



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 278 052**

51 Int. Cl.:
A01N 65/00 (2006.01)
A01N 49/00 (2006.01)
A01N 31/02 (2006.01)
A01N 27/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02775184 .1**
86 Fecha de presentación : **03.10.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1434486**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **07.07.2004**

54 Título: **Formulación microbicida que comprende aceites esenciales o sus derivados.**

30 Prioridad: **04.10.2001 IL 145767**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2007

73 Titular/es: **State of Israel, Ministry of Agriculture & Rural Development, Agricultural Research Organization (A.R.O.), Volcani Center
P.O. Box 6
Bet Dagan, 50250 IL**

72 Inventor/es: **Ben-Yehoshua, Shimshon**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 278 052 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

Formulación microbicida que comprende aceites esenciales o sus derivados.

5 La presente invención se refiere a medios para inhibir el desarrollo microbiano. Más específicamente, la presente invención se refiere a formulaciones y métodos para inhibir el desarrollo microbiano en productos agrícolas perecederos, higiene doméstica y humana que comprenden componentes oleosos esenciales o derivados de los mismos obtenidos mediante exposición a irradiación luminosa o mediante oxidación, junto con estabilizadores.

10 La pudrición de los productos agrícolas perecederos está causada por la infección microbiana. Tales productos son mantenidos típicamente durante períodos de tiempo suficientemente largos durante los cuales existen las condiciones que permiten la propagación de diferentes microorganismos y por consiguiente, muy a menudo, un alto porcentaje de los productos se llega a infectar. Además de las obvias pérdidas financieras sustanciales debidas a semejante pudrición, algunos de estos microorganismos producen metabolitos tóxicos y carcinogénicos, que son nocivos para los humanos.

15 El control de la infección por patógenos de los productos agrícolas perecederos se logra en la actualidad principalmente mediante la aplicación exógena de fungicidas y/o bactericidas sintéticos. No obstante, estos productos químicos sintéticos dejan residuos tóxicos en el producto. Adicionalmente, también se ha observado el desarrollo de cepas resistentes de microorganismos. Como resultado, algunos de tales fungicidas y bactericidas están siendo retirados progresivamente por las agencias reguladoras. La toxicidad residual y la retirada progresiva potencial han dado lugar al desarrollo de alternativas a los productos químicos sintéticos utilizados en la actualidad para la prevención de la pudrición.

25 Más abajo se describen varias alternativas. Por ejemplo, la irradiación del producto agrícola con luz ultravioleta (Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., Kim, J. J. and Carmeli, S., 1992. Preformed and induced antifungal materials of citrus fruits in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatments. *J Agric. Food Chem.*, 40:1217-1221; Rodov, V., Ben-Yehoshua, S., Kim, J. J., Shapiro, B. and Ittah, Y., 1992. Ultraviolet illumination induces scoparone production in kumquat and orange fruit and improves decay resistance. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.*, 117:188-192), o la exposición del producto a levaduras antagonicas (Wilson, C. L. and Chalutz, E., 1989. Postharvest biocontrol of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. *Scientia Horticulturae*, 40: 105-112). No obstante la radiación U.V. puede ser fitotóxica y el control biológico con la levadura antagonica no está todavía bien aceptado comercialmente, posiblemente debido al control inadecuado de los patógenos. Además, estos métodos tienen algunos inconvenientes y algunas autoridades sanitarias relevantes todavía no han aprobado algunos de ellos.

35 Los cítricos, así como varias otras plantas, poseen alguna resistencia endógena contra los patógenos debido a la producción de sustancias antimicrobianas en los tejidos de las plantas (Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., Kim, J. J. and Carmeli, S., (1992) *Preformed and induced antifungal materials of citrus fruits in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatments. J. Agric. Food Chem.*, 40:1217-1221; Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., Fang, D. Q., and Kim, J. J., (1995) *Preformed antifungal compounds of citrus fruit: effect of postharvest treatments with heat and growth regulators. J Agric. Food Chem.* 43: 1062-1066; Rodov, V., Ben-Yehoshua, S., Fang, D. Q., and Kim, J. J., (1995) *Preformed antifungal compounds of lemon fruit: citral and its relation to disease resistance. J Agric. Food Chem.* 43: 1062-1066). Se ha mostrado previamente que estas sustancias incluyen componentes oleosos esenciales, que muestran un amplio rango de actividad microbiana. En las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.334.619 y 5.958.490 se describe el uso de algunos aceites de origen natural como agentes activos para prevenir la pudrición en productos agrícolas tras su recolección. Sin embargo sólo unos pocos de los componentes oleosos esenciales tienen actividad microbicida.

50 El citral [3,7-dimetil-2,6-octadienal] es un componente oleoso esencial que es producido naturalmente en varias clases de cítricos así como en algunas otras plantas tales como la citronella y el eucalipto. El citral es un aldehído insaturado de la serie de los terpenos y está compuesto de una mezcla isomérica de geranial y neral. Debido a su intenso aroma y sabor a limón, el citral se ha utilizado extensamente en las industrias de la alimentación y la cosmética. El citral está reconocido como un aditivo alimentario seguro y está aprobado para su uso en alimentación por la U.S. Food and Drug Administration. También se ha demostrado que el citral muestra un rango muy efectivo y amplio de actividad antimicrobiana y antifúngica. De hecho, Ben Yehoshua *et al* (1992) y Rodov *et al* (1995) han mostrado que el citral es el compuesto antifúngico constituyente más activo en el limón.

60 El limoneno 1-metil-4-(1-metiletienil)ciclohexeno (también conocido como p-menta-1,8-dieno) es otro ejemplo de un componente oleoso esencial abundante, que puede ser extraído de las glándulas del flavedo de los cítricos. En la Patentes de los Estados Unidos Núm. 4.379.168 y en la Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.951.992 se describe el uso de limoneno como insecticida y plaguicida, respectivamente. No obstante en su forma pura tiene una actividad antifúngica muy baja. Chalchat *et al.* (Chalchat, J.C., Chiron, F., Garry, R.Ph. and Lacoste (2000, *J. Essent. Oil Res.* 12, 125-134) describen la actividad antimicrobiana del hidroperóxido de limoneno contra patógenos humanos.

65 Aureli *et al.* (Aureli, P., Costantini, A. and Zolea, S., 1992. Antimicrobial activity of some plant essential oil against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protection*, 55:344-348) mostraron que algunos componentes oleosos esenciales tienen una fuerte actividad contra bacterias patógenas tales como *Listeria* y sugirieron su uso para prevenir la infección de los alimentos por *Listeria*.

Se han realizado varios intentos de utilizar citral para controlar la pudrición de diversos productos agrícolas. Se ha mostrado que el Citral podía reducir el deterioro del grano de la cebada con alta humedad inoculada con *Aspergillus* (Nandi, B., Thomke S. and Fries, N., 1977. Preservation of high moisture barley grains with citral and allyl caproate and preliminary acceptability tests with piglets. *Acta Agric. Scand.*, 27:105-109), el arroz sin descascarar (Mallick, A. K. and Nandi, B., 1982. Deterioration of stored rough rice. IV. Preservation and palatability of citral and propionic acid treated grains. *Acta Agric. Scand.*, 32:177-187) y el trigo (Ghosh, J. and Nandi, B., 1985. Preservation of high moisture wheat by some antifungal volatile compounds and palatability tests with rats. *Acta Agric. Scand.*, 35:245-254). Arora y Pandey (Arora, R. and Pandey, G. N., 1977. The application of essential oils and their isolates for blue mold decay control in *Citrus reticulata* Blanco. *J. Food Sci. and Tech.* 14:14-16) informaron de que el citral, el geraniol y otros compuestos oleosos esenciales reducen la pudrición por moho azul del fruto de *Citrus reticulata*. El autor de la presente invención (Ben-Yehoshua, S., Rodov, V, Kim, J. J. and Carmeli, S., 1992. Preformed and induced antifungal materials of citrus fruits in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatments. *J. Agric. Food Chem.*, 40:1217-1221) mostró que la aplicación de Citral exógeno a limones inoculados con *Penicillium* inhibía significativamente su pudrición.

En la mayoría de los casos de uso anterior de componentes oleosos esenciales para prevenir la pudrición de los productos agrícolas, el componente oleoso esencial se aplicó a los productos en emulsión acuosa. Si bien se logró la prevención parcial de la pudrición del producto mediante el uso de tales sustancias, los componentes oleosos esenciales, incluyendo el citral y el geraniol, todavía no se utilizan comercialmente para el control de la pudrición de productos agrícolas percederos. Una razón importante para no utilizar esas sustancias es que su aplicación a los productos percederos, a una concentración efectiva contra los microorganismos, causa daño a los productos, lo que causa pudrición más tarde. Por ejemplo, los aceites esenciales causan daños en la piel y cambios de color en la carne. Este daño puede ser severo y produce una pudrición significativa de los productos tratados al cabo de un período de tiempo relativamente corto. Otra razón para la pérdida de su uso comercial es su inestabilidad puesto que muchos de estos aceites esenciales son inestables y tienden a descomponerse antes de llevar a cabo su actividad bactericida.

