que tiene un brillo natural con una composición que comprende cera de abejas que tiene una temperatura de fusión inferior a 70°C en una cantidad de al menos el 10% en peso de la composición y menos del 1% de un hidrocoloide no gelificante, redujo significativamente la pérdida de agua poscosecha de las frutas y hortalizas, sin 20 afectar a su sabor y afectando solo mínimamente a su brillo natural. Sorprendentemente, las composiciones de la presente invención redujeron la pérdida de peso de los pimientos recubiertos en ~50% en comparación con los pimientos no recubiertos, duplicando de este modo la vida útil de los pimientos recubiertos frente a los no recubiertos. Aunque el brillo natural de los pimientos se redujo típicamente en aproximadamente un 25% tras recubrirlos con la composición de la presente invención, el cepillado de los pimientos restauró su brillo natural, al 25 tiempo que mantuvo la pérdida de peso de los pimientos recubiertos significativamente inferior a la pérdida de peso de los pimientos no recubiertos.

Las composiciones de la presente invención son altamente ventajosas ya que restauran el brillo natural de las frutas y hortalizas poscosecha, así como reducen significativamente su pérdida de agua y conservan su agradable sabor.

30 30 Debe apreciarse que, en virtud de la combinación específica de los ingredientes de las composiciones de la presente invención, se consiguen los tres efectos, es decir, la restauración del brillo natural, la reducción de la pérdida de agua y la conservación del sabor de las frutas y hortalizas poscosecha. Las composiciones de recubrimiento conocidas, aunque son capaces de restaurar el brillo natural de las frutas y hortalizas poscosecha, a menudo dañan el agradable sabor de estas frutas y hortalizas. Por lo tanto, las composiciones de la presente invención 35 proporcionan, por primera vez, medios para recubrir frutas y hortalizas poscosecha que restauran su brillo natural, reducen su pérdida de agua y conservan su agradable sabor, prolongando de este modo su vida útil sin comprometer su aspecto apetecible.

De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición para recubrir materia vegetal 40 comestible que tiene un brillo natural, comprendiendo la composición una cera comestible que tiene una temperatura de fusión inferior a 70°C, siendo dicha cera una cera de abeja, un polímero hidrocoloide no gelificante, un ácido graso, un emulsionante y agua, en la que la cera comestible está presente en un porcentaje en peso que varía del 10% al 25% (p/p) del peso total de la composición de recubrimiento húmeda, y el hidrocoloide está presente en un porcentaje en peso de hasta el 2% de la composición húmeda, en la que la composición mantiene el brillo natural de 45 la materia vegetal. De acuerdo con ciertas formas de realización, la cera comestible debe constituir preferiblemente entre el 15 y el 25% (p/p) del peso de la composición de recubrimiento húmeda. Por consiguiente, después de secar el recubrimiento sobre la superficie de la planta comestible, la cera comestible constituirá entre el 55-80% (p/p) y preferiblemente entre el 60-80% (p/p) de la composición seca. Se debe enfatizar que después de recubrir la materia vegetal, el recubrimiento de cera-hidrocoloide se deja secar, preferiblemente a temperatura ambiente.

50 50 Preferiblemente, el secado del recubrimiento da como resultado un recubrimiento de hidrocoloide-cera que tiene una baja actividad de agua. Típicamente, la composición de recubrimiento seca sobre la superficie de la materia vegetal comprende hasta un 10% de agua, preferiblemente hasta un 5% de agua, preferiblemente, hasta un 3% de agua y más preferiblemente, hasta un 2% de agua.

55 La cera comestible puede tener una temperatura de fusión de entre 50 y 70°C.

La cantidad de cera comestible que tiene una temperatura de fusión por debajo de 70°C en la composición es suficiente para proporcionar los siguientes parámetros a una materia vegetal comestible poscosecha recubierta con la composición:

1. reducción de la pérdida de agua;
2. conservación del sabor agradable sin sabores desagradables; y
3. restauración del brillo natural,

5

en comparación con una materia vegetal comestible recubierta con una composición que contiene menos del 10% (p/p) de cera en la composición húmeda o una materia vegetal comestible recubierta con una composición que contiene la misma cantidad de cera, en la que la cera tiene un punto de fusión por encima de 75°C.

10 El polímero hidrocoloide está presente típicamente en una cantidad inferior al 2% (p/p), preferiblemente inferior al 1% del peso total de la composición de recubrimiento húmeda. De acuerdo con algunas formas de realización, el porcentaje en peso del polímero hidrocoloide en la composición es de hasta el 1% (p/p), aunque el porcentaje apropiado del polímero hidrocoloide se determinará para el polímero hidrocoloide real utilizado, como es bien sabido por un experto en la técnica. Después del secado de la composición de cera con alto contenido de hidrocoloide, el  
15 porcentaje en peso del polímero hidrocoloide aumentará correspondientemente y, típicamente, comprenderá un porcentaje en peso del 0,1 al 10% de la composición seca. Es importante destacar que el hidrocoloide utilizado en las composiciones y métodos de la invención puede influir en la viscosidad de la composición, sin embargo, no gelifica la composición húmeda. Por lo tanto, el polímero hidrocoloide utilizado es un polímero hidrocoloide no gelificante.

20

En algunas formas de realización, el hidrocoloide no gelificante se selecciona del grupo que consiste en goma de algarrobo (LBG), goma de guar y goma xantana y goma de tragacanto. En una forma de realización ejemplar, el hidrocoloide es una goma de algarrobo (LBG).

25 Sin estar limitado por ninguna teoría específica o mecanismo de acción, la introducción del polímero hidrocoloide en la composición de cera alteró la estructura ordenada de la cera en la composición después de que se haya secado sobre la superficie de la materia vegetal, permitiendo un mejor intercambio de gases con la atmósfera y dando como resultado de este modo una disminución en la producción de un sabor desagradable. Como resultado de este recubrimiento no uniforme o "imperfecto", la respiración de la materia vegetal recubierta es menos alterada y los  
30 niveles inferiores (relativos a los recubrimientos comerciales basados en cera) de etanol y acetaldehído se acumulan en la materia vegetal recubierta.

El ácido graso puede estar presente típicamente en la composición húmeda en una cantidad que varía entre aproximadamente el 0,2 y aproximadamente el 10% (p/p). El emulsionante está presente típicamente en la  
35 composición húmeda en una cantidad que varía de aproximadamente el 0,1 al 15% (p/p), preferiblemente de aproximadamente el 0,1 al 10% (p/p), y más preferiblemente de aproximadamente el 0,1 al 5% (p/p), e incluso más preferiblemente de aproximadamente el 0,1 al 3% (p/p). La cantidad de emulsionante puede ser inferior al 2% (p/p) del peso total de la composición de recubrimiento húmeda.

40 El ácido graso puede comprender una cadena alifática de entre 12 y 24 átomos de carbono. En algunos casos, la cadena alifática puede estar saturada o insaturada. Los ejemplos no limitantes de ácidos grasos adecuados para la composición de recubrimiento de la presente invención incluyen ácido oleico, ácido esteárico, ácido palmítico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido behénico y ácido isoesteárico. En una forma de realización ejemplar, el ácido graso es ácido oleico.

45

El emulsionante puede ser un emulsionante comestible seleccionado de emulsionante no iónico, emulsionante aniónico y mezclas de los mismos. El emulsionante permite que la composición esté en forma líquida a temperatura ambiente. El emulsionante puede facilitar la solubilidad de la cera en la composición. El emulsionante puede servir como un modificador de pH de la composición. Los ejemplos no limitantes de emulsionantes adecuados incluyen  
50 morfolina, amoniaco, lecitina, monoestearato de etilenglicol, lauril sulfato de amonio, esteroil-2-lactilato de sodio, oleato de potasio, monoestearato de propilenglicol, alquil-sulfato de sodio, poliglicol. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención. En una forma de realización ejemplar, el emulsionante es morfolina.

55 La composición puede comprender además una resina. La resina se puede seleccionar del grupo que consiste en goma laca, copal, damar, elemi y mezclas de las mismas.

La composición de la presente invención puede contener además sustancias adicionales seleccionadas del grupo que consiste en agentes antiespumantes, agentes conservantes, agentes adhesivos, agentes de reticulación,

plastificantes y agentes reductores de la tensión superficial. Las sustancias adicionales ejemplares incluyen, pero sin limitación, polidimetilsiloxano (PDMS), carbonato de potasio, bisulfito de sodio, benzoato de sodio, propionato de sodio, propionato de calcio, ácido benzoico, sorbato de potasio, polietilenglicol, glicerol, propilenglicol, sorbitol, manitol, aceite de colza de alto contenido de laurato (laurical™), Astral R y HUMKOTE®.

- 5 De acuerdo con algunas formas de realización, la composición para recubrir materia vegetal comestible comprende: de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 25% (p/p) de cera de abeja, hasta aproximadamente el 1% (p/p) del polímero hidrocoloide no gelificante, de aproximadamente el 0,2 hasta aproximadamente el 10% (p/p) del ácido graso, de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 15% (p/p) del emulsionante en la composición húmeda, y  
10 el 49-89% de agua. De acuerdo con algunas formas de realización, el polímero hidrocoloide es una goma de algarrobo. De acuerdo con alguna realización, el ácido graso es ácido oleico. De acuerdo con algunas formas de realización, el emulsionante es morfolina.

La composición puede aplicarse a la materia vegetal comestible poscosecha.

- 15 La materia vegetal comestible puede comprender una fruta o una hortaliza que tiene un aspecto brillante de forma natural. La materia vegetal comestible puede comprender una fruta o una hortaliza seleccionada del grupo que consiste en pimientos, berenjenas, cerezas, ciruelas y caquis. Los pimientos se pueden seleccionar del grupo que consiste en pimientos, pimientos dulces, chiles y paprika. En un ejemplo, la materia vegetal es un pimiento. La  
20 materia vegetal comestible puede comprender una fruta o una hortaliza que tiene una capacidad de reserva de agua pequeña o limitada. La materia vegetal comestible puede comprender una fruta o una hortaliza que tiene de aproximadamente el 75% a aproximadamente el 95% (p/p) de contenido de agua.

- De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un método para reducir la pérdida de peso y/o  
25 conservar el brillo natural de una materia vegetal comestible poscosecha que comprende la etapa de: aplicar a la superficie de la materia vegetal una composición que comprende: cera comestible que tiene una temperatura de fusión inferior a 70°C, siendo la cera una cera de abeja; un polímero hidrocoloide no gelificante; un ácido graso; un emulsionante; y agua, recubriendo de este modo la materia vegetal comestible, en el que la cera comestible está presente en un porcentaje en peso que varía del 10% al 25% de la composición húmeda, y en el que el hidrocoloide  
30 está presente en un porcentaje en peso de hasta el 2% de la composición húmeda.

- La composición se puede aplicar a la superficie de la materia vegetal frotando la composición sobre la superficie de la planta, posiblemente utilizando guantes de goma, bañando o sumergiendo la materia vegetal comestible en la composición, rociando la composición sobre la materia vegetal comestible, vertiendo la composición sobre la materia  
35 vegetal, posiblemente cuando la materia vegetal se está moviendo sobre una cinta transportadora.

- De acuerdo con algunas formas de realización, la aplicación de la composición de la presente invención a la superficie de la materia vegetal se realiza a una temperatura de entre 35°C y 50°C. Después de aplicar la composición de cera hidrocoloide a la superficie de la materia vegetal, el recubrimiento se deja secar sobre la  
40 superficie de la materia vegetal, preferiblemente a temperatura ambiente.

- De acuerdo con algunas formas de realización, el método de la invención comprende además la etapa de cepillar la materia vegetal comestible recubierta. El cepillado de la materia vegetal recubierta restaura el aspecto brillante de la materia vegetal hasta al menos el 80% del brillo natural de la materia vegetal no recubierta, preferiblemente al  
45 menos al 85% del brillo natural de la materia vegetal no recubierta y mucho más preferiblemente a aproximadamente el 90% del brillo natural de la planta no recubierta.

- El pulido o cepillado del recubrimiento disminuyó su espesor e indujo la redistribución de la cera sobre la superficie de la materia vegetal, lo que aumentó los valores de brillo de la materia vegetal recubierta. El pulido de una materia  
50 vegetal recubierta con una composición de hidrocoloide-cera en la que la cera tenía una temperatura de fusión inferior a 70°C (por ejemplo, cera de abeja) dio como resultado un aspecto más brillante en comparación con una materia vegetal recubierta con una composición de hidrocoloide-cera en la que la cera tiene una temperatura de fusión por encima de 70°C (por ejemplo, cera de carnauba). Sin estar limitado por ninguna teoría o mecanismo de acción, el aspecto más brillante puede ser resultado de una mayor redistribución de la cera debido a su suavidad  
55 relativa.

El espesor del recubrimiento antes del cepillado puede tener un espesor de entre 20 y 50 µm. El espesor del recubrimiento se puede reducir hasta en un 50% con el cepillado. De acuerdo con algunas formas de realización, el cepillado de la materia vegetal recubierta se realiza usando un cepillo que comprende fibras naturales tales como

fibras de crin de caballo. Como alternativa, el cepillado de la materia vegetal recubierta puede llevarse a cabo utilizando un cepillo que comprende fibras sintéticas tales como fibras de nylon o polietileno. De acuerdo con algunas formas de realización, el cepillo comprende fibras de crin de caballo. De acuerdo con algunas formas de realización, la planta recubierta se cepilla durante 1-10 minutos. El cepillado se puede llevar a cabo a una velocidad 5 de cepillado de aproximadamente 100 a 300 rpm.

El método de la invención proporciona la extensión de la vida útil de la materia vegetal comestible reduciendo el grado de pérdida de peso durante el almacenamiento. La pérdida de peso de una materia vegetal recubierta con la composición de la invención puede reducirse en al menos un 20%, preferiblemente en al menos un 30%; 10 preferiblemente en al menos un 40%; y más preferiblemente en aproximadamente un 50% en comparación con una materia vegetal no recubierta en las mismas condiciones de almacenamiento. El método de la presente invención también proporciona la extensión de la vida útil de la materia vegetal comestible entre varios días y varias semanas más allá de la vida útil de la materia vegetal comestible sin recubrir en las mismas condiciones de almacenamiento. Por ejemplo, la vida útil de una materia vegetal comestible recubierta con la formulación de la invención se puede 15 duplicar en comparación con la vida útil de una materia vegetal no recubierta en las mismas condiciones de almacenamiento.

Los métodos de la presente invención son particularmente ventajosos para el recubrimiento de materia vegetal comestible que comprende frutas u hortalizas que tienen una pequeña capacidad de reserva de agua y/o frutas u 20 hortalizas que tienen un aspecto brillante natural tal como, por ejemplo, pimientos, berenjenas y caquis. Por ejemplo, los métodos de la presente invención son adecuados para recubrir pimientos.

De acuerdo con algunas formas de realización preferidas adicionales, la presente invención proporciona un método para reducir la pérdida de peso y/o conservar el brillo natural de una materia vegetal comestible poscosecha que 25 comprende la etapa de aplicar a la superficie de la materia vegetal una composición que comprende: cera de abejas; presente en un porcentaje en peso que varía del 10% al 25% de la composición húmeda, hasta el 1% (p/p) del polímero hidrocoloide no gelificante; el 0,2-10% (p/p) del ácido graso, el 0,1-15% (p/p) del emulsionante, y el 49-89% de agua.

30 También se describe un método para preparar las composiciones de cera con alto contenido de hidrocoloide útiles para el recubrimiento de una materia vegetal, particularmente una fruta u hortaliza que tiene una capacidad de reserva de agua limitada y un alto brillo natural, comprendiendo el método las etapas de: a) añadir un hidrocoloide a agua precalentada que tiene una temperatura en el intervalo de aproximadamente 55°C a aproximadamente 95°C, más preferiblemente de aproximadamente 75°C a aproximadamente 85°C; b) añadir un ácido graso y un 35 emulsionante a la mezcla obtenida en la etapa a; c) añadir cera fundida a la mezcla obtenida en la etapa (b).