La presente invención está basada en el hecho de que los componentes oleosos esenciales de grado alimentario o los derivados de los mismos obtenidos mediante exposición a irradiación de luz o mediante oxidación, se pueden utilizar como ingrediente activo en una formulación microbicida efectiva estable para la inhibición del desarrollo microbiano. En semejante formulación se evita el daño fitotóxico conocido de los componentes oleosos esenciales y se prolonga la estabilidad de los componentes oleosos esenciales, produciendo una composición microbicida medioambientalmente favorable.

Así un objeto de la presente invención es proporcionar una formulación acuosa microbicida novedosa que comprende:

- (i) una cantidad efectiva de al menos un componente oleoso esencial, los derivados del mismo, siendo obtenidos dichos derivados mediante exposición a luz o mediante oxidación, o las mezclas de los mismos; y
- (ii) al menos un estabilizador adicional seleccionado del grupo formado por
 - (a) un emulsionante seleccionado del grupo formado por alquilaril polieter alcohol, monolaurato de polietilensorbitán, monooleato de polioxietilensorbitán, octil-fenil polieter alcohol, o mezclas de los mismos,
 - (b) un antioxidante seleccionado del grupo formado por hidroxianisol butilado (BHA), ácido ascórbico, hidroxitolueno butilado (BHT), ácido isoascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, o las mezclas de los mismos, y
 - (c) un agente encapsulante seleccionado del grupo formado por almidón de maíz, maltodextrina, gel de sílice, β -ciclodextrina, caseína, quitosana, o las mezclas de los mismos.

El componente oleoso esencial se selecciona del grupo de los hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos, derivados terpénicos oxigenados, derivados no terpénicos tales como aldehídos, alcoholes, ácidos y compuestos fenólicos. La concentración de los aceites esenciales en la composición microbicida acuosa es de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 1% (v/v). La concentración del derivado del aceite esencial obtenido mediante la exposición a luz es de aproximadamente $1.000 \mu\text{L}^{-1}$ a aproximadamente $12.000 \mu\text{L}^{-1}$. La composición microbicida puede comprender adicionalmente una cantidad adicional de otro biocida en una pequeña cantidad que por sí misma no es suficiente para inhibir el desarrollo microbiano. Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método para inhibir el desarrollo microbiano en productos agrícolas percederos aplicando una formulación acuosa microbicida que comprende

- (i) una cantidad efectiva de al menos un componente oleoso esencial, sus derivados, siendo obtenidos dichos derivados mediante exposición a luz o mediante oxidación, o las mezclas de los mismos; y
- (ii) al menos un estabilizador adicional seleccionado del grupo formado por
 - (a) un emulsionante seleccionado del grupo formado por alquilaril polieter alcohol, monolaurato de polietilensorbitán, monooleato de polioxietilensorbitán, octil-fenil polieter alcohol, o mezclas de los mismos,

ES 2 278 052 T3

- (b) un antioxidante seleccionado del grupo formado por hidroxianisol butilado (BHA), ácido ascórbico, hidroxitolueno butilado (BHT), ácido isoascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, o las mezclas de los mismos, y
- 5 (c) un agente encapsulante seleccionado del grupo formado por almidón de maíz, maltodextrina, gel de sílice, β -ciclodextrina, caseína, quitosana, o las mezclas de los mismos.

10 El componente oleoso esencial se selecciona del grupo de los hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos, derivados terpénicos oxigenados, derivados no terpénicos tales como aldehídos, alcoholes, ácidos y compuestos fenólicos. La formulación puede comprender adicionalmente otro plaguicida en una pequeña cantidad que por sí misma no es capaz de inhibir el desarrollo microbiano.

15 Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar métodos para inhibir el desarrollo microbiano en el hogar aplicando la formulación acuosa microbiana de la presente invención ya sea sola o junto con detergentes utilizados comúnmente.

20 Otro nuevo objeto adicional de la presente invención es proporcionar el uso de la formulación microbiana para la higiene humana donde los aceites esenciales o sus derivados junto con aditivos adecuados se añaden a pastillas de jabón, productos higiénicos, detergentes para lavavajillas, desinfectantes para lavados bucales o aplicaciones cosméticas.

25 Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar el uso de la formulación microbiana como producto nutracéutico para aliviar o tratar pequeñas infecciones causadas por microbios, así como para proporcionar efectos beneficiosos para la salud humana.

Para comprender la invención y para ver cómo se puede llevar a la práctica, se describirá ahora una realización preferida, sólo a modo de ejemplo no limitante, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

30 La Fig. 1 muestra la inducción de la producción de escoparona en limón verde maduro inyectando limoneno tratado al sol, limoneno o citral al albedo o liberando los contenidos de las glándulas oleosas en limones verdes maduros.

La Fig. 2 muestra el efecto de la madurez del fruto de limones sobre la producción de fitoalexinas en frutos de limón verde maduro y limón amarillo.

35 La Fig. 3 muestra la tasa de pudrición de pomelos inoculados con *Penicillium* tratados mediante inmersión en formulaciones de citral, y geraniol.

40 La Fig. 4 muestra la tasa de pudrición de limones inoculados con *Penicillium* tratados con una emulsión acuosa de citral estabilizada con etanol al 25%, amif 72 (hidroxianisol butilado al 20%, de galato de propilo al 6%, y ácido cítrico al 4% en propilenglicol), β -ciclodextrina y monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween 20) en comparación con la pudrición de frutos de la misma clase con 5.000 ppm de Tween 20 sin etanol.

45 La Fig. 5 muestra la tasa de pudrición de limones inoculados con *Penicillium* tratados con una emulsión acuosa de citral que comprende octil-fenil polietil alcohol (Triton X100) e hidroxianisol butilado (BHA).

50 La Fig. 6 muestra la tasa de pudrición de limones inoculados con *Penicillium* tratados con una emulsión acuosa de citral que comprende monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween 20) e hidroxianisol butilado (BHA) en comparación con la tasa de pudrición cuando se añade imazalil. (El imazalil es un fungicida, que se utiliza comúnmente para la protección tras la recolección de frutas y vegetales).

La Fig. 7 muestra la tasa de pudrición de limones inoculados con *Penicillium* tratados con una emulsión acuosa con etanol al 25% de extracto bruto en diclorometano de flavedo de limón verde en comparación con una solución de 1.000 ppm de imazalil y etanol al 25%.

55 La Fig. 8 muestra la tasa de pudrición de limones inoculados con *Penicillium* tratados con una solución acuosa con etanol al 25% de diferentes formulaciones combinadas que comprenden extracto bruto de citral, 1-octanol y diclorometano con etanol al 25% de flavedo de limón que, antes de su uso, se expuso a luz solar durante 4 horas.

60 La Fig. 9 muestra la tasa de pudrición de limones inoculados con *Penicillium* tratados con una solución con etanol al 25% de 5.000 ppm de limoneno expuesto a luz solar durante 3 horas. Se comparó el efecto de la duración de la inmersión así como el número de inmersiones.

65 La Fig. 10 muestra la tasa de pudrición de limones inoculados con *Penicillium* tratados con una solución acuosa de 2.500 ppm de limoneno que, antes de su uso, se irradió con UV durante tres horas y después se disolvió con etanol al 25%. Un tratamiento de inmersión de un minuto con esta solución (3UVL) se comparó con tres inmersiones consecutivas de un minuto en la misma solución con un período de una hora entre estas inmersiones (3UVL3). Estos tratamientos se compararon con una inmersión en agua o en etanol al 25%.

ES 2 278 052 T3

La Fig. 11 muestra el efecto del hidroperóxido de limoneno preparado mediante fotooxidación con Rosa de Bengala sobre el porcentaje de pudrición del limón inoculado con *Penicillium digitatum*.

5 La Fig. 12 muestra el efecto del hidroperóxido de limoneno preparado con un catalizador de molibdato sobre la pudrición del limón inoculado con *Penicillium digitatum*.

La Fig. 13 muestra el efecto de la retirada del catalizador de Rosa de Bengala y la dosificación de Tween 20 sobre la fitotoxicidad del limón tratado con hidroperóxido de limoneno.

10 La Fig. 14 muestra el efecto de la formulación de citral sobre el crecimiento de células de *Staphylococcus aureus*.

La Fig. 15 muestra el efecto del citral y del limoneno tratado al sol sobre el crecimiento de células de *Candida albicans*.