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 40 **FIGURAS 1A-1B.** Aparato de cepillado. (**Figura 1A**) Motor (1), cepillo giratorio (2), muestra de pimiento/placa (3), mango de ajuste del gato de laboratorio (4); (**Figura 1B**) Motor (1), acoplamiento (2), tanque de aluminio (3), pimiento (4), cepillo cilíndrico (5), cojinete (6).
- FIGURAS 2A-2C.** Micrografías DMLM de grado de investigación Leica de muestras de pimiento rojo sin recubrimiento (**Figura 2A**), recubiertas con una formulación de cera de carnauba (**Figura 2B**) y cepilladas y recubiertas con una formulación de cera de carnauba (**Figura 2C**).
- 45 **FIGURA 3.** Peso retenido (%) en pimientos rojos durante 7 días de almacenamiento. Sin recubrir (●), recubiertos con formulación de cera de abejas (■), recubiertos con formulación de cera de abejas y después cepillados (□), recubiertos con formulación de cera de carnauba (▲), recubiertos con una formulación de cera de carnauba y después cepillados (Δ).
- 50 **FIGURA 4.** Imágenes de pimientos rojos no recubiertos, recubiertos con una formulación cera de abejas y recubiertos con una formulación de cera de abejas y cepillados después de 1 día (panel A), 1 semana (panel B) y 2 semanas (panel C) de almacenamiento a temperatura ambiente.
- FIGURAS 5A-5C.** Micrografías de luz de muestras de pimiento rojo sin recubrir (**Figura 5A**), recubiertas con formulación de cera de abejas (**Figura 5B**) y recubiertas con formulación de cera de abejas y cepilladas (**Figura 5C**) (aumento x20).
- 55 **FIGURAS 6A-6B.** (**Figura 6A**) Brillo promedio de la placa de aluminio antes del recubrimiento (izquierda), después del recubrimiento con formulación de cera de carnauba (centro) y después del cepillado de la placa recubierta durante cinco minutos con un cepillo de crin de caballo (derecha) a cinco velocidades diferentes; (**Figura 6B**) Brillo promedio de la placa de aluminio después del recubrimiento con formulación de cera de carnauba (izquierda) y después del cepillado de la placa recubierta durante cinco minutos con un cepillo de

crin de caballo (derecha) a cinco velocidades diferentes. La letra sobre cada columna representa diferencias significativas entre tratamientos.

**FIGURAS 7A-7D.** Micrografías SEM de los tres tipos de muestras de fibras de cepillo. (**Figura 7A**) Polietileno x2.200, (**Figura 7B**) nylon suave x2.200, (**Figura 7C**) Pelo de caballo x 1.200, (**Figura 7D**) Pelo de caballo x2.200.

**FIGURA 8.** Grados de brillo promedio de pimientos rojos no recubiertos, recubiertos con formulación de cera de carnauba y recubiertos de formulación de cera de carnauba y cepillados que se clasificaron por el panel de evaluación sensorial.

**FIGURA 9.** Brillo de pimientos rojos sin recubrir, recubiertos con formulación de cera de abeja, recubiertos con formulación de cera de abeja y cepillados a ángulos de 60° y 85°. Letras diferentes dentro del mismo ángulo indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0,01$ ).

**FIGURA 10.** Rugosidad ( $R_a$ ) de pimientos rojos sin recubrir (izquierda), recubiertos con formulación de cera de abeja (centro) y recubiertos con formulación de cera de abejas y cepillados (derecha) durante 7 días de almacenamiento a temperatura ambiente. Diferentes letras en un día de muestreo indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0,0001$ ).

**FIGURAS 11A-11B.** Perfil de rugosidad de la superficie de pimientos rojos no recubiertos, recubiertos con formulación de cera de abeja, recubiertos con formulación con cera de abeja y cepillados después de 1 (**Figura 11A**) y 7 (**Figura 11B**) días de almacenamiento a temperatura ambiente.

**FIGURA 12.** Deformación en la punción durante el almacenamiento de pimientos rojos no recubiertos (izquierda), recubiertos con formulación de cera de abeja (centro) y recubiertos con formulación de cera de abeja recubierta y cepillados (derecha). Diferentes letras en un día de muestreo indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0,001$ ).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona una composición a base de cera de hidrocoloide comestible útil para el recubrimiento de materia vegetal, particularmente una fruta o una hortaliza que tiene un alto brillo natural y una capacidad limitada de reserva de agua, comprendiendo la composición una cera comestible que tiene una temperatura de fusión inferior a 70°C, un hidrocoloide, un ácido graso y un emulsionante. La composición de la presente invención extiende la vida útil de la materia vegetal recubierta con la composición al reducir la pérdida de agua poscosecha de la planta mientras se mantiene el aspecto brillante natural de la materia vegetal, preferiblemente cepillando o puliendo el producto recubierto.

El término "fruta u hortaliza que tiene una pequeña reserva de agua" como se usa en el presente documento, se refiere a frutas u hortalizas que tienen de aproximadamente el 75% a aproximadamente el 90% (p/p) de contenido de agua, por ejemplo, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, o aproximadamente el 90% en peso de agua. Las frutas y hortalizas que tienen una pequeña reserva de agua incluyen también frutas u hortalizas huecas tales como los pimientos que tienen una pequeña reserva de agua. Los ejemplos no limitativos adicionales de dichas frutas y hortalizas son berenjenas, caquis, uvas, mangos y papaya.

El término "aspecto brillante", como se usa en el presente documento, se refiere a una propiedad física que es característica del aspecto visual de una materia vegetal y es muy importante para la aceptación por parte del consumidor. Más específicamente, el brillo se refiere a la capacidad de la superficie de una materia vegetal para reflejar la luz incidente que da un aspecto "reluciente" o "brillante". El brillo se puede medir de diversas maneras, tanto visual como instrumentalmente. Específicamente, el brillo se puede medir con un medidor de brillo que proporciona una forma cuantificable de medir la intensidad del brillo. Los resultados de medición de un medidor de brillo están relacionados con la cantidad de luz reflejada de un estándar de vidrio negro con un índice de refracción definido. La relación entre la luz reflejada y la luz incidente para el espécimen, en comparación con la relación para el estándar de brillo, se registra como unidades de brillo. Típicamente, el brillo se puede medir en tres ángulos de medición, es decir, 20°, 60° o 85°, normalmente, el ángulo se selecciona para una aplicación particular basándose en el rango de brillo previsto. Como se usa en el presente documento, materia vegetal con brillo natural se refiere a una materia vegetal que tiene un valor de brillo medido a 60° desde una superficie plana de 5 GU (unidades de brillo) o más, como alternativa, 7 GU o más, como alternativa, al menos 10 GU. El aspecto brillante puede referirse preferiblemente a un valor de brillo de 60° de 12 GU o más.

"Unidades de brillo (GU)" es una escala basada en un estándar de vidrio negro de referencia altamente pulido con un índice de refracción definido que tiene una reflectancia especular de 100 GU en el ángulo coincidente especificado. Este estándar se utiliza para establecer una calibración de punto superior de 100 con el punto final inferior establecido a 0 en una superficie perfectamente mate.

Los términos "restaurar el aspecto brillante", "restaurar el brillo", "mantener el aspecto brillante" y "mantener el brillo", como se usa en el presente documento, se refieren a lograr un valor de brillo que sea al menos el 80% del brillo natural de materia vegetal no recubierta.

5 Se ha demostrado previamente que al aplicar una composición que comprende una cera y un hidrocoloide sobre la superficie de los cítricos, la pérdida de peso de agua poscosecha se puede reducir significativamente (S. Chen, A. Nussinovitch, Food hydrocolloids 14, 561-568, 2000). Las composiciones que comprenden un hidrocoloide no gelificante con cera comestible, recubiertas sobre una superficie de cítrico proporcionaron un recubrimiento que  
10 disminuyó la velocidad de evaporación del agua evitando al mismo tiempo la fermentación y la formación de sabores desagradables. Sin embargo, la aplicación de dicha composición a frutas u hortalizas, que tiene un aspecto brillante de forma natural, altera el brillo natural de la materia vegetal y reduce el atractivo comercial de la misma.

Se ha encontrado ahora que el aumento de la concentración de cera comestible en la composición de recubrimiento  
15 permitió una reducción mínima en el brillo natural de la materia vegetal recubierta. La forma de realización de un cepillado adecuado después de aplicar las composiciones de cera con alto contenido de hidrocoloide de la presente invención restauró el aspecto brillante de la materia vegetal. Por lo tanto, la composición de la presente invención supera las desventajas de las composiciones conocidas usando un recubrimiento de cera con alto contenido de hidrocoloide que reduce la pérdida de peso de agua, pero no altera el brillo y el sabor de la materia vegetal  
20 comestible.

La composición de la presente invención comprende cera de abejas. La composición de la presente invención comprende al menos un 10% y como máximo un 25% (p/p) de la cera comestible, preferiblemente entre aproximadamente un 15% y aproximadamente un 25%. Por ejemplo, aproximadamente 15, aproximadamente 16,  
25 aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, o aproximadamente 25 por ciento en peso de cera comestible. El término "cera comestible", como se usa en el presente documento, se refiere a cera de abejas.

La composición para recubrir materia vegetal comestible comprende un hidrocoloide no gelificante. El término  
30 "hidrocoloides" como se usa en el presente documento se refiere a polímeros solubles en agua, de origen vegetal, animal, microbiano o sintético, que generalmente contienen muchos grupos hidroxilo y son capaces de aumentar la viscosidad de la composición. Los hidrocoloides de la presente invención permiten el espesamiento de sistemas acuosos, sin gelificación de los mismos. El porcentaje apropiado del polímero hidrocoloide se determinará para el hidrocoloide real utilizado, como es bien conocido por los expertos en la técnica. Los hidrocoloides no gelificantes  
35 adecuados incluyen, pero sin limitación, goma de algarrobo (LBG), goma de guar, goma xantana y goma de tragacanto. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención. Otros hidrocoloides no gelificantes incluyen, pero sin limitación, alquilo e hidroxialquilcelulosa lambda-carragenano, carboximetilcelulosa, goma arábica, goma karaya, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, goma de tamarindo y gelatina hidrolizada. Los hidrocoloides adicionales utilizables en las composiciones de la presente invención  
40 incluyen, pero sin limitación, goma de tamarindo, goma de alholva, goma cassia y goma de tara.

Sin limitarse a ninguna teoría o mecanismo de acción, se contempla que el hidrocoloide no gelificante aumenta la viscosidad de la composición y forma discontinuidad en la capa seca a base de cera que recubre la superficie de la materia vegetal, impidiendo de este modo la fermentación (por ejemplo, la fermentación anaerobia) y la formación o  
45 acumulación de sabores desagradables. El hidrocoloide también puede servir como resistencia a la difusión de gases.

La composición de la presente invención comprende un ácido graso. El ácido graso puede comprender una cadena alifática de entre 12 y 24 átomos de carbono. Los ácidos grasos adecuados dentro del alcance de la presente  
50 invención incluyen, pero sin limitación, ácido oleico, ácido esteárico, ácido palmítico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido behénico y ácido isoesteárico. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención. Sin quedar limitado por ninguna teoría o mecanismo de acción, el ácido graso sirve como una reserva hidrófoba que disminuye la pérdida de agua por evaporación, proporcionando de este modo una disminución de la velocidad de evaporación del agua. El ácido graso puede licuar adicionalmente la formulación y mejorar el aspecto  
55 brillante de la materia vegetal cuando se combina con las ceras comestibles de la composición.

La composición puede comprender de aproximadamente el 0,2 a aproximadamente el 10% (p/p) de un ácido graso. En particular, la composición comprende de aproximadamente el 0,2 a aproximadamente el 5% (p/p) de ácido graso. Preferiblemente, la composición comprende de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 4% (p/p) de ácido

graso, o de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 3% (p/p) de ácido graso, o de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 2% (p/p) de ácido graso.

La composición de la presente invención comprende además un emulsionante. Típicamente, la composición 5 comprende de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 15% (p/p) de emulsionante. La composición puede comprender entre el 0,2 y el 10%, o entre el 0,2 y el 5% de un emulsionante, o entre el 0,5 y el 3% de un emulsionante. Los emulsionantes adecuados incluyen, pero sin limitación, emulsionantes no iónicos o aniónicos comestibles, tales como morfolina, amoniaco, lecitina, monoestearato de etilenglicol, lauril sulfato de amonio, esteroil-2-lactilato de sodio, oleato de potasio, monoestearato de propilenglicol, alquilsulfato de sodio, oleato de 10 sodio, monoestearato de sorbitán, ácido oleico y poliglicol. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención. En ciertas formas de realización, el emulsionante es un emulsionante que contiene nitrógeno, por ejemplo, morfolina.

La composición de la presente invención puede contener opcionalmente sustancias adicionales seleccionadas del 15 grupo que consiste en agentes antiespumantes, agentes conservantes, agentes adhesivos, agentes de reticulación, plastificantes y agentes reductores de la tensión superficial. Las sustancias adicionales ejemplares incluyen, pero sin limitación, polidimetilsiloxano (PDMS), carbonato de potasio, bisulfito de sodio, benzoato de sodio, propionato de sodio, propionato de calcio, ácido benzoico, sorbato de potasio, polietilenglicol, glicerol, propilenglicol, sorbitol, manitol, y HUMKOTE®.

20 La adición de sustancias adicionales a la composición puede llevarse a cabo con el fin de obtener una composición de cera-hidrocoloide que tenga propiedades deseadas tales como, pero sin limitación, la viscosidad, plasticidad, hidrofobicidad, brillo, pH, y similares deseados. Por ejemplo, los aditivos pueden proporcionar otras características, funciones o propiedades a la composición de la presente invención, tales como, pero sin limitación, propiedades 25 desinfectantes.

También se describe un método para reducir la pérdida de peso y/o conservar el brillo natural de una materia vegetal comestible poscosecha que comprende la etapa de aplicar a la superficie de la materia vegetal una composición que comprende: una cera comestible que tiene una temperatura de fusión inferior a 70°C; un polímero hidrocoloide; un 30 ácido graso; un emulsionante; y agua, recubriendo así la materia vegetal comestible, en la que la cera comestible está presente en un porcentaje en peso que varía del 10% al 25% de la composición húmeda y del 50% al 85% (p/p) de la composición seca. La composición puede comprender: 10% - 25% (p/p) de cera de abeja; hasta el 1% (p/p) de hidrocoloide; 0,2% - 10% (p/p) de un ácido graso; 0,1% - 15% (p/p) de un emulsionante; y 49%-89% de agua del peso total de la composición. Como alternativa, la composición puede comprender: 15% - 25% (p/p) de cera de 35 abejas; hasta el 1% (p/p) de hidrocoloide; aproximadamente el 0,2% -3% (p/p) de un ácido graso; aproximadamente 0,1% - 5% (p/p) de un emulsionante; y el 65% - 84% de agua, del peso total de la composición.

La composición se puede aplicar a la superficie de la materia vegetal frotando la composición sobre la superficie de la planta, posiblemente utilizando guantes de goma, bañando o sumergiendo la materia vegetal comestible en la 40 composición, rociando la composición sobre la materia vegetal comestible, vertiendo la composición sobre la materia vegetal, posiblemente cuando la materia vegetal se está moviendo sobre una cinta transportadora.

La composición se puede aplicar a una cierta temperatura para proporcionar un recubrimiento sustancialmente uniforme de la fruta u hortaliza. La aplicación de la composición de la presente invención a la superficie de la materia 45 vegetal se puede llevar a cabo a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ ). La composición se puede aplicar a la superficie de la materia vegetal cuando la temperatura de la composición está entre 35°C y 70°C, preferiblemente a una temperatura de entre 35°C a 50°C. Un experto en la técnica reconocerá que la composición de la presente invención se aplica más fácilmente en forma líquida. Por consiguiente, la composición se puede aplicar a una temperatura en la que la cera comestible se lice o se licue parcialmente.

50 Despues de aplicar la composición de hidrocoloide-cera a la superficie de la materia vegetal, el recubrimiento se deja secar sobre la superficie de la materia vegetal.

Además, se describe un método para mantener el aspecto brillante externo de la materia vegetal comestible no 55 recubierta o restaurar el aspecto brillante externo de la materia vegetal comestible recubierta, comprendiendo el método cepillar la materia vegetal comestible recubierta. Se contempla que el cepillado se realiza para aumentar el aspecto brillante de la materia vegetal comestible recubierta en comparación con el aspecto brillante de la materia vegetal comestible recubierta no cepillada. El cepillado de la materia vegetal recubierta restaura el aspecto brillante de la materia vegetal hasta al menos el 80% del brillo natural de la materia vegetal no recubierta, preferiblemente al

menos al 85% del brillo natural de la materia vegetal no recubierta y mucho más preferiblemente a aproximadamente el 90% del brillo natural de la planta no recubierta.

Sin quedar limitado por ninguna teoría o mecanismo de acción, el pulido o cepillado del recubrimiento disminuye su espesor e induce la redistribución de la cera sobre la superficie de la materia vegetal, lo que aumenta los valores de brillo de la materia vegetal recubierta. El pulido de un recubrimiento que comprende una cera que tiene una temperatura de fusión por debajo de 70°C, da como resultado una mayor redistribución de la cera debido a la suavidad relativa de la cera y da como resultado un aspecto más brillante que el brillo obtenido cuando una formulación de recubrimiento comprende cera que tiene un punto de fusión más alto.

10 El espesor del recubrimiento antes del cepillado puede tener un espesor de entre 20 y 50 µm. El espesor del recubrimiento se puede reducir hasta en un 50% tras el cepillado; por consiguiente, el espesor del recubrimiento después del cepillado es de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 µm. De acuerdo con algunas formas de realización, el cepillado de la materia vegetal recubierta se realiza usando un cepillo que comprende fibras o cerdas naturales, tales como fibras de crín de caballo, fibras de pelo de cabra, pelo de jabalí o cerdas o pelo de cerdo. El cepillado de la materia vegetal recubierta se puede llevar a cabo utilizando un cepillo que comprende fibras sintéticas tales como fibras de nylon, polietileno o rayón. El cepillado de la materia vegetal recubierta se puede llevar a cabo utilizando una tela no tejida o un medio de fibra larga no tejido. Cabe destacar que la etapa de cepillado de la materia vegetal recubierta se realiza solo después de que la composición de recubrimiento de hidrocoloide-cera se haya secado completamente. El secado de la materia vegetal recubierta se realiza típicamente permitiendo que la materia vegetal recubierta se seque a temperatura ambiente. Como alternativa, la composición de recubrimiento se puede dejar secar o secar activamente después de su aplicación a la superficie de la materia vegetal por cualquier método o en cualquier condición conocida en la técnica por decisión del experto en la técnica. La planta recubierta puede cepillarse durante hasta 20 minutos, preferiblemente entre 1-10 minutos, a cualquier velocidad de cepillado, 15 preferiblemente de aproximadamente 100 a 300 rpm, por ejemplo, aproximadamente 100 rpm, aproximadamente 150 rpm, aproximadamente 200 rpm, aproximadamente 250 rpm, o aproximadamente 300 rpm.

30 El método de la invención proporciona la extensión de la vida útil de la materia vegetal comestible reduciendo el grado de pérdida de peso durante el almacenamiento. El método de la presente invención proporciona la extensión de la vida útil de la materia vegetal comestible entre varios días y varias semanas más allá de la vida útil de la materia vegetal comestible sin recubrir en las mismas condiciones de almacenamiento. La vida útil de una materia vegetal comestible recubierta con la formulación de la invención puede ser al menos un 20% más alta que la vida útil de una materia vegetal no recubierta en las mismas condiciones de almacenamiento; como alternativa, al menos un 25% más alta, o al menos un 30% más alta; como alternativa, al menos un 35% más alta, o como alternativa, al 35 menos un 40% más alta. La vida útil de una materia vegetal comestible recubierta con la formulación de la invención puede duplicarse en comparación con la vida útil de una materia vegetal no recubierta en las mismas condiciones de almacenamiento. El método de la presente invención es particularmente ventajoso para el recubrimiento de materia vegetal comestible que comprende frutas u hortalizas que tienen una pequeña capacidad de reserva de agua y/o frutas u hortalizas que tienen un aspecto brillante natural, tales como, por ejemplo, pimientos, berenjenas y caquis.

40 El método de la presente invención es particularmente adecuado para recubrir pimientos.

También se describe un método para reducir la pérdida de peso y/o conservar el brillo natural de una materia vegetal comestible poscosecha que comprende la etapa de aplicar a la superficie de la materia vegetal una composición que comprende: cera de abejas; presente en un porcentaje en peso que varía del 10% al 25% de la composición 45 húmeda y del 50% al 85% (p/p) de la composición seca, un polímero hidrocoloide; un ácido graso y un emulsionante. También se describe un método para reducir la pérdida de peso y/o conservar el brillo natural de un pimiento poscosecha (tal como un pimiento) que comprende la etapa de aplicar a la superficie del pimiento una composición que comprende: cera de abejas; presente en un porcentaje en peso que varía del 10% al 25% de la composición húmeda y del 50% al 85% (p/p) de la composición seca, un polímero hidrocoloide; un ácido graso y un emulsionante.

50 También se describe un método para la preparación de las composiciones de cera con alto contenido de hidrocoloide útiles para el recubrimiento de una materia vegetal, particularmente una fruta o hortaliza que tiene una capacidad de reserva de agua limitada y un alto brillo natural, comprendiendo el método las etapas de:

- 55       a) Añadir un hidrocoloide al agua precalentada que tiene una temperatura en el intervalo de aproximadamente 55°C a aproximadamente 95°C, preferiblemente de aproximadamente 75°C a aproximadamente 85°C;
- b) añadir un ácido graso y un emulsionante a la mezcla obtenida en la etapa a;
- c) añadir cera fundida a la mezcla obtenida en la etapa b.

La etapa a puede ir seguida típicamente de agitación vigorosa de la solución durante cualquier periodo de tiempo hasta que el hidrocoloide se solubiliza, típicamente entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 30 minutos. El método comprende además añadir un ácido graso y un emulsionante a la solución de hidrocoloide 5 caliente. La preparación va seguida de la adición de una cera previamente fundida a la solución y la homogeneización de la composición durante cualquier periodo de tiempo, típicamente entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 15 minutos. La composición se agita adicionalmente para la eliminación de la espuma. La formación de espuma puede reducirse o incluso prevenirse mediante la adición de agentes antiespumantes a la 10 composición. La viscosidad de la composición obtenida puede ser de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 10 cP a una tasa de cizallamiento de 70 s<sup>-1</sup> y a una temperatura de 25°C.

- La composición de cera-hidrocoloide puede ser una emulsión, o una emulsión estabilizada por el emulsionante, o una emulsión estabilizada por morfolina, o una emulsión de aceite en agua.
- 15 Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Cabe señalar que el término "y" o el término "o" se emplea generalmente en su sentido, incluyendo "y/o" a menos que el contenido indique claramente lo contrario.
- 20 Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar de manera más completa algunas formas de realización de la invención. Sin embargo, no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del amplio alcance de la invención. Un experto en la técnica puede idear fácilmente muchas variaciones y modificaciones de los principios descritos en el presente documento sin apartarse del alcance de la invención.

## 25 EJEMPLOS

### Ejemplo 1: Materiales y métodos

#### Formulaciones

- 30 Las formulaciones que comprenden hidrocoloide y cera comestible se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Formulaciones de la composición de cera con alto contenido en hidrocoloide

Formulación	Cera (% p/p)	Goma de algarrobo (% p/p)	Ácido oleico (% p/p)	Morfolina (% p/p)	Goma laca (% p/p)	PDMS (% p/p)	Aqua (% p/p)
Carnauba							
1	10	0,50	1,8	2,4	2,0	-	83,3
2	15	0,50	1,8	2,4	3,0	-	77,3
3	18	0,45	1,6	2,2	3,6	-	74,2
3A	18	0,50	1,6	2,2	3,6	0,01	74,1
Cera de abejas							
4	5	0,50	1,8	0,25	-	-	92,4
5	10	0,50	1,8	0,50	-	-	87,2
6	15	0,50	1,8	0,75	-	-	81,9
7	20	0,50	1,8	1,00	-	-	76,7

- 35 Las formulaciones 1-3A comprenden carnauba como una cera comestible, en las que el porcentaje en peso de cera en las composiciones está en el intervalo del 10 al 18% (p/p). Las formulaciones 4-7 comprenden cera de abejas como cera comestible, en las que el porcentaje en peso de cera en las composiciones está en el intervalo del 5 al 20% (p/p).

## 40 Preparación de la formulación de cera con alto contenido de hidrocoloide

#### **Formulación 2 (carnauba)**

Se añadió goma de algarrobo (LBG; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) al 0,5% (p/p) a agua precalentada al 77,3% 45 (p/p) (85°C) durante 15 min con vigorosa emulsificante. También se añadieron ácido oleico (1,8% p/p) (Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, WI) y morfolina al 2,4% (p/p) (Sigma) a la mezcla caliente, seguido de la

adicción de 15 (p/p) de cera de carnauba (95°C) previamente fundida (Aldrich) y goma laca al 3% (p/p) (Safe-Pack, Inc., Kfar Saba, Israel).

### **Formulación 3 (carnauba)**

- 5 La formulación de recubrimiento se preparó añadiendo goma de algarrobo (LBG, Sigma) al (0,45%, p/p) a agua precalentada (74%, p/p) (85°C) durante 15 minutos con agitación vigorosa. Se añadieron a la mezcla ácido oleico (1,6%, p/p) (Aldrich Chemical Company, Inc.) y morfolina (2,2%, p/p) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) seguido de la adición del 18% (p/p) de cera de carnauba previamente fundida (95°C) (Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, WI) y goma laca al 3,6% (p/p) (Safe-Pack, Inc., Kfar Saba, Israel). La formulación se homogeneizó mediante ultra-turrax (T-25, Janke y Kunkel, Alemania) a 24.000 vueltas por minuto (rpm) durante 5 minutos y se agitó hasta que no se observó espuma.

### **Formulación 3A (carnauba)**

- 15 La formulación de recubrimiento se preparó añadiendo goma de algarrobo (LBG, Sigma) al (0,5%, p/p) a agua precalentada (74%, p/p) (85°C) durante 15 minutos con agitación vigorosa. Se añadieron a la mezcla ácido oleico (1,6%, p/p) (Aldrich Chemical Company, Inc.) y morfolina (2,2%, p/p) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) seguido de la adición del 18% (p/p) de cera de carnauba previamente fundida (95°C) (Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, WI) y goma laca al 3,6% (p/p) (Safe-Pack, Inc., Kfar Saba, Israel). Se añadió a la formulación polidimetilsiloxano al 0,01% (p/p) (PDMS; Dow Corning, Bélgica). La formulación se homogeneizó mediante ultra-turrax (T-25, Janke y Kunkel, Alemania) a 24.000 vueltas por minuto (rpm) durante 5 minutos y se agitó hasta que no se observó espuma.

### **25 Formulación 6 (cera de abejas)**

- Se añadió goma de algarrobo (LBG; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) al 0,5% (p/p) a agua precalentada al 82% (p/p) (85°C) durante 15 min con vigorosa emulsión. Se añadieron ácido oleico (1,8% p/p) (Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, WI) y morfolina al 0,75% (p/p) (Sigma) a la mezcla caliente seguido de la adición del 15% (p/p) de cera de abejas previamente fundida (65°C) (New Zealand Beeswax Ltd., Orari, South Canterbury, Nueva Zelanda). Cuando fue necesario, se añadió a la formulación un agente antiespumante, tal como polidimetilsiloxano (PDMS; Dow Coming, Bélgica).

### **Evaluación de las propiedades de la formulación**

- 35 Se midieron el pH, °Brix y la viscosidad de las formulaciones 2, 3 y 6 utilizando un medidor de pH digital (El-Hama, Israel)/(Hanna Instruments, Liemena, Padua, Italia), un refractómetro digital (PR-100, Atago, Japón) y un reómetro Brookfield DV-III (Brookfield, Massachusetts, EE.UU.), respectivamente. Todos los parámetros se midieron a temperatura ambiente de 25°C.

### **40 Recubrimiento de muestras de placas y frutos**

- Una placa cuadrada de aluminio pulido (10 x 10 cm) se recubrió frotando 40 µl de formulación 3 sobre la superficie con la mano (usando guantes de goma) como se describe en Hagenmaier et al., J. Food Sci., 61: 562-565, 1996. La 45 placa recubierta se dejó secar a temperatura ambiente.

- Los pimientos rojos, obtenidos de un mercado local, se lavaron en agua y se secaron suavemente utilizando toallas de papel muy suaves (Hogla, Hadera, Israel). Cada fruta se cortó y se aplastó en muestras con forma cuadrada (10 x 10 cm). Los recubrimientos de cera con alto contenido de hidrocoloides se aplicaron frotando 40 µl de la formulación 50 1 sobre la superficie de la muestra de frutos con la mano (utilizando guantes de goma). Después, los frutos recubiertos se dejaron secar a temperatura ambiente.

### **Recubrimiento de frutos**

- 55 Los frutos de pimiento rojo (*Capsicum annuum* cv. Cannon) (Zeraim, Gedera, Israel) se recubrieron mediante frotamiento manual con 300 µl de las formulaciones 1-7 sobre la superficie de la muestra de fruto a mano (usando guantes de goma). Después, los frutos recubiertos se dejaron secar a temperatura ambiente.

### **Cepillado de placas y muestras de frutos**

Después del recubrimiento con la formulación 3, cada muestra de fruta se cepilló individualmente mediante un aparato de cepillado vertical hecho a medida (Figura 1A). Las muestras se cepillaron utilizando tres tipos diferentes de cepillos compuestos por crin de caballo, polietileno o fibras de nylon suaves. Las propiedades físicas, tales como la longitud y el espesor de los cepillos, se midieron utilizando un calibrador digital (Mitutoyo, Tokio, Japón). Se estudiaron cinco velocidades de rotación diferentes y tres períodos diferentes de tiempo de cepillado. El procedimiento de cepillado se resume en la Tabla 2 y las propiedades físicas de los cepillos se resumen en la Tabla 3.

- 10 Tabla 2. Protocolo de cepillado. Procedimiento de cepillado para muestras de placas de aluminio y frutos del pimiento, con diferentes tipos de cepillos (crin de caballo, nylon, polietileno), intervalos de tiempo de cepillado (minutos) y velocidad de rotación (ronda por minuto).

Caballo/Nylon/Polietileno					Tipo de cepillo	
300	250	200	150	100	Velocidad (rpm)	Tiempo (min)
Placa de aluminio y fruto del pimiento	Placa de aluminio	Placa de aluminio y fruto del pimiento	Placa de aluminio	Placa de aluminio y fruto del pimiento	1	
Placa de aluminio y fruto del pimiento	Placa de aluminio	Placa de aluminio y fruto del pimiento	Placa de aluminio	Placa de aluminio y fruto del pimiento	5	
Fruto del pimiento		Fruto del pimiento		Fruto del pimiento	10	

Tabla 3. Propiedades físicas de los tres tipos de cepillo.

Espesor (mm)*	Longitud (cm)	Tipo de cepillo
0,176 ± 0,03	5	Pelo de caballo
0,284 ± 0,02	5	Polietileno
0,174 ± 0,01	5	Nylon

\* Cada resultado es el promedio de 3 determinaciones ± desviación estándar.

15

### Cepillado de frutos

Después del recubrimiento con las formulaciones 1, 2 y 6, cada fruto de pimiento se cepilló individualmente mediante un aparato de cepillado horizontal hecho a medida (Figura 1B). Las frutas se cepillaron durante 3 minutos a 100 rpm utilizando dos cepillos cilíndricos de crin de caballo. Después del recubrimiento con la formulación 3, cada fruto de pimiento se cepilló individualmente mediante un aparato de cepillado horizontal hecho a medida (Figura 1B durante 5 minutos a 300 rpm usando dos cepillos cilíndricos de crin de caballo).

25

### Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se obtuvieron micrografías SEM de los tres tipos de muestras de fibra de cepillo (polietileno, nylon suave y crin de caballo) utilizando un JEOL JSM-5410 LV SEM (Tokio, Japón). Muestras de los tres tipos de fibras de cepillo utilizadas en este estudio (caballo, polietileno y nylon suave) se recubrieron de oro (espesor del recubrimiento de aproximadamente 2 Å) por un aparato de recubrimiento por pulverización Polaron E5150 (Hertfordshire, Reino Unido) después de la observación y toma de fotografías por JEOL JSM-5410 SEM (Tokio, Japón).

### Mediciones de espesor

El espesor de la placa de aluminio se midió para cada tratamiento (no recubierta, recubierta con la formulación 3 y recubierta (con la formulación 1) y cepillada), utilizando un medidor de espesor de recubrimiento (Elcometer 355, Manchester, Reino Unido). Se obtuvieron tres mediciones en diferentes lugares seleccionados al azar sobre la superficie de la placa. Los resultados se proporcionan como media ± desviación estándar (DE).

30

### Pérdida de peso en función del porcentaje de peso de cera en la formulación (grupo de prueba A)

Se usó el grupo de prueba A que contenía quince (15) frutos de pimiento rojo (*Capsicum annuum* cv. Cannon) (Zeraim, Gedera, Israel) para comparar las tasas de pérdida de peso en función del porcentaje en peso de cera en las formulaciones. Dado que la pérdida de peso está influenciada por el tamaño y el área de superficie del fruto

(Díaz-Pérez et al., J. Sci. Food and Agri., 87, 68-73, 2007), los pimientos elegidos para este estudio fueron de aproximadamente el mismo tamaño con un peso promedio de  $195 \pm 22$  g. Los pimientos se dividieron en siete grupos de tratamiento de la siguiente manera: (1) control no recubierto, (2) recubiertos con la formulación 1 (10% (p/p) de formulación de carnauba), (3) recubiertos con la formulación 2 (15% (p/p) de formulación de carnauba), (4) 5 recubiertos con la formulación 4 (5% (p/p) de formulación de cera de abejas), (5) recubiertos con la formulación 5 (10% (p/p) de formulación de cera de abejas), (6) recubiertos con la formulación 6 (15% (p/p) de formulación de cera de abejas), y (7) recubiertos con la formulación 7 (20% (p/p) de formulación de cera de abejas). Cada fruto se pesó ( $\pm 0,01$  g) cada 24 horas durante 7 días utilizando una balanza STANDARD Serie 165 BJ1000C (Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Suiza). La balanza se conectó a un ordenador y los datos se recopilaron utilizando el 10 software BALINT V5.00 (interfaz de la balanza para Windows, Precisa Instruments AG, Dietikon, Suiza). Los resultados se presentan como promedio  $(W_0 - W_t) \times 100/W_0$ , donde  $W_0$  es el peso en el tiempo cero (es decir, el peso inicial) y  $W_t$  es el peso del pimiento después del tiempo transcurrido  $t$ . Todos los pimientos se almacenaron a  $21^\circ\text{C}$  y 15 al 50% de HR. El déficit de presión de vapor (VPD), que es la diferencia entre la cantidad de humedad en el aire y la cantidad de humedad que el aire puede contener cuando está saturado, fue de 1,24 kPa. Se tomaron imágenes de los pimientos durante el almacenamiento con una cámara digital (Nikon Coolpix 600, Tokio, Japón).