15 Como se ha establecido antes la presente invención proporciona una formulación microbicida medioambientalmente favorable eficaz para prevenir la pudrición en productos agrícolas, en el hogar, para la higiene humana y como composición nutracéutica. La formulación microbicida acuosa comprende como ingrediente activo, al menos un componente oleoso esencial o sus derivados obtenidos mediante la exposición a la luz o mediante oxidación, o mezclas de tales aceites esenciales y/o sus derivados, y al menos un estabilizador adicional seleccionado del grupo formado por un emulsionante, un antioxidante o un agente encapsulante como se ha mencionado antes. El papel del estabilizador es estabilizar los componentes oleosos esenciales de la descomposición antes de realizar su acción microbicida y/o evitar y/o reducir la fitotoxicidad de estos compuestos. El componente oleoso esencial microbicida se selecciona del grupo de los hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos, los derivados terpénicos oxigenados y los derivados no terpénicos, tales como aldehídos (citral o nonanal), alcoholes (octanol, nonanol), y compuestos fenólicos (carvacrol). La formulación microbicida acuosa se puede utilizar para un control y una inhibición eficaces del desarrollo microbiano. Todos los componentes oleosos esenciales son bien conocidos por ser componentes de grado alimentario. Se debe recalcar adicionalmente que todos los componentes de la formulación microbicida acuosa son de grado alimentario, y no plantean ningún perjuicio para el organismo humano. Un amplio uso potencial concreto es para proteger productos agrícolas perecederos de la pudrición causada por los microbios. Entre los productos agrícolas se pueden incluir por ejemplo cualquier producto alimenticio fresco, que se pueda deteriorar como resultado de la infección microbiana, tales como frutas, vegetales, carne o pescado. Otros usos potenciales para la formulación apropiada pueden ser casos cualesquiera en los que se necesite una protección eficaz contra los microbios por ejemplo en el uso doméstico, la higiene corporal o como producto nutracéutico. Para el uso doméstico la formulación microbicida acuosa se puede usar sola o junto con detergentes comerciales. Para el uso de los componentes oleosos esenciales o sus derivados para la higiene corporal, se puede incorporar una cantidad efectiva de estos componentes oleosos esenciales o sus derivados a pastillas de jabón, una formulación limpiadora, detergentes para lavar platos, lavado o composición bucal o una solución o composición desodorante. Una cantidad efectiva de un componente oleoso esencial de la presente invención, concretamente para los aceites esenciales seleccionados entre citral, perillaldehído o limoneno, también puede ser parte de una composición utilizada como producto nutracéutico. Tales composiciones nutracéuticas pueden lograr dos efectos, a saber, para proteger contra las infecciones biocidas así como para producir beneficios adicionales para la salud por ejemplo, para introducir una actividad anti-cancerosa. Se ha encontrado que varias formulaciones de la presente invención comprenden aceites esenciales tales como citral, limoneno, geraniol, mentol, carvona, perillaldehído actúan como agentes anticancerosos y reducen en nivel de colesterol y LDL. Se sabe que el citral y la citronella calman y relajan las emociones y ayudan al organismo para una función digestiva apropiada. Tales componentes oleosos esenciales son conocidos como fitonutrientes o alimentos funcionales.

50 Algunos de los componentes oleosos esenciales son conocidos en la técnica anterior como eficaces para combatir los microbios, especialmente en productos agrícolas. No obstante, los componentes oleosos esenciales adolecen de dos problemas inherentes, que limitaban su uso práctico hasta ahora. Un problema está asociado con su estabilidad limitada, debido al proceso de oxigenación que ocasiona la rápida desintegración de los aceites esenciales tras la exposición a oxígeno. Así, si bien se conocía su uso como potentes microbicidas, semejante uso realmente estaba limitado debido a su corta duración. El uso de cantidades bastante grandes de un aceite esencial con el fin de prolongar su efecto microbicida conduce por último al segundo inconveniente asociado con su uso: La exposición de frutas a altas concentraciones de aceites esenciales, concretamente si la mezcla no forma una verdadera solución, ocasiona el deterioro del producto.

60 Se ha encontrado ahora que cuando los componentes oleosos esenciales se aplican como componente activo de una composición microbicida junto con al menos un aditivo, que estabiliza o disuelve los componentes oleosos esenciales, se obtiene una composición microbicida estable y efectiva que no causa ningún deterioro al producto. Estos aditivos se seleccionan entre un antioxidante, un emulsionante o un agente encapsulante. Cada uno de estos aditivos protege los componentes oleosos esenciales mediante un mecanismo diferente. El emulsionante conserva formando una solución microcoloidal que ayuda en la prevención de la fitotoxicidad de los componentes oleosos esenciales. Los emulsionantes se pueden elegir del grupo formado por alquilaril polieter alcohol (DX), monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween 20), monooleato de polioxietilensorbitán (Tween 80), octil-fenil polieter alcohol (Triton 100). Algunos de estos emulsionantes son de grado alimentario, v.g. Tween 20. La concentración de los emulsionantes debe estar por encima del 0,1% (p/p).

ES 2 278 052 T3

El antioxidante reduce la tasa de oxidación de los aceites esenciales que conduce a su descomposición. Reduce adicionalmente la fitotoxicidad inherente del aceite esencial. El antioxidante se puede elegir del grupo formado por componentes tales como: hidroxianisol butilado (BHA), ácido ascórbico, ácido isoascórbico, α -tocoferol, hidroxitolueno butilado (BHT), β -caroteno o las mezclas de los mismos. Las concentraciones preferidas del antioxidante en la formulación de la invención se encuentran en el intervalo del 0,05% al 0,8% (p/v). El efecto del antioxidante para reducir la fototoxicidad del aceite esencial para el caso de la adición de BHA al citral se demuestra en la Tabla 1, que muestra el Índice de Manchado de la Piel, donde se debe entender que el BHA no ocasiona ningún manchado por sí mismo.

El índice de manchado de la piel se determina mediante

$$\text{Índice} = \frac{\Sigma(\text{puntuación} \times \text{número de frutos que dan puntuación})}{(\text{número total de frutos})}$$

La puntuación de manchado es 0 = sin manchas, 1 = manchas ligeras, 2 = manchas moderadas; y 3 = manchas severas.

TABLA 1

Efecto de una inmersión de 1 minuto del antioxidante BHA sobre manchas en la piel de limones mantenidos a 20°C durante 20 días

Citral (%)	BHA (%)	Índice de Manchado de la Piel
0,0	0,0	0,10
0,5	0,0	0,48
0,5	0,05	0,14
0,5	0,1	0,05
0,5	0,3	0,00
0,5	0,6	0,00
1,0	0,0	0,90
1,0	0,3	0,52

Los agentes encapsulantes añadidos a la formulación forman complejo con los componentes oleosos esenciales, evitándose de ese modo su degradación y prolongando su periodo de acción microbicida eficaz. El agente encapsulante puede ser cualquier clase de matriz o polímero de grado alimentario elaborado de carbohidrato o proteína u otra matriz tal como, pero no limitada a almidón de maíz, maltodextrina, β -ciclodextrina, gel de sílice, caseína, quitosana y las mezclas de los mismos. El polietileno de bajo peso molecular y diferentes ceras también pueden actuar como materiales de encapsulación. De hecho se ha encontrado que añadiendo citral a diferentes formulaciones de ceras que no comprenden fungicida alguno se aumenta la eficacia del citral para reducir tanto la pudrición como la fitotoxicidad. La adición de ciclodextrina al citral producía también una vida más larga del citral en la superficie de las naranjas tratadas. Las concentraciones preferidas del agente encapsulante en la formulación de la invención se encuentran en el intervalo del 0,1 al 0,8% (p/v).

La adición de un emulsionante reduce la fitotoxicidad inherente del aceite esencial. Este efecto se muestra mediante el índice de manchado del aceite esencial citral mediante la adición del emulsionante como se demuestra en la Tabla 2.

ES 2 278 052 T3

TABLA 2

Compendio de pruebas para evaluar la fitotoxicidad de las soluciones de citral que comprenden emulsionantes (razón 1:1 con el citral)¹

5

10

15

20

25

30

	Citral 0,5%	Citral 1,0%
DX	0	0
Tween 80	0	0
Tween 20	0	0
Triton X 100	0	0
Gelatina	1,0	1,4
Laurilsulfato de sodio (SLS)	1,3	1,6
Goma arábica	1,2	1,9
¹ El fruto se sumergió durante 1 minuto en la emulsión y después se mantuvo durante un mes a 20°C. La fitotoxicidad se midió como en la Tabla 1.		