#### **Pérdida de peso en función del tipo de cera y el cepillado (grupo de prueba B)**

Se usó el grupo de prueba B que contenía setenta y cinco (75) frutos de pimiento rojo (*Capsicum annuum* cv. Cannon) (Zeraim, Gedera, Israel) para evaluar el efecto del tipo de cera y el cepillado en la tasa de pérdida de peso. 20 Los pimientos elegidos para este estudio fueron de aproximadamente el mismo tamaño con un peso promedio de  $262 \pm 17$  g. Los pimientos se dividieron en cinco grupos de tratamiento de la siguiente manera: (1) control no recubierto, (2) recubiertos con la formulación 6 (15% (p/p) de formulación de cera de abejas), (3) recubiertos con la 25 formulación 6 seguido de cepillado, (4) recubiertos con la formulación 2 (15% (p/p) de formulación de cera de carnauba), y (5) recubiertos con la formulación 2 seguido de cepillado. Cada fruto se pesó ( $\pm 0,01$  g) cada 24 horas durante 7 días utilizando una balanza STANDARD Serie 165 BJ1000C (Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Suiza). La balanza se conectó a un ordenador y los datos se recopilaron utilizando el software BALINT V5.00 (interfaz de la 30 balanza para Windows, Precisa Instruments AG, Dietikon, Suiza). Los resultados se presentan como promedio  $(W_0 - W_t) \times 100/W_0$ , donde  $W_0$  es el peso en el tiempo cero (es decir, el peso inicial) y  $W_t$  es el peso del pimiento después del tiempo transcurrido  $t$ . Todos los pimientos se almacenaron a  $21^\circ\text{C}$  y al 50% de HR. El déficit de presión de vapor (VPD), que es la diferencia entre la cantidad de humedad en el aire y la cantidad de humedad que el aire puede contener cuando está saturado, fue de 1,24 kPa. Se tomaron imágenes de los pimientos durante el almacenamiento 35 con una cámara digital (Nikon Coolpix 600, Tokio, Japón).

#### **35 Mediciones de brillo (grupo de prueba C)**

Se examinó el brillo de muestras de frutos de pimiento y placas de aluminio que se recubrieron con la formulación 3 utilizando un medidor de visibilidad de superficie plana, capaz de medir el brillo en ángulos coincidentes de  $20^\circ$  y  $60^\circ$  (Novo-Haze, Rhopoint Instrumentation Ltd., Alemania). Los resultados se registraron en unidades de brillo (GU). Una 40 superficie plana altamente pulida de vidrio de color negro sirvió como un estándar al que se le asignó arbitrariamente un valor de brillo de 100 en diferentes ángulos coincidentes. Las mediciones de brillo se llevaron a cabo en la misma muestra cuando no se recubrieron, se recubrieron, se recubrieron y se cepillaron. Cada medición contenía tres lecturas tomadas en diferentes puntos seleccionados al azar en la superficie de la muestra. Todas las mediciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Los resultados se proporcionan como la media aritmética  $\pm$  DE. Las 45 muestras de la superficie del fruto de pimiento de cada tratamiento con la formulación 3 (sin recubrimiento, recubiertas y recubiertas y cepilladas) se fotografiaron utilizando un microscopio DMLM de grado de investigación Leica.

#### **Mediciones de brillo (grupo de prueba D)**

50 Se usó el grupo de prueba D que contenía cuarenta y ocho (48) frutos de pimiento rojo (*Capsicum annuum* cv. Cannon) (Zeraim, Gedera, Israel) para las mediciones de brillo. Los pimientos se dividieron en tres grupos de tratamiento de la siguiente manera: (1) control sin recubrir, (2) recubiertos con la formulación 6 (15% (p/p) de formulación de cera de abejas), y (3) recubiertos con la formulación 6 seguido de cepillado. El brillo promedio para 55 cada tratamiento se midió mediante dos tipos de medidores de brillo.

El primer medidor de brillo fue un medidor de brillo de superficie plana (407 Statistical Glossmeter; Elcometer, Rochester Hills, MI) capaz de medir el brillo en tres ángulos:  $20^\circ$ ,  $60^\circ$  y  $85^\circ$ . Se cortaron ocho pimientos de cada tratamiento en muestras cuadradas planas (5 x 10 cm) utilizando una cuchilla quirúrgica afilada (Bar-Naor Ltd.,

Ramat Gan, Israel). Los resultados se registraron en unidades de brillo (GU), que se refieren a una superficie plana altamente pulida de vidrio de color negro con un valor de brillo de 88,9, 93,5 y 99,7 GU a 20°, 60° y 85°, respectivamente, que sirvió como estándar.

- 5 El segundo medidor de brillo era un medidor de brillo de superficie curvada (Patente de Estados Unidos Número 6.018.396) que ilumina el pimiento con un haz de luz de un láser de helio-neón en un ángulo incidente de 60°. Una placa semiconductora recoge toda la luz reflejada de la superficie de los pimientos. Se usó una grabadora de vídeo (Sony Handycam video Hi8, Tokio, Japón), colocada directamente frente a la placa, para grabar las imágenes. Las imágenes grabadas se transmitieron a un ordenador, donde se analizaron mediante un programa informático especial que las convirtió en una curva goniofotométrica de intensidad de luz (unidades arbitrarias) en función de la distancia o la dispersión de la luz (píxeles). Las anchuras de las curvas en la mitad máxima (50% de intensidad) se midieron como un indicador de brillo (Nussinovitch et al., J. Food Sci., 61, 383-387, 1996). Este aparato permite mediciones de frutos enteros, es decir, es un procedimiento no destructivo. El objeto medido se puede colocar dentro del aparato de medición sin cortarlo o, cuando sea necesario, se pueden usar muestras cortadas. Se 10 midieron doce (12) pimientos enteros (no cortados) de cada tratamiento ( $n = 36$ ). Los resultados se registraron en anchos de curva promedio al 50% de intensidad.
- 15

#### Evaluación de brillo (grupo de prueba E)

- 20 El grupo de prueba E contenía nueve (9) pimientos, que se dividieron en tres grupos de tratamiento ( $n = 3$ ) de la siguiente manera: (1) control sin recubrir, (2) recubiertos con la formulación 3 (18% (p/p) de formulación de cera carnauba), y (3) recubiertos con la formulación 3 seguido de cepillado. Cada miembro del panel de evaluación recibió los nueve pimientos y se les pidió que los clasificara por su apariencia brillante (1- el aspecto menos brillante, 9- el aspecto más brillante).

25

#### Rugosidad (grupo de prueba D)

- Las medidas de rugosidad se llevaron a cabo en muestras de superficie (5 x 10 cm) cortadas con una cuchilla quirúrgica afilada de cuatro pimientos de cada grupo de tratamiento en el grupo de prueba D, ((1) control sin 30 recubrimiento, (2) recubiertos con la formulación 6 (15% (p/p) de formulación de cera de abejas) y (3) recubiertos con la formulación 6 seguido de cepillado) cada 48 horas durante 7 días sucesivos utilizando un medidor portátil de rugosidad de la superficie (Surftest-301, Mitutoyo Corp., Tokio, Japón). Cada medida probó una trayectoria de 7,5 mm. Los resultados se registraron como  $R_a$  y  $R_z$ , donde  $R_a$  es el promedio aritmético de los valores absolutos de la distancia entre la línea media aritmética y el perfil de rugosidad (y) dentro de la longitud de muestreo ( $l_m$ ) calculada 35 usando la ecuación (1); y  $R_z$  es el promedio aritmético de las alturas únicas de pico a valle (Z) de cinco longitudes de muestreo adyacentes calculadas mediante la ecuación (2). Tanto  $R_a$  como  $R_z$  se proporcionan en micrómetros. Cada medición consistió en tres lecturas tomadas a lo largo de trayectorias elegidas al azar sobre la superficie de la muestra. Todas las mediciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Los resultados se proporcionan como media aritmética ± desviación estándar (DE).

40

$$(1) R_a = \frac{1}{l_m} \int_0^{l_m} |f(y)| dx$$

$$(2) R_z = \frac{Z_1+Z_2+Z_3+Z_4+Z_5}{5}$$

#### Color (grupo de prueba F)

45

- Se usó el grupo de prueba F que contenía diez (10) frutos de pimiento rojo (*Capsicum annuum* cv. Cannon) (Zeraim, Gedera, Israel) para la evaluación del color. Los pimientos se dividieron en cinco grupos de tratamiento de la siguiente manera ( $n = 2$ ): (1) control no recubierto, (2) recubiertos con la formulación 6 (15% (p/p) de formulación de cera de abejas), (3) recubiertos con la formulación 6 seguido de cepillado, (4) recubiertos con la formulación 2 (15% (p/p) de formulación de cera de carnauba), y (5) recubiertos con la formulación 2 seguido de cepillado. Los colores de los pimientos de cada grupo de tratamiento se midieron cada 24 horas durante 7 días sucesivos usando Minolta Color Meter CR200 (Osaka, Japón). Antes de la medición, el instrumento se calibró con una placa de color blanco (superficie estándar). Las variaciones en la pigmentación de la superficie de cada pimiento se compensaron registrando el promedio de tres lecturas tomadas en posiciones aleatorias sobre la superficie del pimiento. Los 55 cambios de color se evaluaron mediante tres parámetros:  $L^*$  representa la luminosidad de la muestra y varía de

negro ( $L^* = 0$ ) a blanco ( $L^* = 100$ ),  $a^*$  representa el eje rojo-verde y varía de -60 para verde a +60 para rojo, y  $b^*$  representa el eje amarillo-azul y varía de -60 para azul a +60 para amarillo (Hutchings, Food color and Appearance, Gaithersburg, MD: Aspen Publishers, 2<sup>a</sup> Ed., 227-265, 1999). Los resultados se registraron como valores  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  promedio ± DE.

5

### **Propiedades mecánicas (grupo de prueba D)**

La firmeza de cuatro pimientos de cada grupo de tratamiento en el grupo de prueba D ((1) control no recubierto, (2) recubiertos con la formulación 6 (15% (p/p) de cera de abeja), y (3) recubierto con la formulación 6 seguido de cepillado), se midió cada 48 horas durante 7 días realizando pruebas de punción utilizando una máquina de pruebas universal Instron (UTM) modelo 5544 (Instron Engineering Corp., Canton, MA) equipada con una celda de carga de 50 N. Cada fruta se perforó utilizando un punzón de 3 mm de diámetro a una tasa de deformación de 10 mm min<sup>-1</sup>. La UTM se conectó a un ordenador personal compatible con IBM con una tarjeta. Utilizando el software "Merlin" (Instron), se realizó la adquisición de datos y la conversión de la salida de tensión continua de Instron en función del tiempo en relaciones de fuerza digitalizada frente a la deformación. Los resultados se proporcionan como la media aritmética ± DE.

### **Microscopía (grupo de prueba D)**

Las muestras de la superficie del fruto de pimiento (1 x 1 cm) cortadas con una cuchilla quirúrgica afilada de cada grupo de tratamiento en el grupo de prueba D, ((1) control sin recubrir, (2) recubiertas con la formulación 6 (15% (p/p) de formulación de cera de abejas) y (3) recubiertas con la formulación 6 seguida de cepillado) se fotografiaron (aumento 20x) el primer día de almacenamiento utilizando el accesorio de cámara digital del microscopio de luz (Leica DMLM, Wetzlar, Hesse, Alemania).

25

### **Simulaciones de condiciones de almacenamiento y comercialización (grupos de prueba G y H)**

Se usaron los grupos de prueba G y H que contenían cada uno noventa y seis (96) frutos de pimiento rojo (*Capsicum annuum* cv. Cannon) (Zeraim, Gedera, Israel) para la simulación de condiciones de almacenamiento y comercialización. En cada grupo de prueba los pimientos se dividieron en tres grupos de tratamiento (n = 32) de la siguiente manera: (1) control sin recubrir, (2) recubiertos con la formulación 6 (15% (p/p) de formulación de cera de abejas), y (3) recubiertos con la formulación 6 seguido de cepillado. El grupo G se almacenó a 7°C y al 95% de HR (VPD = 0,05 kPa) durante 3 semanas y el grupo H se almacenó durante 5 semanas en las mismas condiciones de temperatura y HR. Después de sus respectivos períodos de almacenamiento, los pimientos se transfirieron a 20°C y al 75% de HR (VPD = 0,58 kPa) durante 3 días, simulando las condiciones del supermercado (Goren et al., Adv. Horticultural Sci., 25, 26-31, 2011). Cada fruto se pesó antes y después del almacenamiento en frío y una vez más después de los 3 días de almacenamiento a temperatura ambiente. La pérdida de peso se registró y se analizó como se describe anteriormente en el presente documento.

40

### **Evaluación sensorial**

Se llevaron a cabo cinco pruebas de evaluación sensorial en pimientos rojos no recubiertos y tratados (formulaciones 2 y 6).

45

#### **1. Evaluación inicial del sabor**

El primer día del estudio evaluó el sabor de los frutos de pimiento mediante un panel de 18 miembros. El objetivo de esta primera prueba de evaluación del sabor fue estudiar si la formulación de recubrimiento de cera de abejas al 15% (p/p) (formulación 6) cambia el sabor del fruto. Por lo tanto, se realizó una prueba de triángulo ciego, en la que cada miembro del panel recibió tres muestras de fruto: dos frutos no recubiertos y uno recubierto, o dos frutos recubiertos y uno no recubierto. El miembro del panel tuvo que distinguir la muestra diferente basándose únicamente en el sabor.

#### **2. Evaluación del brillo**

55

El objetivo de la evaluación del brillo fue determinar si los productos recubiertos diferían de los no recubiertos a los ojos del consumidor. Cada miembro del panel recibió seis pimientos, dos de cada uno de cada grupo de tratamiento en el grupo de prueba D, ((1) control no recubierto, (2) recubiertos con la formulación 6 (15% (p/p) de formulación de cera de abejas), y (3) recubiertos con la formulación 6 seguido de cepillado), y se les pidió que clasificaran los frutos

de acuerdo con su brillo, representando 1 el aspecto menos brillante y representando 6 el aspecto del pimiento más brillante (Marcilla et al., Spanish J. Agri. Res., 7, 181-189, 2009).

### **3. Evaluación del sabor después del almacenamiento**

5 Después de 1 semana de almacenamiento a 21°C y al 50% de HR, un panel de 13 miembros realizó una prueba de evaluación sensorial adicional. Se realizó otra prueba de sabor para determinar si el recubrimiento del fruto con cera de abejas había creado sabores desagradables como resultado de los cambios en el proceso de respiración normal durante el almacenamiento. Se realizó una prueba de triángulo como se describe anteriormente en el presente 10 documento y, además, se pidió a los evaluadores que describieran el sabor que distinguía la muestra elegida de las otras dos.

### **4. Evaluación de la firmeza sensorial después del almacenamiento**

15 Además, se realizó una prueba de evaluación de firmeza después de 1 semana de almacenamiento a 21°C y al 50% de HR. Se les pidió a los miembros del panel que clasificaran seis pimientos de acuerdo con su dureza, siendo 1 el más blando y 6 el más firme.

### **5. Evaluación sensorial final**

20 25 Se diseñó una prueba de evaluación sensorial final para analizar las preferencias del consumidor considerando todos los parámetros de calidad juntos. Esta prueba consistió en 10 pimientos, dos de cada grupo de tratamiento en el grupo de prueba B ((1) control no recubierto, (2) recubiertos con la formulación 6 (15% (p/p) de formulación de cera de abejas), (3) recubiertos con la formulación 6 seguido de cepillado, (4) recubiertos con la formulación 2 (15% (p/p) de formulación de cera de carnauba), y (5) recubiertos con la formulación 2 seguido de cepillado). Se pidió a cada miembro del panel que eligiera los tres pimientos que compraría en el supermercado.

### **Análisis estadístico**

30 Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software JMP (SAS Institute, 2007, Cary, NC), incluyendo las pruebas t de ANOVA de tres vías y la prueba de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey-Kramer para comparaciones de las medias, siendo  $p \leq 0,05$  considerado significativo.

### **Ejemplo 2: Propiedades de las formulaciones 2, 3 y 6**

35 Se evaluaron las propiedades de las formulaciones 2, 3 y 6. Las mediciones de pH, °Brix y la viscosidad se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Propiedades físicas de las formulaciones de cera con alto contenido de hidrocoloide

Formulación	pH	°Brix	Viscosidad a 70 1/s de tasa de cizallamiento (cP)
2	9,09	28,1	195
3	8,90	15,0	220
6	8,88	19,1	85

40 **Ejemplo 3: Espesor del recubrimiento (formulación 3)**

El espesor de la placa de aluminio sin recubrimiento utilizada en este estudio fue de  $999 \pm 17$  micrómetros. Después de recubrir la placa, se midió un espesor de  $1032 \pm 22$  micrómetros y, después de cepillar la placa revestida, su 45 espesor fue de  $1015 \pm 19$  micrómetros. Por lo tanto, se contempla que el espesor del recubrimiento de cera-hidrocoloide en un metal es de aproximadamente 30 micrómetros, y que el cepillado del material recubierto disminuye el espesor del recubrimiento a la mitad. Debido a que una placa de metal responde de manera diferente a la formulación de recubrimiento en comparación con el fruto, no es concluyente que el espesor del recubrimiento en una placa de metal se asemeje al espesor del recubrimiento del fruto. Además, las mediciones que se llevaron a 50 cabo en la placa no se pudieron realizar en una muestra de fruto por las siguientes razones: existe una gran diversidad entre los espesores de diferentes pimientos, diferentes tamaños de pimientos tienen diferentes áreas de superficie en las que se extiende el recubrimiento, y el fruto poscosecha continúa realizando procesos metabólicos, tal como la respiración, la actividad enzimática, etc. (MacRae et al., Planta, 188, 314-323, 1992). Como resultado, el 55 espesor de la muestra de fruto cambia con el tiempo y no se puede utilizar para las mediciones del espesor del recubrimiento. Sin embargo, a partir de las micrografías tomadas del área de superficie de las muestras de pimiento

no recubiertas, recubiertas y recubiertas y cepilladas (Figuras 2A-2C), es evidente que el espesor del recubrimiento en el fruto de pimiento disminuye al aplicar el procedimiento de cepillado. En la Figura 2A se puede ver claramente la silueta de las células de la superficie, donde, en la Figura 2B, la superficie de las células está cubierta por el recubrimiento. Después del cepillado de la muestra, el espesor del recubrimiento disminuyó, como lo demuestra la 5 silueta de las células de la superficie, que es visible una vez más junto con la capa de recubrimiento (Figura 2C).

#### **Ejemplo 4: Pérdida de peso - Efecto del porcentaje de peso de cera (grupo de prueba A)**

Las pendientes y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de la pérdida de peso en función del tiempo de 10 almacenamiento en pimientos del grupo de tratamiento (1) sin recubrir y recubiertos con formulaciones que comprenden cera de carnauba de los siguientes grupos de tratamiento: (1) sin recubrir, recubiertos con (2) la formulación 1 (10% (p/p) de formulación de carnauba), y (3) recubiertos con la formulación 2 (15% (p/p) de formulación de carnauba), se resumen en la tabla 5.

15 Tabla 5. Tasa de pérdida de peso de pimientos recubiertos por formulaciones que comprenden cera de carnauba con diferentes porcentajes en peso (10 y 15% (p/p)).

Grupo de tratamiento	Formulación	% de cera de carnauba	Tasa de pérdida de peso por hora (%)	$(SE) \cdot 10^{-3}$	$(R^2)$	Significado estadístico
1	-	-	0,11	4,14	0,99	a
2	1	10	0,10	5,11	0,99	b
3	2	15	0,08	4,01	0,99	a

Las pendientes indican la tasa de pérdida de peso en cada tratamiento. El fruto recubierto con la formulación 2, que tiene el mayor contenido de cera (15% (p/p)) entre las formulaciones de cera de carnauba probadas para la pérdida 20 de peso, tuvo una pendiente significativamente menor (menor tasa de pérdida de peso) que los otros dos grupos ( $p \leq 0,05$ ). Su tasa de pérdida de peso fue un 25% menor que la del fruto no recubierto, en el que la pérdida de peso de la formulación 2 (10% de cera de carnauba) fue solo un 12% menor que la del fruto no recubierto. Por lo tanto, se puede concluir que elevar el contenido de cera en la formulación por encima del 10% (p/p) permitió disminuir significativamente la pérdida de peso de los pimientos recubiertos.

25 Las pendientes y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de la pérdida de peso en función del tiempo de almacenamiento en pimientos del grupo de tratamiento (1) sin recubrir y recubiertos con formulaciones que comprenden cera de abejas de los siguientes grupos de tratamiento: (4) recubiertos con la formulación 4 (5% (p/p) de formulación de cera de abejas), (5) recubiertos con la formulación 5 (10% (p/p) de formulación de cera de abejas), (30) (6) recubiertos con la formulación 6 (15% (p/p) de formulación de cera de abejas), y (7) recubiertos con la formulación 7 (20% (p/p) de formulación de cera de abejas), se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Tasa de pérdida de peso de pimientos recubiertos por formulaciones que comprenden cera de abejas con diferentes porcentajes en peso (5, 10, 15 y 20% (p/p)).

Grupo de tratamiento	Formulación	% de cera de abejas	Tasa de pérdida de peso por hora (%)	$(SE) \cdot 10^{-3}$	$(R^2)$	Significado estadístico
1	-	-	0,052	1,41	1,00	a
4	4	5	0,033	1,33	0,99	bc
5	5	10	0,033	1,42	0,99	bc
6	6	15	0,028	1,19	0,99	c
7	7	20	0,027	1,31	0,99	c

35 Los frutos recubiertos con las formulaciones 4 y 5, que comprenden el 5% (p/p) y el 10% (p/p) de cera de abejas, respectivamente, demostraron una disminución de la pérdida de peso de almacenamiento del 37% en comparación con el fruto no recubierto. Las formulaciones 6 y 7, que comprendían un mayor contenido de cera de abejas, permitieron una reducción del 46% y el 48%, respectivamente, en la pérdida de peso de frutos de pimiento, en 40 comparación con los frutos no recubiertos ( $p < 0,05$ ). Por lo tanto, aumentar el contenido de cera en formulaciones que comprendían cera de abeja disminuyó la pérdida de peso de los pimientos recubiertos, en los que las formulaciones que comprendían una concentración de cera por encima del 10% (p/p) permitieron disminuir la pérdida de peso en casi el 50%.

#### **Ejemplo 5: Pérdida de peso - Efecto del tipo de cera y cepillado (grupo de prueba B)**

El peso retenido (%) de los frutos de pimiento del grupo de prueba B (formulaciones 2 y 6) durante los 7 días de almacenamiento se presenta en la Figura 3. Maalekuu et al. (J. Am. Soc. Horticultural Sci., 130, 735-741, 2005) establecieron la relación lineal entre el porcentaje de pérdida de peso en pimientos y el tiempo transcurrido. Aquí se encontraron relaciones similares. Las pendientes y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de la pérdida de peso en función del tiempo de almacenamiento en pimientos del grupo de tratamiento (1) sin recubrimiento y recubiertos por formulaciones que comprenden el 15% (p/p) de cera de carnauba o el 15% (p/p) de cera de abeja de los siguientes grupos de tratamiento: (1) control no recubierto, (2) recubiertos con la formulación 6 (15% (p/p) de formulación de cera de abejas), (3) recubiertos con la formulación 6 seguido de cepillado, (4) recubiertos con la formulación 2 (15% (p/p) de formulación de cera de carnauba), y (5) recubiertos con la formulación 2 seguido de cepillado, se resumen en la tabla 7.

Tabla 7. Tasa de pérdida de peso de pimientos recubiertos por formulaciones que comprenden el 15% (p) de cera de carnauba o el 15% (p/p) de cera de abeja, con y sin cepillado.

Grupo de tratamiento	Formulación	Cepillado	Tasa de pérdida de peso por hora (%)	$(SE) \cdot 10^{-3}$	$(R^2)$	Significado estadístico
1	-	-	0,068	0,79	1,00	a
2	6	-	0,040	0,87	1,00	d
3	6	+	0,045	0,74	1,00	c
4	2	-	0,057	0,79	1,00	b
5	2	+	0,054	0,73	1,00	b

Las pendientes indican la tasa de pérdida de peso en cada tratamiento. El fruto no recubierto tenía una pendiente significativamente mayor (mayor tasa de pérdida de peso) que cualquier otro tratamiento, es decir, que cualquiera de los frutos recubiertos ( $p \leq 0,0001$ ). Esto demuestra que los recubrimientos con cera de abejas o cera de carnauba, independientemente de si van seguidos de cepillado, reducen la tasa de pérdida de peso y contribuyen a la prolongación de la vida útil de los pimientos. La formulación de cera de abejas dio como resultado la menor pérdida de peso, diferenciándose significativamente de ambos tratamientos con cera de carnauba ( $p \leq 0,0001$ ). Además, los frutos recubiertos con cera de abejas y cepillados mostraron una mayor tasa de pérdida de peso que los frutos recubiertos con cera de abejas sin cepillar ( $p \leq 0,05$ ). Esto sugiere que la técnica de cepillado disminuye la integridad del recubrimiento, aunque solo mínimamente porque los pimientos cubiertos con cera de abejas y cepillados demostraron una tasa de pérdida de peso significativamente menor que los controles. Después de 7 días de almacenamiento, el fruto sin recubrir perdió casi el doble de peso en comparación con el peso perdido por el fruto recubierto con cera de abejas. Además, los pimientos no recubiertos perdieron más del 5% de su peso inicial después de 72 horas, es decir, después de 3 días a temperatura ambiente, mientras que los pimientos recubiertos con la formulación de cera de abejas solo perdieron esta cantidad después de 144 horas (6 días). Por lo tanto, el recubrimiento de cera de abejas inhibió el encogimiento del pimiento, conservó su calidad y duplicó su vida útil. Por lo tanto, se concluye que la formulación de cera de abejas fue, con mucho, la formulación más adecuada para la extensión de vida útil de los pimientos rojos.

#### Ejemplo 6: Pérdida de peso - Aspecto visual (grupo de prueba B, formulación 6)

Las diferencias en el aspecto del grupo de prueba de pimientos rojos B (grupos de tratamiento: (1) control sin recubrir, (2) recubiertos con la formulación 6 (15% (p/p) de formulación de cera de abejas), y (3) recubiertos con la formulación 6 seguido de cepillado) durante el almacenamiento a temperatura ambiente, se presentan en la Figura 4. La senescencia del fruto no recubierto tuvo lugar claramente mucho más rápido que en el fruto tratado. Después de 1 semana a temperatura ambiente (panel B), los pimientos no recubiertos comenzaron a encogerse mientras que los pimientos recubiertos mantuvieron su aspecto "fresco". Estas diferencias en el aspecto se manifestaron durante el almacenamiento. Después de 2 semanas (panel C), los pimientos recubiertos y cepillados también comenzaron a encogerse, mientras que el fruto recubierto conservó una superficie lisa. Estos resultados son consistentes con las tasas de pérdida de peso que se muestran en la Figura 3. Las micrografías en las Figuras 5A-5C muestran las diferencias entre el aspecto de la superficie de los pimientos en cada tratamiento (1, 2 y 3). En la Figura 5A, las células del pimiento se pueden observar fácilmente, mientras que en la Figura 5B, la superficie está cubierta por el recubrimiento y, por lo tanto, las células son menos distinguibles, en caso de ser posible. En la Figura 5C, se observan cortes en la superficie del pimiento, lo que apoya la suposición de que el cepillado daña la integridad del recubrimiento.

#### Ejemplo 7: Brillo de la placa de aluminio (formulación 3)

El aluminio es un elemento químico muy brillante. El brillo de la placa de aluminio sin recubrir utilizada en este estudio fue de  $250 \pm 20$  unidades de brillo. Después del recubrimiento, el brillo de la placa disminuyó extremadamente a un promedio de  $60 \pm 10$  unidades de brillo, que es casi el 20% de su brillo antes del recubrimiento. El proceso de cepillado en todos los tipos de cepillos (crin de caballo, polietileno y nylon suave) a 5 intervalos de tiempo de cepillado de 1 y 5 minutos, y las cinco velocidades de cepillado (100, 150, 200, 250 y 300 rpm), aumentaron el brillo de la placa, pero dieron como resultado un efecto muy pequeño y no significativo (Figuras 6A-6B).

#### **Ejemplo 8: Brillo de muestras de fruto de pimiento (grupo de prueba C)**

- 10 La Tabla 8 resume el brillo promedio de los pimientos sin recubrir, recubiertos y recubiertos y cepillados. Después de recubrir a mano las muestras de pimiento con la formulación 3, que comprende el 18% de cera de carnauba, el brillo del pimiento rojo disminuye significativamente. El brillo promedio de las muestras de pimiento sin tratar fue de  $13,2 \pm 1,5$  unidades de brillo en comparación con  $3,7 \pm 0,95$  unidades de brillo después del tratamiento de recubrimiento.
- 15 Concretamente, el recubrimiento disminuye el brillo del producto recubierto en un factor de ~3,6 (hasta -30% del brillo inicial). El pimiento rojo es conocido por su brillo natural que se atribuye a la composición de recubrimiento natural de esterol y cera (Nussinovitch et al., Lebensm.-Wiss. u.-Technol, 29:184-186, 1995). Sorprendentemente, cuando el intervalo de tiempo para el cepillado aumentó de 1 a 5 o 10 minutos, se observó otro fenómeno de la siguiente manera: a 1 minuto, usando cepillos de crin de caballo a 100 rpm, los valores de brillo registrados fueron
- 20  $7,8 \pm 1,4$ , mientras que después de 5 o 10 minutos de cepillado de los valores de brillo registrados aumentaron a  $8,4 \pm 1,0$  y  $9,5 \pm 2,0$ , respectivamente. Por lo tanto, un aumento en el intervalo de tiempo de pulido a la misma velocidad y tipo de cepillo dio como resultado un aumento de los valores de brillo. Cabe destacar que, con este tipo de cepillo y la velocidad de cepillado, no se observaron diferencias significativas al aumentar los intervalos de tiempo de 5 a 10 minutos. El valor de brillo más alto medido (es decir, 9,5), aunque es más bajo en comparación con el valor de la
- 25 pimienta sin recubrir (es decir, 13,2), todavía representa una superficie brillante que podría venderse fácilmente como el producto natural sin recubrir. La mayor contribución del procedimiento de cepillado se observó a 300 rpm. A esta velocidad de cepillado con el cepillo de crin de caballo, el aumento del intervalo de tiempo de cepillado a 10 minutos dio como resultado un brillo observado de  $10,3 \pm 2,0$  valores de brillo, lo que representa un aumento del ~30% de nuevo a ~80% del brillo inicial del pimiento sin recubrir.
- 30 Al aumentar la velocidad de 100 a 200 o 300 rpm utilizando cepillos de polietileno en intervalos de tiempo de cepillado de 1 a 10 minutos, se midió un aumento general en los valores de brillo. Cuanto más largos eran los intervalos de tiempo de cepillado, mayores eran los valores de brillo que se midieron. Sin embargo, solamente el cepillado durante 10 minutos dio como resultado un valor sensorial aceptado de  $8,4 \pm 1,7$  unidades de brillo. Al 35 aumentar la velocidad de 100 a 200 o 300 rpm usando cepillos de nylon a intervalos de tiempo de cepillado de 1 a 10 minutos, los valores de brillo no han cambiado significativamente o mostraron un aumento significativo (Tabla 8).