35

40

Se debe observar que además de al menos un componente oleoso esencial, sus derivados obtenidos mediante exposición a irradiación o las mezclas de los mismos, la composición microbicida puede comprender otro biocida a una concentración muy baja. Semejante baja concentración del biocida no es suficiente para evitar el daño microbiano por sí mismo, no obstante junto con los aceites esenciales de la presente invención o sus derivados, se puede evitar la pudrición microbiana. Los ejemplos de tales biocidas son imazalil, tiabendazol, panoptine, rovril, procloraz, orto-fenilfenato de sodio, metalaxilo, fosetil-A1, captan, oxiquinolona, dicloran, cloruro de benzalconio, canon, tiofanato-metilo, triforina, carbendazima, triademinol, vinclozolina, etoconazol, o una mezcla de los mismos. La concentración de tales plaguicidas añadidos puede ser de 5 ppm a 100 ppm. El uso de semejante composición que comprende una combinación de un componente oleoso esencial o sus derivados obtenidos mediante exposición a radiación de luz junto con una pequeña cantidad de fungicida posibilitará dos importantes beneficios:

45

1. Reducir el residuo tóxico del biocida, que es una demanda importante de todas las autoridades sanitarias para todos los fungicidas tóxicos.

2. Controlar el desarrollo de resistencia del patógeno al biocida.

50

Este punto específico se lograría mediante el uso de la nueva formulación con o sin el componente biocida. De hecho, el uso de un biocida diferente, que puede tener un modo de acción diferente, incluso durante un tiempo relativamente corto, se considera el modo recomendado para controlar la población resistente a los biocidas.

55

60

65

Los componentes oleosos esenciales según la presente invención se pueden producir sintéticamente, o pueden ser una preparación de extractos de plantas que comprende una pluralidad de componentes de aceites esenciales, es decir, las mezclas de los mismos. También puede ser una preparación de aceite esencial natural purificada enriquecida con un solo componente oleoso esencial o cualquier combinación del mismo. Las preparaciones que contienen aceites esenciales naturales se pueden producir a partir de diferentes plantas tales como cítricos, citronella y eucaliptos. Los ejemplos no limitantes concretos de los compuestos oleosos esenciales son citral, 1-octanol, heptanol, nonanol, geraniol, octanal, nonanal, decanal, perillaldehído, perillalcohol, citronellol, citronellal, carvona, carveol, linalool, vainillina, aldehído cinámico, eugenol, mentol, limoneno, carvacrol, terpineol, timol, vainillina y alcanfor. En los casos según la invención en los que el aceite esencial es transformado por exposición a la luz, semejante transformación se puede realizar sobre un aceite esencial producido sintéticamente, sobre un aceite esencial extraído naturalmente o un extracto bruto que comprende una pluralidad de aceites esenciales. En el último caso, se pueden transformar uno o más aceites esenciales mientras que otros pueden no resultar afectados. Además, la exposición a la luz se puede realizar antes de la extracción de los componentes oleosos esenciales de su fuente natural o después de su extracción.

Según la presente invención, se puede añadir directamente una mezcla de al menos un componente oleoso esencial o un derivado del mismo obtenido mediante irradiación de luz con el emulsionante y el antioxidante como composición

ES 2 278 052 T3

antimicrobiana a alimentos, artículos de tocador, y artículos domésticos con fines microbicidas. Asimismo, la mezcla se puede preparar en forma de un líquido o como un aerosol añadiendo bases no tóxicas en una cantidad adecuada según se necesite, y se añaden o pulverizan con fines microbicidas.

5 La concentración de al menos un componente esencial necesaria para lograr un efecto puede ser determinada fácilmente por el artesano en cada caso y depende del tipo de aceite esencial así como del modo de aplicación de la preparación. En el caso del citral o el geraniol, una cantidad efectiva oscila entre aproximadamente 0,1%-1%, particularmente 0,2-0,4%.

10 La formulación se puede aplicar al producto que se va a proteger en varios momentos antes y durante su almacenamiento. Cuando la formulación se aplica a frutos, se aplicará preferiblemente antes del envasado, v.g., después de la recolección. La formulación de la presente invención se puede aplicar al producto mediante cualquier método en el que el producto entrará en contacto con una cantidad efectiva de la formulación, es decir una cantidad que inhibirá su infección por microorganismos a lo largo del período de almacenamiento. Los ejemplos para los métodos de aplicación son sumergiendo, fumigando, pulverizando o aplicando espuma al fruto en el local de envasado. Otro método podría ser mediante la incorporación de estas sustancias en el interior de una emulsión cerosa. De hecho, como se ha mencionado previamente, la emulsión cerosa era un disolvente adecuado para tratar varios cítricos.

20 Otro método de aplicación es fumigando el fruto en una cámara relativamente impermeable al aire utilizando la volatilidad de muchas de las sustancias activas tales como el citral.

25 Otro posible método de aplicación se puede realizar cargando las sustancias activas en un material de gel de sílice utilizado como agente secante o como absorbente. Este material podría absorber más del 10% de su peso de las sustancias activas de los autores de la presente invención y albergarlas después como entidad encapsulada. No obstante, cuando la humedad ambiente de este material aumenta se liberan estos biocidas activos y el agua los reemplaza. Por supuesto esta es la situación en la que el fruto está incluido en una sala de almacenamiento o en cualquier contenedor que aloja productos agrícolas perecederos que está transpirando continuamente. Semejante aplicación podría producir una liberación lenta controlada del fungicida posibilitando una protección más duradera contra la pudrición.

30 La formulación también se puede aplicar a través de polímeros de degradación lenta, que durante su degradación liberan el componente oleoso esencial contenido en ellos sobre el producto.

Según la presente invención, el pH de la formulación oleosa es preferiblemente ácido pero también puede ser alcalino con un valor de pH de hasta 9.

35 Como se ha mencionado, la formulación microbicida acuosa debe comprender un estabilizador para disolver el al menos un componente esencial. En caso de que el estabilizador sea el etanol (no reivindicado) se muestra que el citral a una concentración del 0,2% fue mucho más eficaz inhibiendo la pudrición de naranjas de Washington cuando se aplicó como una formulación que contenía el 10%-50% de Etanol que cuando se aplicó, a la misma concentración, en una emulsión acuosa (Tabla 3, ver también el Ejemplo de Referencia 4).

TABLA 3

*Efectos del citral y del etanol al 50% sobre el porcentaje de pudrición de naranjas de Washington no inoculadas
(Números = % de frutos podridos)*

-----Meses de Almacenamiento-----					
Tratamiento	0.5	1	2	3	4
No tratados	5	8	20	29	36
Citral al 0,2%, emulsionante al 0,02% en agua	0	8	28	35	48
etanol al 50% en agua	0	4	14	20	23
Citral al 0,2%, etanol al 50% en agua	0	0	2	3	5
Imazalil, 0,2% en agua	0	2	4	5	8

ES 2 278 052 T3

Además, no se produjo deterioro notable del producto, normalmente asociado con la aplicación del aceite esencial. En presencia de etanol del 10 al 50% el aceite esencial no produce deterioro fitotóxico. El deterioro no se produce ni siquiera cuando los aceites esenciales son aplicables a concentraciones relativamente altas (0,5 al 1%) conocidas en la técnica por infligir un deterioro considerable.

El efecto de tales formulaciones para reducir la pudrición se demuestra de este modo con todos los frutos cítricos sometidos a ensayo en todas las salas de envasado (los resultados se muestran en las tablas 3 y 4) y con frutos de mango y pimienta (datos no mostrados). El experimento con el pimienta mostró un buen control de la mayoría de los patógenos de pimienta en Israel, *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata*.

TABLA 4

Efecto del limoneno expuesto a tres horas de luz solar sobre la pudrición de frutos de kumquat después del almacenamiento durante 11 días a 10°C y simulación de la vida media en el estante a 20°C durante 6 días

Tratamiento	Fin del almacenamiento	
Inmersión en agua	12,0	b
Etanol al 25%	7,9	ab
Limoneno ¹	1,6	a
¹ 5000 µL L ⁻¹ expuesto a luz solar durante 3 horas con etanol al 25% + 5000 µL L ⁻¹ de TWEEN 20.		

Cuantitativamente, el componente oleoso esencial, limoneno, que pertenece a la familia de los monoterpenos hidrocarbonados, comprende aproximadamente el 85% de los componentes oleosos esenciales presentes en cítricos. El limoneno como tal, no obstante, no es adecuadamente activo. A pesar del hecho de que no es activo se ha encontrado que el limoneno puede servir como precursor para un microbicida muy activo exponiendo la piel del fruto homogeneizada a luz solar seguido de extracción del aceite con un disolvente orgánico, particularmente diclorometano, hexano o acetato de etilo. Se puede lograr el mismo efecto mediante irradiación UV del limoneno tras su extracción (Figs. 9 y 10). Lo mismo se aplica al limoneno producido sintéticamente. Adicionalmente, el limoneno se puede oxidar también utilizando agentes oxidantes convencionales. Un ejemplo no limitante concreto es la catálisis heterogénea utilizando una sal molibdato.

De este modo un compuesto microbicida según la presente invención puede comprender limoneno o un extracto bruto de aceites esenciales que comprende una cantidad sustancial de limoneno irradiado con luz. Se debe observar que no se deben utilizar antioxidantes cuando se utilicen tales derivados de aceites esenciales expuestos a irradiación de luz.