Tabla 8. Brillo promedio de sin recubrimiento, con recubrimiento y recubrimiento y cepillado (después de cepillar muestras de pimiento rojo a tres velocidades de cepillado (100, 200 y 300 rpm), tres intervalos de tiempo de cepillado (1, 5 y 10 minutos) y uso de tres tipos de cepillos (crin de caballo, polietileno y nylon suave))

Brillo promedio de pimientos recubiertos después del cepillado (GU)*	Tipo de cepillo	Tiempo de cepillado (min)	Velocidad de cepillado (rpm)	Brillo promedio de pimientos recubiertos antes del cepillado (GU)*	Brillo promedio de pimientos no recubiertos (GU)*
$10,32 \pm 2,04$ a	Caballo	10	300	$3,83 \pm 0,32$	$12,72 \pm 0,82$
$9,54 \pm 2,03$ ab	Caballo	10	100	$3,33 \pm 0,12$	$12,74 \pm 0,75$
$9,16 \pm 0,59$ ab	Caballo	5	300	$4,33 \pm 0,29$	$11,49 \pm 1,15$
$8,73 \pm 2,52$ abc	Nylon	5	300	$4,17 \pm 0,50$	$12,88 \pm 0,48$
$8,39 \pm 1,67$ abc	Polietileno	10	300	$3,20 \pm 0,10$	$13,74 \pm 1,56$
$8,37 \pm 1,05$ abc	Caballo	5	100	$2,67 \pm 0,06$	$10,42 \pm 1,19$
$8,37 \pm 3,02$ abc	Nylon	5	100	$3,60 \pm 0,46$	$14,04 \pm 1,48$
$8,29 \pm 0,49$ abcd	Caballo	5	200	$4,17 \pm 0,15$	$12,94 \pm 1,58$
$7,76 \pm 1,42$ abcd	Caballo	1	100	$2,87 \pm 0,15$	$10,99 \pm 1,54$
$7,67 \pm 1,47$ abcd	Nylon	5	200	$2,73 \pm 0,15$	$12,89 \pm 0,76$
$7,47 \pm 1,82$ abcd	Polietileno	1	200	$2,93 \pm 0,06$	$13,07 \pm 1,24$
$7,33 \pm 1,61$ abcd	Caballo	1	200	$2,57 \pm 0,06$	$7,33 \pm 1,61$
$7,29 \pm 0,57$ abcd	Nylon	10	300	$3,07 \pm 0,15$	$14,60 \pm 1,11$
$7,23 \pm 1,21$ abcd	Caballo	10	200	$4,67 \pm 0,25$	$12,81 \pm 1,41$

$6,81 \pm 2,37abcd$	Polietileno	1	300	$3,07 \pm 0,25$	$13,59 \pm 0,88$
$6,49 \pm 2,01abcd$	Polietileno	5	300	$2,47 \pm 0,06$	$13,42 \pm 0,94$
$6,41 \pm 0,56abcd$	Nylon	1	300	$2,50 \pm 0,00$	$15,16 \pm 2,17$
$6,16 \pm 0,76abcd$	Nylon	10	200	$2,57 \pm 0,06$	$12,89 \pm 1,04$
$6,13 \pm 0,50abcd$	Polietileno	1	100	$2,33 \pm 0,12$	$12,21 \pm 1,04$
$6,06 \pm 1,84abcd$	Polietileno	10	200	$2,43 \pm 0,21$	$12,71 \pm 0,66$
$6,03 \pm 0,34abcd$	Caballo	1	300	$2,93 \pm 0,42$	$13,59 \pm 1,51$
$5,89 \pm 0,78abcd$	Nylon	1	200	$2,57 \pm 0,15$	$13,66 \pm 0,81$
$5,49 \pm 0,50abcd$	Nylon	1	100	$2,53 \pm 0,06$	$13,96 \pm 0,98$
$5,18 \pm 1,11bcd$	Nylon	10	100	$2,87 \pm 0,12$	$13,84 \pm 0,97$
$4,26 \pm 0,50bcd$	Polietileno	5	200	$3,23 \pm 0,25$	$13,09 \pm 0,74$
$3,97 \pm 0,51cd$	Polietileno	10	100	$2,97 \pm 0,15$	$12,50 \pm 0,29$
$3,38 \pm 0,54d$	Polietileno	5	100	$4,83 \pm 0,12$	$14,27 \pm 1,58$

\* Cada resultado es el promedio de 9 determinaciones  $\pm$  DE. Las diferencias son significativas a  $p \leq 0,05$ .

Tras la comparación general entre diferentes tipos de cepillos a diferentes velocidades de cepillado e intervalos de tiempo de cepillado, es evidente que el cepillo de caballo es el tipo más eficiente de cepillo, ya que los cepillos de polietileno y nylon son menos eficientes para restaurar el brillo de los pimientos. Sin estar limitado por ninguna teoría o mecanismo de acción, se contempla que la porosidad del cepillo de crin de caballo, como se desprende a partir de su micrografía electrónica de barrido de sección transversal, permite absorber la fluidez de la formulación de cera-hidrocoloide untada que da como resultado una mejor aplicación del recubrimiento en la superficie del pimiento. Tanto los cepillos sintéticos de nylon como los de polietileno, contienen fibras que no son porosas. Por consiguiente, estos cepillos no son capaces de absorber ningún líquido/preparación de recubrimiento y simplemente permiten su untado sobre la superficie (Figuras 7A-7D).

Tras el cepillado del producto recubierto, se obtuvo un aumento en el brillo del fruto recubierto en comparación con la superficie no brillante recubierta (3,7 unidades de brillo en promedio). Este aumento no fue suficiente para restaurar los valores de brillo natural de la piel del pimiento. En el mismo intervalo de tiempo de cepillado (1 minuto) y utilizando el mismo tipo de cepillo (crin de caballo), se obtuvieron los siguientes valores de unidades de brillo:  $7,7 \pm 1,4$  a la velocidad de cepillado de 100 rpm,  $7,3 \pm 1,6$  a la velocidad de cepillado de 200 rpm y  $6,0 \pm 0,3$  a la velocidad de cepillado de 300 rpm. Estos valores son de 1,6 a 2,1 veces mayores que los valores de pimientos no brillantes recubiertos (Tabla 8).

Los resultados presentados en la Figura 8 muestran que cada tratamiento proporciona una diferencia significativa en los valores de brillo. Los pimientos sin recubrimiento mostraron los valores de brillo más altos en comparación con los demás pimientos tratados. Los pimientos recubiertos con la formulación que comprende cera de carnauba fueron los menos brillantes, y los pimientos recubiertos con la formulación que comprende cera de carnauba que se sometió a un tratamiento de cepillado mostraron casi el doble del valor de brillo en comparación con los pimientos recubiertos que no fueron sometidos a un tratamiento de cepillado. Por lo tanto, se concluye que el tratamiento de cepillado posterior al recubrimiento proporciona un aumento significativamente alto en el brillo del fruto. Por lo tanto, al utilizar el procedimiento de cepillado, se pueden obtener pimientos con propiedades mejoradas y menos daños a su aspecto.

#### 30 Ejemplo 9: Brillo de frutos de pimiento (grupo de prueba D)

Se midió el brillo de los frutos de pimiento recubiertos con la formulación 6 que comprende un 15% de cera de abeja y de los pimientos recubiertos que se sometieron después del cepillado. Los resultados de las mediciones del medidor de brillo de superficie se presentan en la Figura 9. Las mediciones tomadas en ángulos de  $60^\circ$  y  $85^\circ$  demostraron que el brillo natural del pimiento disminuye después del recubrimiento con la formulación de cera de abejas y aumenta después del cepillado hasta un nivel que no es significativamente diferente del brillo natural del pimiento sin recubrimiento ( $p \leq 0,01$ ). Las mediciones de brillo utilizando el medidor de brillo de superficie curva mostraron resultados similares. El valor más alto en el ancho total a la mitad de la altura se detectó para el fruto recubierto ( $28,2 \pm 1,0$ ), que fue significativamente diferente ( $p \leq 0,0001$ ) del valor de los pimientos recubiertos y cepillados ( $23,9 \pm 1,1$ ). Se contempla que el ancho a media altura de la curva gonifotométrica indica la inversa del nivel de brillo, es decir, cuanto mayor sea el ancho a media altura, menor será el valor del brillo medido. El aumento del brillo como resultado del cepillado coincidió con el brillo mejorado de los pimientos pulidos en comparación con los no pulidos debido a la estructura regenerada de la capa de cera epicuticular (Charles et al., Postharvest Bio. Technol., 47, 21-26, 2008). Por lo tanto, aunque los valores de brillo más altos se lograron para los frutos no

recubiertos, el recubrimiento con una formulación del 15% (p/p) disminuyó el brillo de los pimientos en ~25%, mientras que el cepillado lo aumentó de nuevo en ~15%, dando como resultado una mera reducción del 10% en su brillo natural.

##### **5 Ejemplo 10: Rulosidad (grupo de prueba D)**

Como resultado de la alta tasa de pérdida de peso del fruto no recubierto durante el almacenamiento (Figura 3), su rugosidad superficial aumentó rápidamente con el tiempo en comparación con los otros dos grupos recubiertos (grupos de tratamiento (2) recubiertos con la formulación 6 (15% (p/p) de formulación de cera de abejas) y (3) 10 recubiertos con la formulación 6 seguido de cepillado) (Figura 10). Después de 7 días de almacenamiento, los valores promedio de  $R_a$  y  $R_z$  de los pimientos no recubiertos fueron de  $5,8 \pm 1,5$  y  $19,4 \pm 7,3 \mu\text{m}$ , respectivamente, significativamente mayores que los valores de  $R_a$  y  $R_z$  de los pimientos recubiertos ( $2,9 \pm 0,9$  y  $12,3 \pm 2,7 \mu\text{m}$ , respectivamente) y los pimientos recubiertos y cepillados ( $2,8 \pm 0,8$  y  $11,8 \pm 2,1 \mu\text{m}$ , respectivamente) ( $p \leq 0,05$ ). Las Figuras 11A y 11B muestran los perfiles de rugosidad de la superficie de los pimientos rojos de los tres tratamientos, 15 concretamente, sin recubrimiento, recubiertos y recubiertos y cepillados, después de 1 y 7 días de almacenamiento, respectivamente. En el primer día de almacenamiento, los tres perfiles de rugosidad fueron similares. Sin embargo, después de 7 días, el perfil sin recubrimiento (y la superficie del pimiento) era más áspero que los perfiles de pimientos tratados. Estos resultados también indican que la formulación de recubrimiento de cera de abejas retardó 20 el proceso de senescencia de los pimientos y, por lo tanto, extendió su vida útil.

20

##### **Ejemplo 11: Color (grupo de prueba F)**

Los pimientos rojos cambian su color durante la maduración debido a una disminución en el pigmento del cloroplasto principal, la clorofila, concomitante con un aumento en los niveles de diversos carotenoides, dando como resultado 25 un color rojo intenso en los pimientos completamente maduros (Ha et al., J. Exp. Botany, 58, 3135-3144, 2007). Durante los primeros 3 días de almacenamiento, tres grupos de tratamiento ((1) control no recubierto, (2) recubiertos con la formulación 6 (15% (p/p) de cera de abejas), y (3) recubiertos con la formulación 6 seguido de cepillado), mostró un aumento en los valores  $a^*$  y  $b^*$ : para el fruto sin recubrir, de  $21,6 \pm 1,8$  a  $28,1 \pm 2,0$  y de  $10,5 \pm 1,5$  a  $14,1 \pm 1,6$ , respectivamente; para el pimiento recubierto con cera de abejas de  $18,9 \pm 2,0$  a  $28,7 \pm 2,3$  y de  $10,0 \pm 2,8$  a 30  $16,1 \pm 1,2$ , respectivamente; para el fruto de cera de abejas recubierto y cepillado de  $19,4 \pm 3,3$  a  $23,8 \pm 1,7$  y de  $11,8 \pm 1,5$  a  $11,8 \pm 1,9$ , respectivamente. Desde el día 3, estos niveles se mantuvieron constantes (mediciones cada 24 horas) hasta el día 7 de almacenamiento.  $L^*$  no mostró ningún cambio en ningún tratamiento durante el almacenamiento, y tuvo un valor promedio de  $33,2 \pm 1,2$ . Estos resultados, recopilados durante los 7 días de almacenamiento, no mostraron diferencias significativas en el cambio de color entre los tres tratamientos (p 35  $\leq 0,0001$ ). Por lo tanto, la formulación de recubrimiento de cera de abejas no afectó al color del pimiento debido a su cambio natural durante el proceso de maduración.

##### **Ejemplo 12: Propiedades mecánicas (grupo de prueba D)**

40 La fuerza de la punción fue similar para los pimientos tratados y no tratados. Los valores sin recubrimiento, con recubrimiento con una formulación de cera de abejas, y con recubrimiento con el 15% (p/p) de formulación de cera de abejas y después con cepillado son  $13,3 \pm 1,8 \text{ N}$ ,  $13,6 \pm 0,8 \text{ N}$  y  $13,5 \pm 0,8 \text{ N}$ , respectivamente. Estos valores no cambiaron significativamente durante los 7 días de almacenamiento ( $p \leq 0,0001$ ). Sin embargo, la deformación en la punción aumentó durante el almacenamiento: el fruto no recubierto sufrió el mayor cambio, dando como resultado 45 una deformación significativamente mayor ( $p \leq 0,001$ ) ( $20,8 \pm 2,4 \text{ mm}$ ) el día 7 de almacenamiento, en relación con el fruto recubierto ( $13,1 \pm 2,7 \text{ mm}$ ) y recubierto y cepillado ( $14,7 \pm 2,1 \text{ mm}$ ) (Figura 12). Estos resultados demuestran que los frutos no recubiertos, después de 7 días a  $20^\circ\text{C}$  y el 50% de HR, fueron menos rígidos que los recubiertos. Por lo tanto, los frutos recubiertos son más rígidos que los no recubiertos, y se muestra que el recubrimiento conserva las propiedades mecánicas del fruto, lo que da como resultado una vida útil más larga.

50

##### **Ejemplo 13: Simulaciones de condiciones de almacenamiento y comercialización (grupos de prueba G y H)**

Los grupos G y H mostraron ambos un porcentaje significativamente mayor de pérdida de peso del fruto sin tratar frente al recubierto con la formulación de cera de abejas al 15% (p/p) después del almacenamiento a  $7^\circ\text{C}$  y el 95% 55 de HR ( $p \leq 0,0001$ ). Después de 3 semanas, la pérdida de peso del fruto no recubierto en el grupo G ascendió al  $3,0 \pm 0,4\%$ , en comparación con el  $2,4 \pm 0,4\%$  y el  $2,4 \pm 0,5\%$  en los frutos recubiertos y recubiertos y cepillados, respectivamente. En el grupo H, después de 5 semanas de almacenamiento, la pérdida de peso del fruto no recubierto fue del  $6,2 \pm 1,3\%$ , en comparación con el  $3,4 \pm 0,5\%$  y el  $3,5 \pm 0,9\%$  para los pimientos recubiertos y recubiertos y cepillados, respectivamente. El porcentaje de pérdida de peso, que se atribuye principalmente a la

pérdida de agua, de los pimientos recubiertos fue mucho más bajo que en otros experimentos que mostraron una pérdida de agua de más del 10% para pimientos recubiertos después de 21 días de almacenamiento en frío (Ozden et al., Euro. Food Res. Technol., 214, 320-326, 2002). Después de 3 días más a 20°C y el 75% de HR, los frutos no recubiertos, recubiertos y recubiertos y cepillados del grupo G perdieron un peso adicional del 1,8 ± 0,3%, 1,3 ± 5 0,2% y el 1,4 ± 0,3%, respectivamente. Para el grupo H, después de 3 días a 20°C y el 75% de HR (después de 5 semanas a 7°C y el 95% de HR), los pimientos sin recubrir, recubiertos, recubiertos y cepillados perdieron un peso adicional del 1,8 ± 0,4%, 1,0 ± 0,2% y el 1,0 ± 0,2% de sus respectivos pesos. Por lo tanto, después de 5 semanas de almacenamiento en frío, el fruto no recubierto perdió el 6,2 ± 1,3% de su peso inicial y ya estaba encogido y blando, mientras que los frutos recubiertos y recubiertos y cepillados perdieron solamente el 3,4 ± 0,5% y el 3,5 ± 10 0,9% de su peso inicial, respectivamente, y mantuvieron su aspecto "fresco" y firmeza.

#### **Ejemplo 14: Evaluación sensorial (formulaciones 2 y 6)**

Tanto en el sabor inicial como en el sabor después de las evaluaciones de almacenamiento, el 60% de los miembros 15 del panel no pudieron distinguir entre el fruto recubierto y el no recubierto. En la segunda prueba de sabor, a los miembros del panel también se les pidió que notaran cualquier diferencia de sabor específica entre las muestras: no se detectaron sabores desagradables para ninguno de los pimientos tratados. Los resultados de la evaluación de brillo estuvieron de acuerdo con las medidas físicas, es decir, los panelistas determinaron que el recubrimiento de cera de abejas y cera de carnauba disminuyó el brillo de los pimientos, mientras que el cepillado lo aumentó a un 20 nivel que no era diferente de forma apreciable del brillo natural. La evaluación de la firmeza mostró que después de 7 días de almacenamiento, los pimientos tratados (recubiertos por la formulación 2 y la formulación 6) eran significativamente más firmes que los no tratados ( $p \leq 0,0001$ ). En la prueba sensorial final, no se eligieron pimientos 25 sin recubrir; el 40% de los pimientos elegidos estaban recubiertos y el 60% estaban recubiertos y cepillados. Estos resultados demuestran que los consumidores tienden a preferir los pimientos recubiertos, y en particular los pimientos recubiertos y cepillados, en lugar de sus homólogos no recubiertos.

Las nuevas formulaciones de la presente invención contribuyen a prolongar la vida útil del pimiento. Además, un procedimiento de cepillado especial puede aumentar el brillo del fruto recubierto después de su disminución como resultado del proceso de recubrimiento.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para reducir la pérdida de peso y conservar el brillo natural de una materia vegetal comestible poscosecha que comprende la etapa de:

5 aplicar a la superficie de la materia vegetal una composición que comprende:

- a) una cera comestible que tiene una temperatura de fusión inferior a 70°C, siendo dicha cera una cera de abeja;
- 10 b) un polímero hidrocoloide no gelificante;
- c) un ácido graso;
- d) un emulsionante; y
- e) agua,

15 recubrir de este modo la materia vegetal comestible con la composición, en el que la cera comestible está presente en un porcentaje en peso que varía del 10% al 25% del peso total de dicha composición, y en el que el hidrocoloide está presente en un porcentaje en peso de hasta el 2% de la composición húmeda.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende además las etapas de:

- 20 i) secar el recubrimiento de la materia vegetal comestible; y  
ii) cepillar la materia vegetal comestible recubierta seca.

3. El método de la reivindicación 2,

- 25 en el que el cepillado se realiza utilizando un cepillo que comprende fibras naturales; o  
en el que el cepillo comprende fibras de crin de caballo; o  
en el que el cepillado se realiza durante 1 a 10 min; o  
en el que el cepillado se realiza a una velocidad de cepillado de 100 vueltas por minuto (rpm) a 300 rpm.

30 4. El método de la reivindicación 1, en el que la materia vegetal comestible es una fruta o una hortaliza que tiene un aspecto brillante natural.

5. El método de la reivindicación 4, en el que la materia vegetal comestible se selecciona del grupo que consiste en pimientos, berenjenas, cerezas, bayas, ciruelas y caquis, preferiblemente en el que la materia vegetal comestible es un pimiento.

6. El método de la reivindicación 1,  
en el que la cera comestible está presente en un porcentaje en peso que varía del 15% al 25% del peso total de la composición; o

40 en el que la composición se aplica a la superficie de la materia vegetal cuando la temperatura de la composición es de 35°C a 50°C.

7. El método de la reivindicación 1, en el que el hidrocoloide está presente en un porcentaje en peso de hasta el 1% de la composición húmeda; o  
45 se selecciona del grupo que consiste en goma de algarrobo (LBG), goma de guar, goma xantana, goma de tragacanto y mezclas de las mismas, preferiblemente en el que el hidrocoloide es la goma de algarrobo.

8. El método de la reivindicación 1, en el que el ácido graso se selecciona del grupo que consiste en ácido oleico, ácido esteárico, ácido palmitíco, ácido láurico, ácido mirístico, ácido behénico, ácido isoesteárico y 50 mezclas de los mismos, preferiblemente en el que el ácido graso es ácido oleico.

9. El método de la reivindicación 1, en el que el emulsionante se selecciona del grupo que consiste en morfolina, amoniaco, lecitina, monoestearato de etilenglicol, lauril sulfato de amonio, esteroil-2-lactilato de sodio, oleato de potasio, monoestearato de propilenglicol, alquil sulfato de sodio y poliglicol, y mezclas de los mismos, 55 preferiblemente en el que el emulsionante es morfolina.

10. El método de la reivindicación 1, en el que la composición comprende:

- a. 10% - 25% (p/p) de cera de abejas;

- b. hasta el 1% (p/p) del hidrocoloide no gelificante;
- c. 0,2% - 10% (p/p) de un ácido graso;
- d. 0,1% - 15% (p/p) de un emulsionante; y
- e. 49%-89% de agua del peso total de la composición;

- 5                   o
- a. 15% - 25% (p/p) de cera de abejas;
  - b. hasta el 1% (p/p) del hidrocoloide no gelificante;
  - c. 0,2% - 3% (p/p) de un ácido graso;
  - d. 0,1% - 5% (p/p) de un emulsionante; y
- 10                 e. 65% - 84% de agua, del peso total de la composición.

11.               Una composición para recubrir una materia vegetal comestible poscosecha que comprende una fruta o una hortaliza que tiene un aspecto brillante natural, comprendiendo la composición:

- 15                 a. una cera comestible que tiene una temperatura de fusión inferior a 70°C, siendo dicha cera una cera de abeja;
- b. un polímero hidrocoloide no gelificante;
- c. un ácido graso;
- d. un emulsionante; y
- 20                 e. agua,

en la que la cera comestible está presente en un porcentaje en peso que varía del 10% al 25% del peso total de dicha composición, y en el que el hidrocoloide está presente en un porcentaje en peso de hasta el 2% de la composición húmeda, y en el que la composición mantiene el aspecto natural brillante de la materia vegetal.

- 25                 12.               La composición de la reivindicación 11,  
en la que la materia vegetal comestible se selecciona del grupo que consiste en pimientos, berenjenas y caquis; o  
en la que la materia vegetal comestible es un pimiento.

- 30                 13.               La composición de la reivindicación 11,  
en la que la cera comestible está presente en un porcentaje en peso que varía del 15% al 25% del peso total de la composición; o  
en la que el hidrocoloide está presente en un porcentaje en peso de hasta el 1% de la composición húmeda.

- 35                 14.               La composición de la reivindicación 11,  
en la que el hidrocoloide se selecciona del grupo que consiste en goma de algarrobo (LBG), goma de guar, goma xantana, goma de tragacanto y mezclas de las mismas, preferiblemente en el que el hidrocoloide es la goma de algarrobo; o  
en la que el ácido graso se selecciona del grupo que consiste en ácido oleico, ácido esteárico, ácido palmítico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido behénico, ácido isoesteárico y mezclas de los mismos, preferiblemente en el que el ácido graso es ácido oleico; o  
en la que el emulsionante se selecciona del grupo que consiste en morfolina, amoniaco, lecitina, monoestearato de etilenglicol, lauril sulfato de amonio, esteroil-2-lactilato de sodio, oleato de potasio, monoestearato de propilenglicol, alquil sulfato de sodio y poliglicol, y mezclas de los mismos, preferiblemente en el que el emulsionante es morfolina.

- 45                 15.               La composición de acuerdo con la reivindicación 11 que comprende:

- a. 10% - 25% (p/p) de cera de abejas;
- b. hasta el 1% (p/p) del hidrocoloide no gelificante;
- c. 0,2% - 10% (p/p) de un ácido graso;
- d. 0,1% - 15% (p/p) de un emulsionante; y
- e. 49% - 89% de agua, del peso total de la composición;

preferiblemente

- 55                 en la que el hidrocoloide no gelificante es goma de algarrobo; o  
en la que el ácido graso es ácido oleico; o  
en la que el emulsionante es morfolina.