Semejante exposición del limoneno a irradiación conduce a una rápida fotooxidación que forma una sustancia antifúngica altamente activa. Tal sustancia puede ser caracterizada como el componente que confiere el color púrpura en la prueba de la vainillina-ácido sulfúrico (más adelante "prueba de la vainillina") o preferiblemente por la fluorescencia azul obtenida como resultado de la irradiación con una lámpara UV. Si bien esta prueba puede reaccionar con otros terpenos y sus compuestos derivados el producto específico del limoneno se puede caracterizar por su color típico y su razón de retención, - Rf en el cromatograma. La foto-oxidación se puede realizar mediante la exposición del limoneno a luz ultravioleta o blanca o mediante su exposición a luz solar. En estos tres casos la sustancia obtenida tenía el mismo tiempo de retención en la HPLC. Estas sustancias producían el mismo color púrpura en la prueba de la vainillina y el mismo punto en una placa de cromatografía en capa fina. De este modo, se puede concluir que todas estas vías de exposición producen la misma sustancia. Se ha encontrado que la clorofila participa en la fotooxidación de limoneno a un nuevo producto que produce la respuesta de color púrpura positiva en el ensayo de la vainillina. Esta sustancia mostró una alta actividad antifúngica en el bioanálisis de inhibición de la elongación de los conidios de *Penicillium digitatum*. La actividad resultante fue mucho mayor que la de la escoparona o la escopoletina, las sustancias conocidas como fitoalexinas endógenas de frutos cítricos, o que la del citral que se sabe que es la sustancia antifúngica constitutiva más activa del limón (Ben Yehoshua *et al.*, 1992).

Otra observación mostró que esta sustancia induce el mecanismo de resistencia de los frutos cítricos, tal como el logro de la acumulación de fitoalexina (Fig. 1). El tratamiento de limones no inoculados inyectando 5 µl de limoneno fotooxidado en el tejido del albedo, inmediatamente por debajo del flavedo, lograba en estos limones la producción

de escoparona y escopoletina hasta niveles adecuados para proteger el fruto del patógeno. Se obtuvieron resultados similares inyectando el extracto bruto en diclorometano o hexano de flavedo de limón que había mostrado que evitaba la pudrición completamente (Fig. 7). Dañando de un modo similar las glándulas oleosas o inyectando limoneno en el tejido de albedo de limones verdes maduros se produjo un efecto muy importante para lograr los mecanismos de resistencia endógena de los frutos cítricos como se ha logrado mediante la acumulación de escoparona en la Fig. 1. Semejante daño del limón produjo una respuesta muy inferior demostrando que la madurez del fruto afecta a esta respuesta de resistencia y el fruto más antiguo es menos protegido (Fig. 2). De hecho, esta menor resistencia del fruto amarillo se observó en muchos otros experimentos. Interesantemente la inyección de citral a diferencia del limoneno no inducía la producción de sustancia activa positiva a la vainillina. Además se encontraron niveles mucho mayores tanto de escoparona (más de 1.000 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco) y de escopoletina (más de 200 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco) después de sumergir el fruto inoculado en el extracto en diclorometano bruto que evitaba la pudrición (Fig. 7). El nivel de fitoalexinas encontrado fue varias veces la cantidad requerida para controlar completamente los patógenos. Así aparentemente, los hidroperóxidos de limoneno construidos forman especies reactivas con oxígeno, lo que provoca el sistema inmunitario de la planta. Tales especies reactivas con oxígeno afectan también al patógeno. Estas especies reactivas con oxígeno tienen una corta vida y se descomponen bien antes de que el fruto sea distribuido al mercado.

Un aspecto importante de esta nueva invención es que el control de la pudrición del patógeno se logra tanto por una inhibición directa del patógeno como por provocar el mecanismo endógeno de resistencia de la planta. De este modo, el limoneno tratado con sol o UV o el extracto bruto tratado al sol ejercen tanto una actividad antifúngica directa como la provocación de la resistencia endógena.

Se ha informado previamente, sin ninguna relevancia para la actividad antifúngica, (Schieberle, P., Maier, W., Firl, J. and Grosch, W. 1987, HPLC separation of hydroperoxides formed during the photosensitized oxidation of (R)-(+)-limoneno. J. of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications p. 588) que la irradiación de limoneno produce diferentes peróxidos. Ahora se muestra que los hidroperóxidos formados, y en concreto el 1-hidroperóxido de (1S,4R)-p-menta-2,8-dieno; el 1-hidroperóxido de (1R,4R)-p-menta-2,8-dieno; el 2-hidroperóxido de (2R,4R)-p-menta-6,8-dieno; y el 2-hidroperóxido de (2S,4R)-p-menta-6,8-dieno se pueden utilizar como biocidas eficaces en la solución acuosa de la presente invención. La presencia de estos hidroperóxidos en el limoneno irradiado de la presente invención se confirmó mediante estudios de cromatografía de gases-espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear (datos no mostrados). En la presente invención se desarrolló un procedimiento novedoso que daba altas concentraciones de hidroperóxidos con Rosa de Bengala como catalizador o activador que aumentaba el oxígeno en la reacción al nivel de energía de oxígeno singlete. La utilización de este procedimiento da lugar a que casi todo el limoneno se convierta en hidroperóxidos. La mezcla de estos hidroperóxidos fue muy eficaz controlando la pudrición de limones inoculados incluso a una dosis de 2.500 ppm (Fig. 11).

Los experimentos realizados muestran claramente que si la extracción bruta de la piel o si el limoneno extraído no se irradiaban o exponían a la luz solar, la solución de limoneno resultante no era en efecto adecuadamente activa y era demasiado variable para la inhibición de la pudrición. La pudrición en tales casos se desarrollaba como si el fruto no se pusiera en contacto con la formulación microbiciada en absoluto. De este modo la actividad antifúngica así como la inducción de los mecanismos de resistencia mostrados mediante la acumulación de escoparona tiene que ver con estos hidroperóxidos de limoneno.

La exposición a luz solar o irradiación del extracto en diclorometano o hexano de flavedo de limón se debe llevar a cabo durante 3 a 6 horas. La eficacia de la formulación de hidroperóxido del extracto como composición biocida crece con períodos más largos de exposición del fruto a la solución de hidroperóxido. La inmersión de la fruta inoculada en una solución de hidroperóxido (limoneno expuesto a 4 horas de luz solar) durante cuatro períodos consecutivos de 1 minuto cada uno produjo la prevención de la pudrición de los limones inoculados mantenidos a 20°C durante un período de más de tres semanas (Fig. 9). El efecto de la exposición del limoneno a 3 horas de luz solar y su eficacia para prevenir la pudrición en comparación con la ausencia de tratamiento (inmersión en agua) o el tratamiento con una solución en etanol (25%) se resumen en la Tabla 4 en un experimento de tipo comercial con fruta no inoculada. Además en una huerta rociada con una formulación acuosa de 5.000, 10.000 o 20.000 ppm de limoneno en una solución de etanol al 25% que había sido totalmente convertida, la producción inducida de escoparona y escopoletina en naranjas Valencia (y fuera) del árbol, redujo la pudrición de este fruto cuando se inoculó con *P. digitatum* tras la recolección (datos no presentados).

En un experimento separado tanto el citral como el limoneno tratado al sol (disuelto con etanol al 25%) mostraron una notable inhibición de otro patógeno *Cladosporium herbarum* desarrollado sobre mazorcas de maíz inoculadas.

El método convencional para controlar la pudrición en salas de envasado de cítricos comprende varios compuestos que son medioambientalmente favorables, pero no están incluidos en la presente formulación por razones técnicas. Tales compuestos son sales de calcio, ácido giberélico, acetaldehído de ácido 2,4-dicloroacético, quitosana o quitosana más una baja concentración de metales tales como Zn o Cu, algunos ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico etc. Estos compuestos podrían ser parte de la formulación medioambientalmente favorable de los autores de la presente invención. De hecho, datos recientes demostraron semejante actividad. De hecho, la disminución del pH de las formulaciones por debajo de 2 o 3 ayudaba también al control del patógeno en experimentos con fruta inoculada.

ES 2 278 052 T3

La invención se ilustrará ahora con más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes con la referencia ocasional a los dibujos adjuntos.