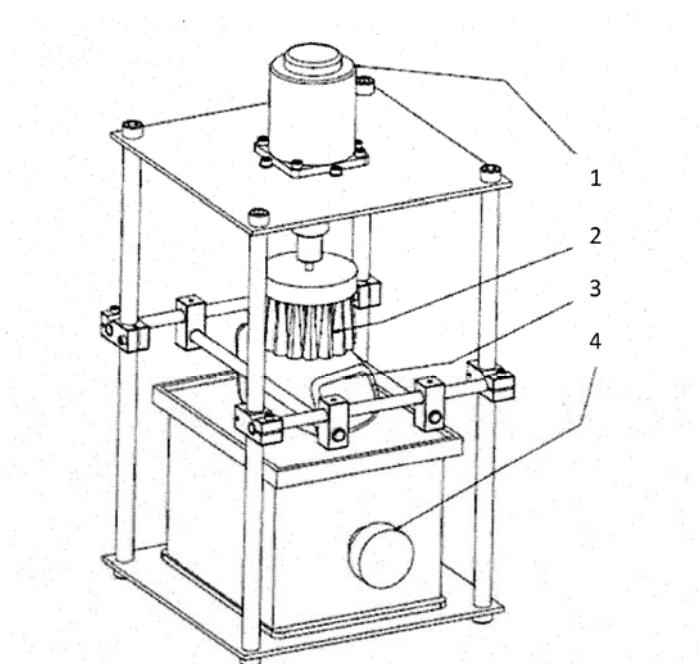


Figura 1A

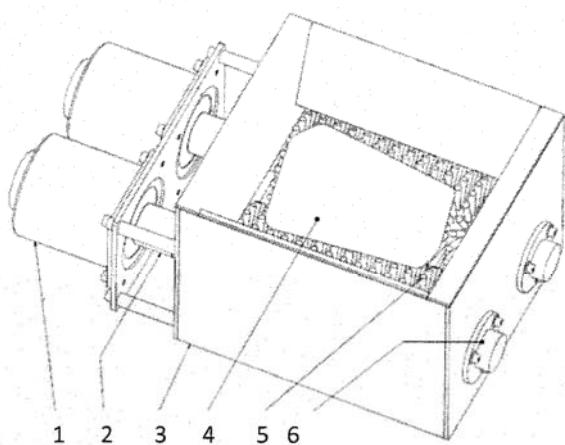


Figura 1B

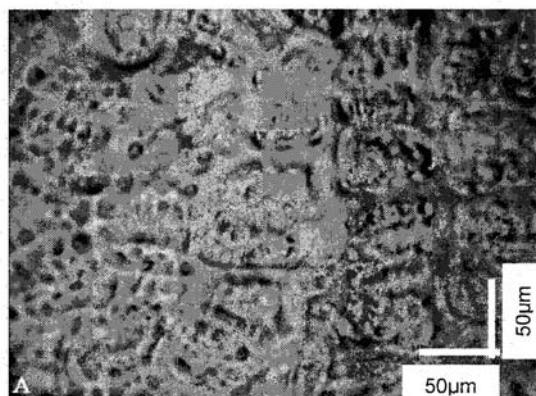


Figura 2A



Figura 2B



Figura 2C

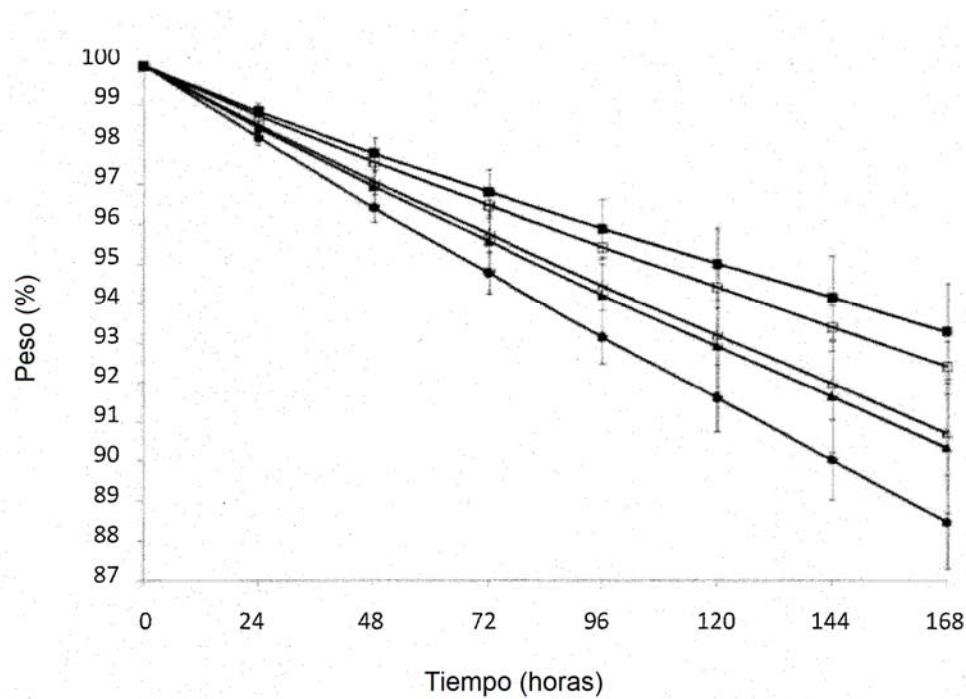


Figura 3

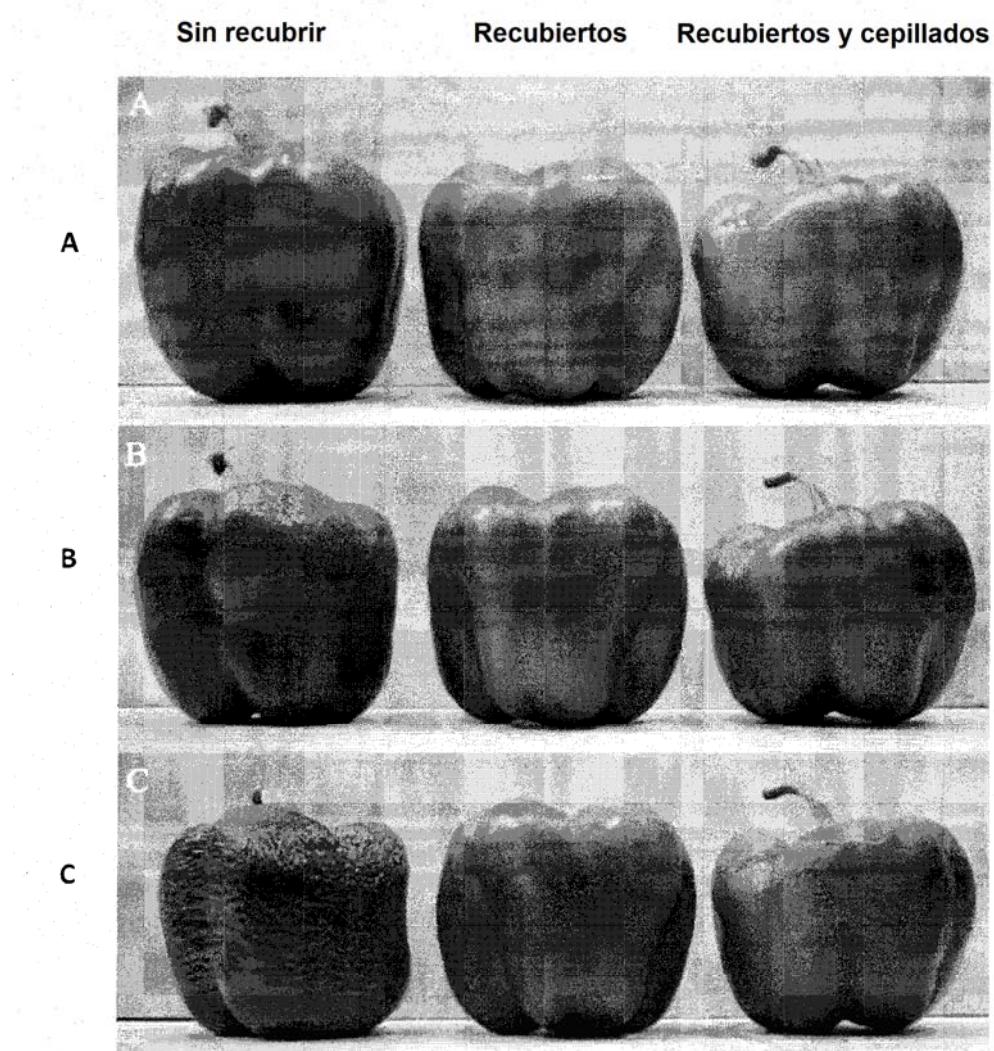


Figura 4

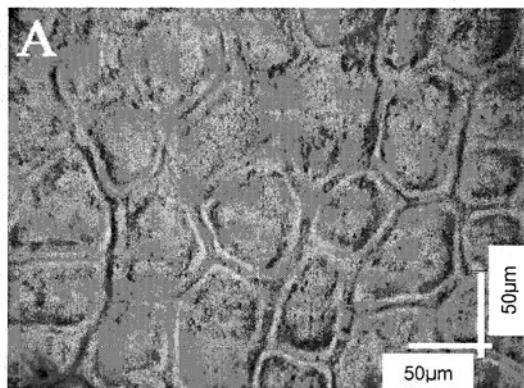


Figura 5A

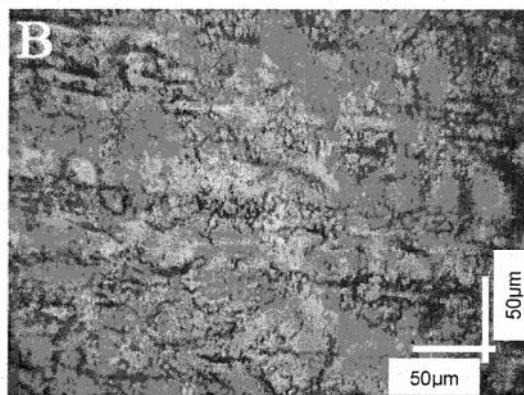


Figura 5B

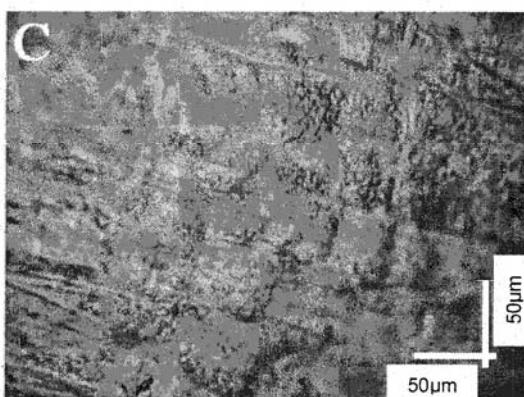


Figura 5C

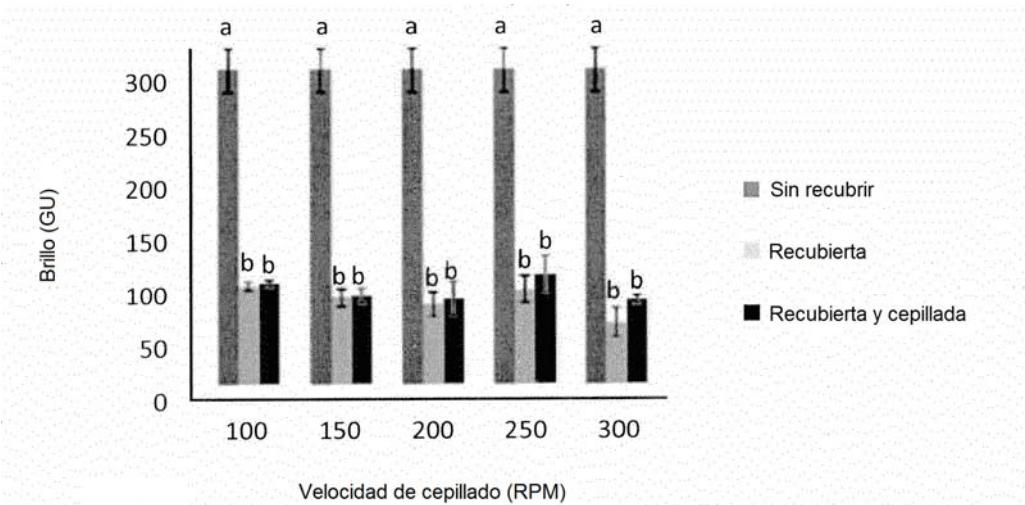


Figura 6A

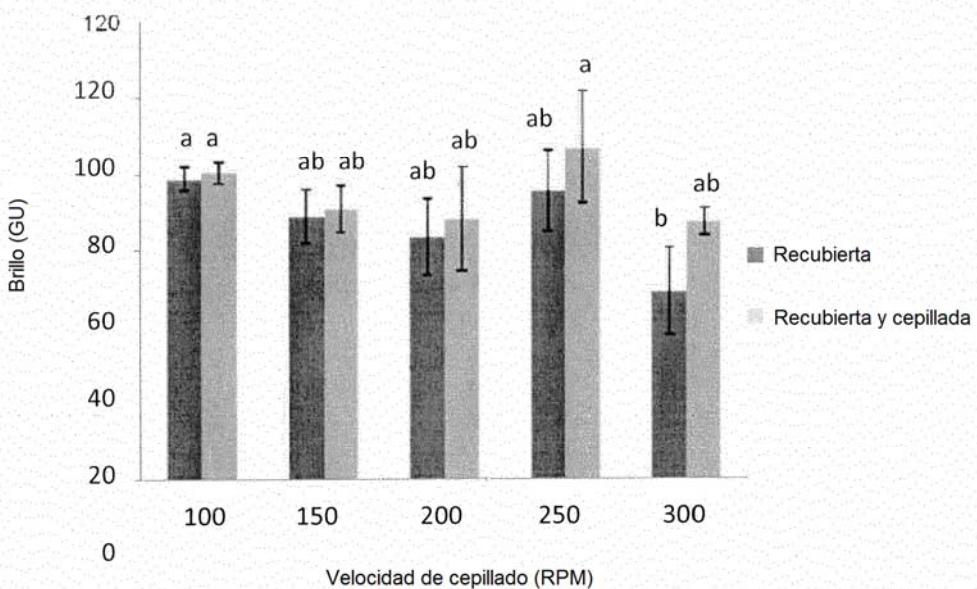


Figura 6B

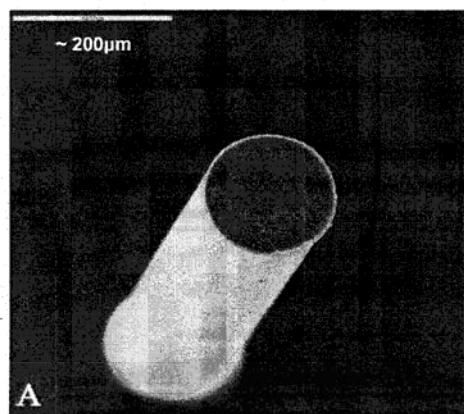


Figura 7A

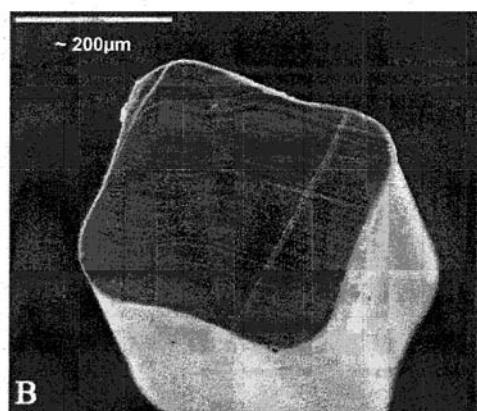


Figura 7B

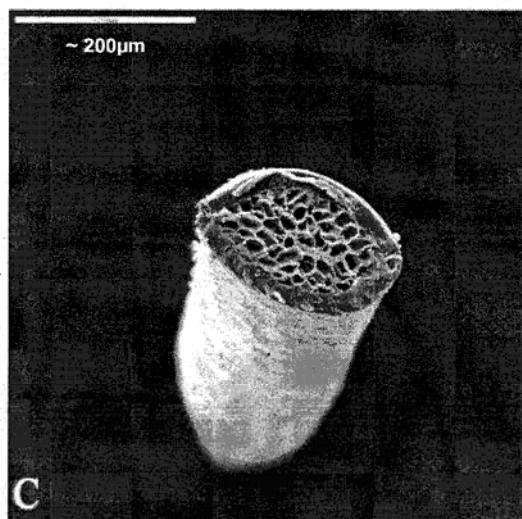


Figura 7C

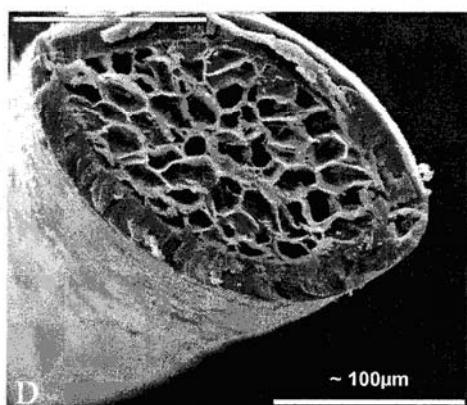


Figura 7D

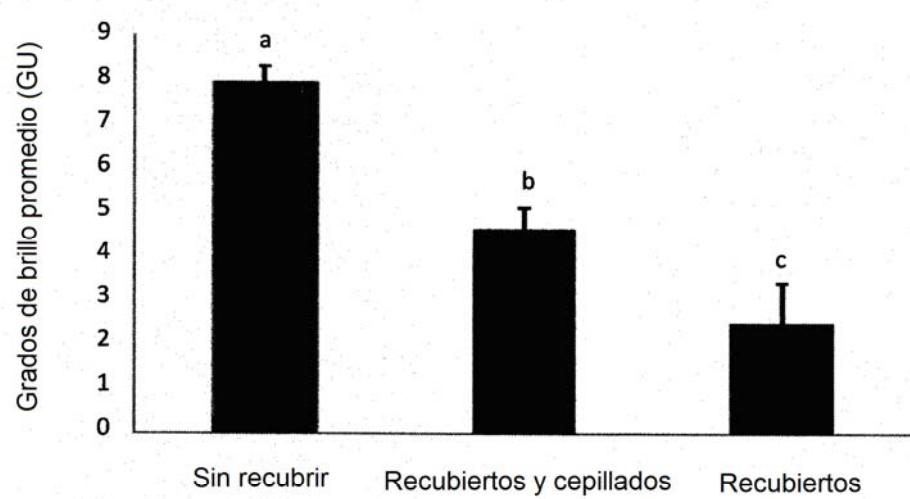


Figura 8

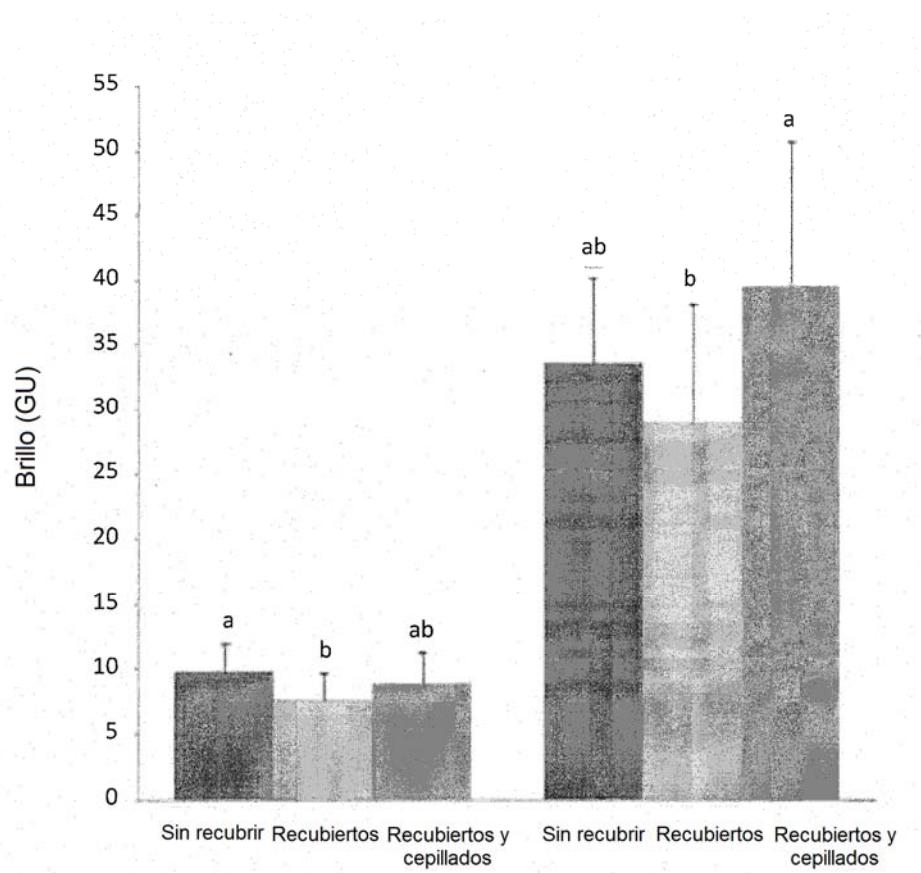


Figura 9

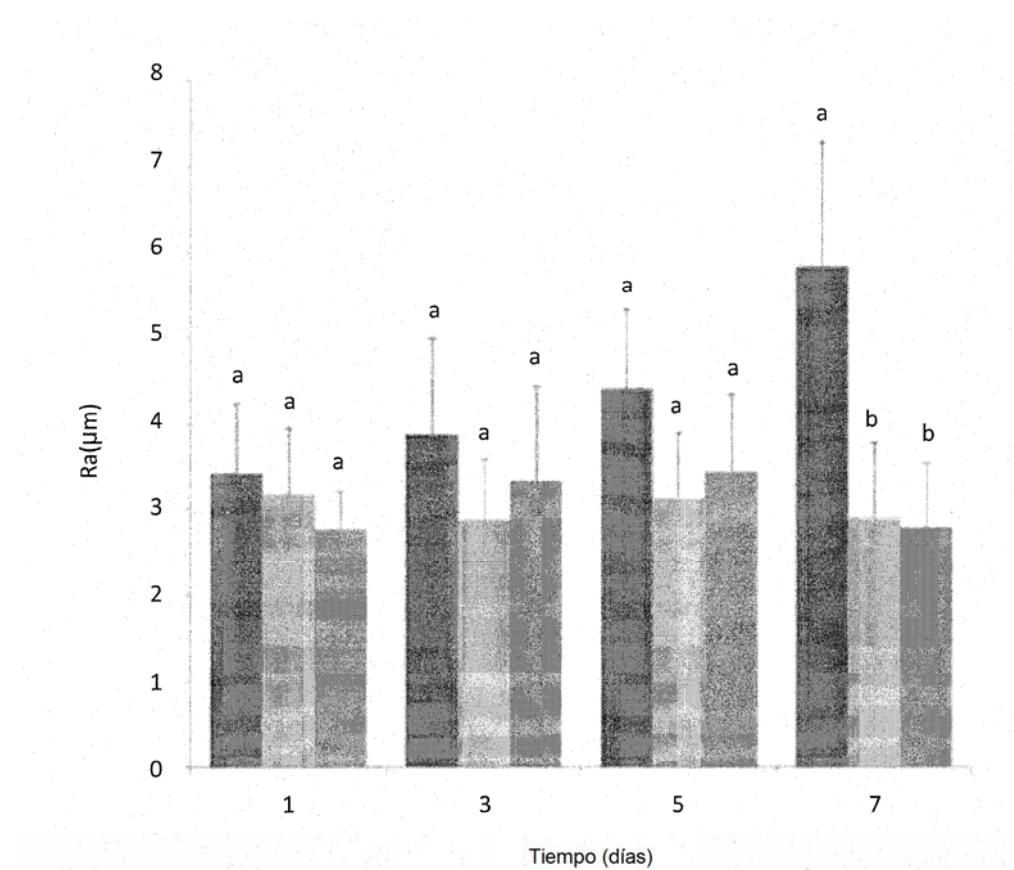


Figura 10

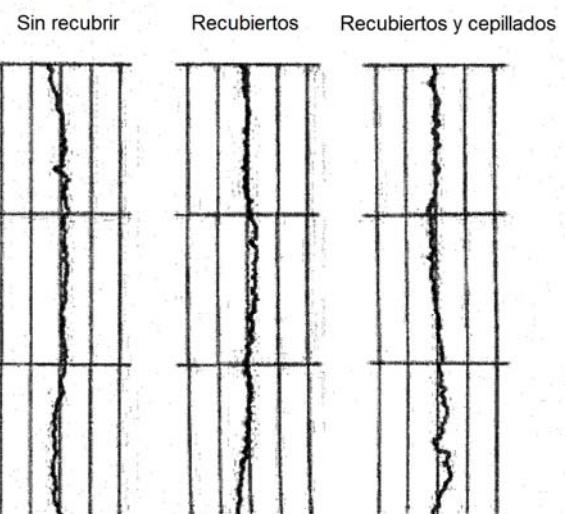


Figura 11A

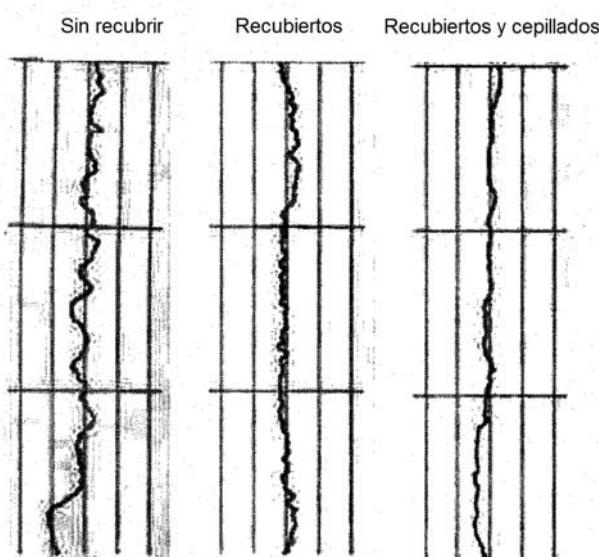


Figura 11B

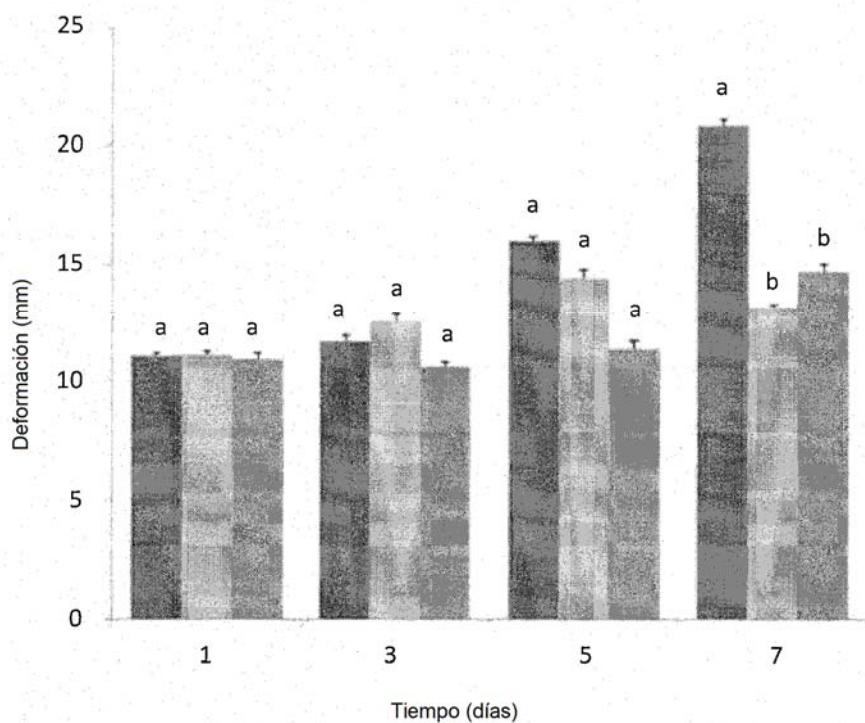


Figura 12