5 Ejemplo 1

Concentración Inhibidora Mínima contra P. digitatum y Modo de acción de los aceites esenciales en comparación con el imazalil

10 La concentración inhibidora mínima (CIM) de más de 50 compuestos encontrados en las glándulas oleosas de frutos de cítricos se evaluó (*in vitro*) estableciendo la concentración más baja del compuesto a la que no se producía crecimiento del patógeno (*in vitro*) en placas Petri. La Tabla 5 da la CIM de los compuestos más prometedores (en comparación con el imazalil). La cantidad requisito de cada uno de los compuestos que se van a someter a ensayo, disuelta en 0,5 ml de acetona, se añadió a una placa Petri (90 mm) estéril que contenía 15 ml de agar patata dextrosa (APD) fundido (50°C) para dar una concentración final de 1 mg ml⁻¹. La placa se agitó suavemente para asegurar una distribución uniforme del compuesto de ensayo y el agar se dejó solidificar. Las placas fueron inoculadas utilizando un disco micelial (8 mm) cortado de un cultivo en placa de agar de *P. digitatum* que todavía no había comenzado la esporulación. Los discos miceliales se colocaron en el centro de cada placa de ensayo y después se pusieron a 24°C. La inhibición fúngica se verificó midiendo el diámetro del crecimiento de las hifas al cabo de 20 7 días.

Se llevó a cabo un ensayo adicional (*in vitro*) para investigar si el modo de acción era fungicida o fungistático; el disco micelial de inóculo de la placa de análisis se transfirió una placa que contenía solo APD. Las placas se verificaron después en cuanto al crecimiento a lo largo de los 5 días siguientes. Si el crecimiento se reanudaba, el compuesto era clasificado como fungistático, y si el crecimiento no se reanudaba se clasificaba como fungicida. Los resultados se muestran en las Tablas 5 y 6.

TABLA 5

Concentración Inhibidora Mínima (CIM) contra P. digitatum y Modos de Acción

Compuesto de Ensayo	CIM mg ml⁻¹ agar	Modo de acción
Imazalil	<0,025	Fungicida
Decanol	0,05	Fungistático
Octanol	0,1	Fungicida
Nonanol	0,2	Fungistático
Citral	0,4	Fungicida
Cinnamaldehído	0,4	Fungicida
Perillaldehído	0,4	Fungicida
Perillalcohol	0,4	Fungicida
Citronellal	0,6	Fungistático
Terpineol	0,8	Fungicida
Carveol	1,0	Fungistático

ES 2 278 052 T3

TABLA 6

Efectos Inhibidores de Diferentes Compuestos contra 3 especies diferentes de Patógenos de Citrus en el Análisis de Difusión en Agar In Vitro

5

AREA DE INHIBICION DEL CRECIMIENTO DEL PATOGENO ¹ (cm ²)			
Compuesto	<i>Geotrichum Candidum</i>	<i>Penicillium italicum</i>	<i>Alternaria citri</i>
Imazalil	8,3	Inhibición total	42,8
Cinnamaldehído	24,2	Inhibición total	Inhibición total
Octanal	3,6	2,6	5,3
Decanol	0,95	Inhibición total	Inhibición total
1-Octanol	Inhibición total	Inhibición total	Inhibición total
Perillaldehído	Inhibición total	Inhibición total	Inhibición total
Citral	10,6	Inhibición total	Inhibición total
¹ La inhibición total es la inhibición máxima que es 62,3 cm ²			

45

Método del Análisis de Difusión en Agar

Se preparó y se esterilizó agar patata dextrosa (Difco). El medio se enfrió después en un baño de agua a 50°C antes de la inoculación mediante la adición de una suspensión de esporas de *P. digitatum* a 10⁴ esporas/ml. El medio se mezcló suavemente para dispersar las esporas uniformemente antes de dispensar 15 ml en cada una de las placas Petri de 90 mm de diámetro. Se pipetearon 5 mg de cada sustancia que se iba a someter a ensayo a un disco de papel de análisis Whatman para antibióticos que se colocó centralmente en la placa de agar inoculada. Las placas se incubaron a 24°C durante 3 días. La actividad antifúngica se verificó midiendo la anchura de la zona despejada desde el borde del disco de papel al área de crecimiento fúngico. Los valores son para el radio (mm) de la zona de crecimiento inhibido del patógeno sobre la placa Petri. Inhibición total significa que el crecimiento estaba completamente inhibido.

En otros experimentos (datos no mostrados) se encontró que el citral y otras formulaciones oleosas esenciales eran eficaces controlando el crecimiento del hongo *P. digitatum* y de la bacteria *Erwinia carotovora*, un patógeno importante de productos agrícolas.

Ejemplo de Referencia 2

Se recogieron pomelos sin manchas del huerto y el mismo día se clasificaron de nuevo en el laboratorio para eliminar los frutos dañados. El pomelo se lavó con agua del grifo y se secó al aire. Cada fruto se inoculó después perforando su tejido de flavedo 1,5 mm de profundidad con una herramienta que incorporaba tres agujas en tres sitios diferentes. Antes de cada perforación, la herramienta se sumergió en una suspensión de esporas de *Penicillium digitatum* (10⁶ esporas/ml). Los pomelos inoculados se mantuvieron a 17°C y a una humedad relativa del 85% durante 24 horas,

ES 2 278 052 T3

después de lo cual los pomelos se dividieron en seis grupos y los pomelos de cada grupo se trataron sumergiéndolos durante dos minutos en: (a) agua; (b) etanol al 25%; (c) Geraniol al 0,2% en EtOH al 25%; (d) Citral al 0,1% en EtOH al 25%, (e) Citral al 0,2% en EtOH al 25% y (f) Citral al 0,5% en EtOH al 25%.

5 Se midió el porcentaje de frutos podridos en cada grupo cada día después del tratamiento y los resultados se muestran en la Fig. 3.

Como se observa en la Fig. 3, los frutos de control (sumergidos solamente en agua) desarrollaron pudrición rápidamente alcanzando el 100% ocho días después de la inoculación. La pudrición del fruto sumergido en Etanol (EtOH) al 25% se retrasó, pero 6 días después de la inoculación comenzó un rápido aumento de la pudrición en los frutos tratados con EtOH y tres semanas después de la inoculación más del 50% de los frutos estaban podridos.

En contraste, los frutos sumergidos en Geraniol al 0,2% y Citral al 0,1-0,2% disueltos en EtOH al 25% mostraron una tasa de pudrición más baja y el día 18° después de la inoculación sólo el 20-40% de los frutos de estos grupos estaban podridos. La inhibición más eficaz de la pudrición resultó de la inmersión de frutos inoculados en Citral al 0,2% disuelto en EtOH al 25% que inhibía completamente la pudrición del fruto hasta 18 días después de la inoculación y producía sólo un 20% de frutos que mostraban pudrición tan tarde como 28 días después de la inoculación. La dosis de Citral al 0,5% era demasiado alta y en este experimento se aumentaba la pudrición debida a la fitotoxicidad.

20 Ejemplo 3

Se inocularon limones como se muestra en el Ejemplo de Referencia 2 y se trataron con y sin etanol al 25% para verificar si 5.000 ppm del emulsionante Tween 20 podría estabilizar la actividad antifúngica del citral. Los resultados, mostrados en la Fig. 4, demuestran que esta concentración de Tween 20 aumenta la actividad del citral. Adicionalmente evita la fitotoxicidad que está causada usualmente por el citral si no se disolvía en etanol. Probablemente el emulsionante posibilita la formación de una emulsión microcoloidal estable, que evita la fitotoxicidad permitiendo la dispersión uniforme del citral, que es fitotóxico por sí mismo en estas concentraciones. Así, el Tween 20 combinado con el BHA antioxidante podría sustituir el etanol en la formulación.

30 Ejemplo de Referencia 4

Naranjas Navel Washington no inoculada se dividieron en cuatro grupos que se trataron como sigue: (a) sin tratamiento; (b) sumergidas en Etanol al 50%; (c) sumergidas en Citral al 0,2% en Emulsionante L-77 al 0,02% (emulsión acuosa); (d) sumergidas en Citral al 0,2% en Etanol al 50%; y (e) sumergidas en una solución acuosa de Imazalil al 2%.

35 Las naranjas se almacenaron después durante cuatro meses a 15°C a una humedad relativa del 50-75% y se midió el porcentaje de frutos podridos en cada grupo a diferentes períodos de tiempo tras el almacenamiento. Los resultados se dan en la Tabla 3.

40 Como se puede observar en la Tabla 3, el porcentaje de frutos podridos tras el tratamiento con la formulación (citral al 0,2% en etanol al 50%) fue significativamente inferior que el del tratamiento o con el citral en una emulsión acuosa o con el etanol solo. Además, los resultados con la formulación son comparables a los logrados con el imazalil. El alto nivel de pudrición en el tratamiento con citral con el 0,02% de emulsionante estuvo causado probablemente por la fitotoxicidad que se observó en este tratamiento debido a la carencia de etanol o de un nivel superior de emulsionante.

45 Ejemplo 6

Los limones inoculados con *Penicillium* como se ha mostrado en el Ejemplo de Referencia 2 se sumergieron durante 2 minutos en una solución acuosa que comprende citral, emulsionante (Triton X100) y BHA a diferentes concentraciones. La concentración de Citral es del 1,0%. La solución de control comprendía Triton X100 al 0,5%. Los resultados se muestran en la Fig. 5. Se muestra claramente el efecto del BHA al 0,1% en el aumento de la actividad del citral para prevenir el desarrollo del patógeno.

55 Ejemplo 7

Los limones inoculados con *Penicillium* como se ha mostrado en el Ejemplo de Referencia 2 se trataron con una solución acuosa que comprendía Citral al 0,5%, BHA al 0,3%, Tween 20 e imazalil y se almacenaron a 20°C durante un período de 21 días. Los resultados se muestran en la Fig. 6. Concentraciones de imazalil de 1 y 10 ppm fueron insuficientes para controlar completamente la pudrición. No obstante, la adición de citral al 0,5% a 10 ppm de imazalil evitó completamente la pudrición y posibilitó la reducción tanto de la dosificación como de los residuos de este efectivo pero no deseable, fungicida sintético. Además del citral a 1 ppm el imazalil no controló la pudrición adecuadamente, pero fue mucho mejor que el imazalil a 1 ppm por sí mismo.

65 Ejemplo 8

Los limones inoculados con *Penicillium* a 10⁴ esporas/ml se sumergieron un día después en una solución acuosa que comprendía citral y un detergente (Tween 20), otros aceites esenciales así como algunas combinaciones de los aceites esenciales más eficaces y se mantuvieron durante un período de seis días. Los resultados de la protección mi-

ES 2 278 052 T3

crobiana lograda con estos diferentes aceites esenciales se muestran en la Tabla 7. Algunos de estos aceites esenciales, particularmente el ácido cinámico, la vainillina, el octanol y mezclas de varios aceites esenciales, fueron más eficaces en estos experimentos que el citral. Adicionalmente su actividad contra *P. digitatum* permaneció durante más tiempo.

TABLA 7

Efecto de diversos aceites esenciales sobre el porcentaje de pudrición de frutos inoculados mantenidos durante 6 días a 20°C		
Núm.	TRATAMIENTO	% Pudrición
1.	Inmersión en agua	73
2.	etanol al 25%	30
3.	5.000 ppm de 1-octanol + EtOH al 25% + 5.000 ppm de Tween 20	7
4	1.000 ppm de Citral + 1.000 ppm de 1-nonanol + 1.000 ppm de 1-octanol + 1.000 ppm de Carveol + EtOH al 25% + 4.000 ppm de Tween 20	7
5.	2.500 ppm de Acido Trans-cinámico + EtOH al 25% + 2.500 ppm de Tween 20	3
6.	2.500 ppm de 1-octanol + EtOH al 25% + 2.500 ppm de Tween 20.	10
7.	2.500 ppm de Benzaldehído + EtOH al 25% + 2.500 ppm de Tween 20	20
8.	2.500 ppm de Citral + EtOH al 25% + 2.500 ppm de Tween 20	13
9.	2.500 ppm de Vainillina + EtOH al 25% + 2.500 ppm de Tween 20	7
10.	2.500 ppm de Carveol + EtOH al 25% + 2.500 ppm de Tween 20	23

Ejemplo 9

Procedimiento general para obtener un extracto bruto más activo de flavedo de limón

Se recogió flavedo (exocarpo) de limón y se extrajo durante la noche en diclorometano, después se expuso a luz solar durante aproximadamente 18 horas hasta que el color del extracto en diclorometano se volvió pardo. El flavedo se mezcló y se filtró a través de una capa de papel Whatman. La solución extraída se evaporó para eliminar el diclorometano y el licor denso se separó adicionalmente mediante cromatografía con una columna de gel de sílice 60

ES 2 278 052 T3

utilizando diclorometano como portador. Se obtuvieron dos fracciones en diclorometano, una de color verde y otra incolora, tras la cromatografía. El extracto activo bruto se aisló mediante la evaporación de la fracción en diclorometano de color verde. Los limones se inocularon con *Penicillium digitatum* a 10^4 esporas/ml se sumergieron 24 horas después de la inoculación en una solución etanólica que comprendía los compuestos positivos a la vainillina extraídos y se mantuvieron a 20°C. El efecto de los compuestos sobre el desarrollo del patógeno en el fruto se verificó diariamente durante el almacenamiento. El efecto se muestra en la Fig. 7, para varias concentraciones (10.000, 5.000 y 2.500 ppm de extracto bruto) en comparación con el efecto logrado por una solución de etanol, imazalil o agua. El extracto bruto a 10.000 ppm evitó completamente el desarrollo del patógeno. En semejante alta dosis del extracto bruto, algunos frutos mostraron algo de fitotoxicidad. No obstante se ha demostrado que esta fitotoxicidad era causada principalmente por diferentes componentes y no por los componentes antifúngicos activos puesto que la fitotoxicidad se pudo eliminar a la vez que se mantuvo la actividad biocida.

Se lograron resultados similares con las extracciones en hexano de limoneno.

15 Ejemplo 10

Se prepararon hidroperóxidos de limoneno mediante las dos rutas siguientes a partir de limoneno.

Ruta 1: Mediante foto-oxidación: La conversión de limoneno y el rendimiento de la reacción fue casi del 100% al cabo de un tiempo de reacción de aproximadamente 8 horas. Se utilizó EtOH puro como disolvente, Rosa de Bengala como activador. Otros activadores luminosos, por ejemplo clorofila, también catalizan la reacción. Se utilizó una lámpara de mercurio de alta presión con un filtro WG 345 para la reacción fotocatalítica. Otras vías de excitación luminosa, como la luz monocromática (emisión de luz ≈ 345 nm en el caso del Rosa Bengala), luz UV, láser también dan un producto de hidroperóxido de limoneno.

Ruta 2: A través de una ruta catalítica heterogénea (sin luz). Se utilizó molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) como catalizador, se añadieron 300 ml de H_2O_2 concentrado como agente de oxidación al disolvente, a 700 ml de EtOH. Las condiciones de reacción para obtener los productos deseados fueron: presión atmosférica, 50°C de temperatura y tiempo de reacción de 5-6 horas con agitación continua. La conversión de limoneno y el rendimiento de la reacción fueron casi del 100%.

Se compararon los productos de las dos rutas. Las mediciones mediante cromatografía de gases mostraron distribuciones de producto aproximadamente similares. La actividad antifúngica de los productos preparados en las dos rutas diferentes se verificaron en el mismo método. Los limones inoculados con *Penicillium* (10^4 esporas/ml) se sumergieron en una solución acuosa que comprendía hidroperóxido de limoneno, un detergente (Tween 20), y etanol. La pudrición se evaluó a intervalos específicos durante un período de 26 días. Los resultados de la protección microbiana lograda con estas mezclas se muestran en las Figs. 11 y 12.

En el caso de la Ruta 1, la fitotoxicidad del fruto tuvo lugar tras la inmersión. El incremento de la cantidad de Tween 20 en la mezcla y la separación del Rosa de Bengala eliminaron o al menos redujeron notablemente esta fitotoxicidad. El Rosa de Bengala se separó del hidroperóxido activo montando la solución sobre una columna de Sílice utilizando una mezcla de hexano-acetato de etilo 9:1. Después de la eliminación del Rosa de Bengala se encontró que si había deterioro fitotóxico era muy pequeño.

La formulación utilizada comprende hidroperóxido de limoneno al 0,25%, Tween 20 al 1%, 400 ppm de Rosa de Bengala y EtOH al 25%. Semejante composición, inhibía completamente el desarrollo de la pudrición, sin ninguna fitotoxicidad. Dieciséis días después de la inoculación no se encontró pudrición en los frutos tratados, mientras que en la muestra utilizada como control, el fruto inoculado se pudrió al cabo de 5 días (Fig. 11). Este efecto antifúngico se puede explicar tanto por el efecto antifúngico directo del hidroperóxido de limoneno como también por el incremento del nivel de escoparona y escopoletina inducido por el hidroperóxido de limoneno mostrado previamente para el limoneno tratado al sol (Fig. 1).

En el caso de la Ruta 2, la formulación utilizada comprendía hidroperóxido de limoneno al 0,5% y al 0,25%, Tween 20 al 2% y EtOH al 25%. No se desarrollo pudrición de los limones inoculados durante 12 días (Fig. 12). La dosis LHPO al 0,5% produjo el control completo de la pudrición y con LHPO al 0,25% todavía se desarrollaba algo de pudrición. La solución de control, que comprendía Tween 20 al 2% y EtOH al 25% mostró una actividad antifúngica muy baja (pudrición del 90%) mostrando de nuevo que el compuesto activo es el hidroperóxido de limoneno.

Se prefiere la Ruta 2, en vista del hecho de que el Rosa de Bengala, que se utilizó como catalizador en la Ruta 2, tenía efectos no deseables: reduce la actividad antifúngica y aumenta la fitotoxicidad, y al final de la reacción de debe eliminar del compuesto activo.

Ejemplo 11

Los limones inoculados con *Penicillium* (10^4 esporas/ml) se sumergieron en una solución acuosa que comprendía citral, un detergente (Tween 20), otros componentes oleosos esenciales así como un extracto bruto en diclorometano de flavedo de limón expuesto a luz solar. Se evaluó la pudrición a intervalos específicos durante un período de 20 días. Los resultados de la protección microbiana lograda con estos diferentes aceites esenciales se muestra en la Fig. 8.

ES 2 278 052 T3

La combinación de citral bruto tratado al sol y 1-octanol a concentraciones del 0,5% y el 0,25% mostraron respectivamente la inhibición del desarrollo de pudrición durante más de 20 días (Fig. 8). Estos tratamientos produjeron una pudrición de menos del 5% mientras que se encontró que la del control era mayor del 95%. Adicionalmente, se producía una pudrición del menos del 10% de los frutos tras el tratamiento con una combinación de citral al 0,25% y 1-octanol al 0,25%, o de citral al 0,25% y de extracto bruto al 0,25% tratado al sol o citral al 0,125%, extracto bruto al 0,25% tratado al sol y 1-octanol al 0,125%.

Ejemplo 12

El limoneno puro se expuso a luz solar durante tres horas. Se preparó una composición microbicida disolviendo el limoneno tratado en una solución acuosa que contenía etanol al 25% y un detergente (Tween 20). Los limones inoculados con 10^4 esporas/ml de *Penicillium* se sumergieron durante 1 minuto una o hasta cuatro veces al día después de la inoculación en la composición que comprendía la solución de limoneno expuesta a luz solar y se almacenó a 20°C. El efecto del limoneno tratado al sol sobre el desarrollo del patógeno sobre el fruto se verificó diariamente durante el almacenamiento. La Fig. 9 muestra el efecto del número de inmersiones y la longitud de cada inmersión sobre la reducción de la pudrición. Los datos sugieren que los resultados resultan enormemente afectados por la cantidad de sustancia absorbida por el patógeno o los tejidos del fruto. Esta figura muestra que el limoneno tratado con luz solar produce un mejor control de la pudrición después de más inmersiones o de inmersiones más prolongadas en comparación con una inmersión.

Ejemplo 13

El limoneno puro se irradió con luz UV (254 nm) durante tres horas. Se preparó una composición microbicida disolviendo el limoneno tratado en una solución acuosa que contenía etanol al 25% y un detergente (Tween 20). Los limones inoculados con 10^4 esporas/ml de *Penicillium* se sumergieron una o tres veces en la solución un día después de la inoculación durante un minuto en la solución irradiada y se almacenaron a 20°C. En el caso de la inmersión múltiple, los frutos se dejaron secar durante una hora entre dos inmersiones consecutivas.

El efecto de los limones tratados con radiación ultravioleta sobre el desarrollo del patógeno sobre el fruto se verificó durante un mes. La Fig. 10 muestra una inhibición de la pudrición similar con una solución de alcohol al 25% y el tratamiento de una inmersión en 2.500 ppm de limoneno tratado con UV (definido como 3UVL). Tres inmersiones consecutivas en el limoneno tratado con UV, (definido como 3UVL3) tenían el mejor control de la pudrición de todos estos tratamientos. La solución de control es una solución acuosa que contiene Tween 20.

Ejemplo 14

Se hicieron crecer células de *Staphylococcus aureus* de tipo salvaje (5×10^8 , $DO_{600} = 0,219$) durante 3 horas en caldo de cultivo (cy/gp) a 37°C con 50-100 μ l de diferentes concentraciones de extractos. La DO se determinó a 600 nm. La muestra 1 comprende 2.000 ppm de citral, etanol al 25% y 2.000 ppm de Tween 20. La muestra 2 comprende las mismas sustancias que la muestra 1 junto con 500 ppm de β -CD y 300 ppm de BHA de. Ambas muestras 1 y 2 inhibieron significativamente el crecimiento celular de *Staphylococcus aureus*. Las mismas composiciones de sustancias sin citral (Muestras 3,4) no inhibieron el crecimiento del patógeno (Figura 14).

Ejemplo 15

Células de *Candida albicans* de tipo salvaje (1×10^3) se hicieron crecer en caldo de cultivo a 37°C con 50-100 μ l de diferentes concentraciones de extractos. La DO se determinó a 600 nm.

Se dieron los siguientes tratamientos en 6 tubos diferentes:

- 50 Tubo 1. 2000 ppm de Citral + Etanol al 25% + 2000 ppm de Tween-20.
- Tubo 2. 2000 ppm de Citral + Etanol al 25% + 2000 ppm de Tween-20 + 300 ppm de BHA.
- 55 Tubo 3. 2000 ppm de Limoneno tratado al sol + 2000 ppm de Tween-20.
- Tubo 4. 2000 ppm de Limoneno tratado al sol + etanol al 25% + 2000 ppm de Tween-20.
- Tubo 5. etanol al 25% + 2000 ppm de Tween-20.
- 60 Tubo 6. etanol al 25% + 2000 ppm de Tween-20 + 500 ppm de β -CD + 300 ppm de BHA.

Dos mil ppm de citral con etanol al 25% y 2.000 ppm de Tween 20, o las mismas sustancias junto con 500 ppm de β -CD, 300 ppm de BHA, o limoneno tratado al sol disuelto en etanol al 25% o 2.000 ppm de Tween 20 inhibieron completamente el crecimiento celular de este organismo. Las mismas composiciones de sustancias sin citral o limoneno tratado al sol (Tubos 5 y 6) no inhibieron el crecimiento del patógeno (Fig. 15).

REIVINDICACIONES

1. Una formulación acuosa microbicida que comprende:

5 (i) una cantidad efectiva de al menos un componente oleoso esencial, los derivados del mismo, siendo obtenidos dichos derivados mediante exposición a luz o mediante oxidación, o sus mezclas; y

(ii) al menos un estabilizador adicional seleccionado del grupo formado por

10 (a) un emulsionante seleccionado del grupo formado por alquilaril polieter alcohol, monolaurato de polietilensorbitán, monooleato de polioxietilensorbitán, octil-fenil polieter alcohol, o mezclas de los mismos,

15 (b) un antioxidante seleccionado del grupo formado por hidroxianisol butilado (BHA), ácido ascórbico, hidroxitolueno butilado (BHT), ácido isoascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, o mezclas de los mismos, y

(c) un agente encapsulante seleccionado del grupo formado por almidón de maíz, maltodextrina, gel de sílice, β -ciclodextrina, caseína, quitosana, o mezclas de los mismos.

20 2. Una formulación acuosa microbicida según la reivindicación 1, donde dicho componente oleoso esencial, o derivado del mismo, se selecciona del grupo que consiste en hidrocarburos monoterpénicos o sesquiterpénicos, derivados terpénicos oxigenados, derivados no terpénicos tales como aldehídos, alcoholes, ácidos y compuestos fenólicos.

25 3. Una formulación acuosa microbicida según la reivindicación 2, dicho componente oleoso esencial, o derivado del mismo, se selecciona del grupo que consiste en citral, 1-octanol, heptanol, nonanol, geraniol, octanal, nonanal, decanal, perillaldehído, perillalcohol, citronellol, citronellal, carvone, carveol, linalool, vainillina, aldehído cinámico, ácido cinámico, eugenol, mentol, limoneno, hidroperóxido de limoneno, carvacrol, terpineol, timol, vainillina y alcanfor o una mezcla de los mismos.

30 4. Una formulación acuosa microbicida según la reivindicación 3, donde dicho componente oleoso esencial, o derivado del mismo, se selecciona entre citral, geraniol, limoneno, e hidroperóxido de limoneno.

5. Una formulación acuosa microbicida según la reivindicación 4, donde la concentración del componente oleoso esencial, o derivado del mismo, es del 0,1% al 1%.

35 6. Una formulación acuosa microbicida según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende adicionalmente un biocida adicional en una concentración de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm.

40 7. Una formulación acuosa microbicida según la reivindicación 6, donde dicho biocida se elige del grupo que consiste en imazalil, tiabendazol, panoctine, rovril, procloraz, ortofenilfenato de sodio, metalaxilo, fosetil-A1, captan, oxiquinolina, dicloran, cloruro de benzalconio, canon, tiofanato-metilo, triforina, carbendazima, triademinol, vinclozolina, etaconazol, o mezclas de los mismos.

45 8. Una formulación acuosa microbicida según la reivindicación 7, donde el componente oleoso esencial es el citral, el estabilizador es un antioxidante y el biocida adicional es el imazalil.

9. Un método para inhibir el desarrollo microbiano que comprende la aplicación de una cantidad efectiva de una formulación acuosa como se ha reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

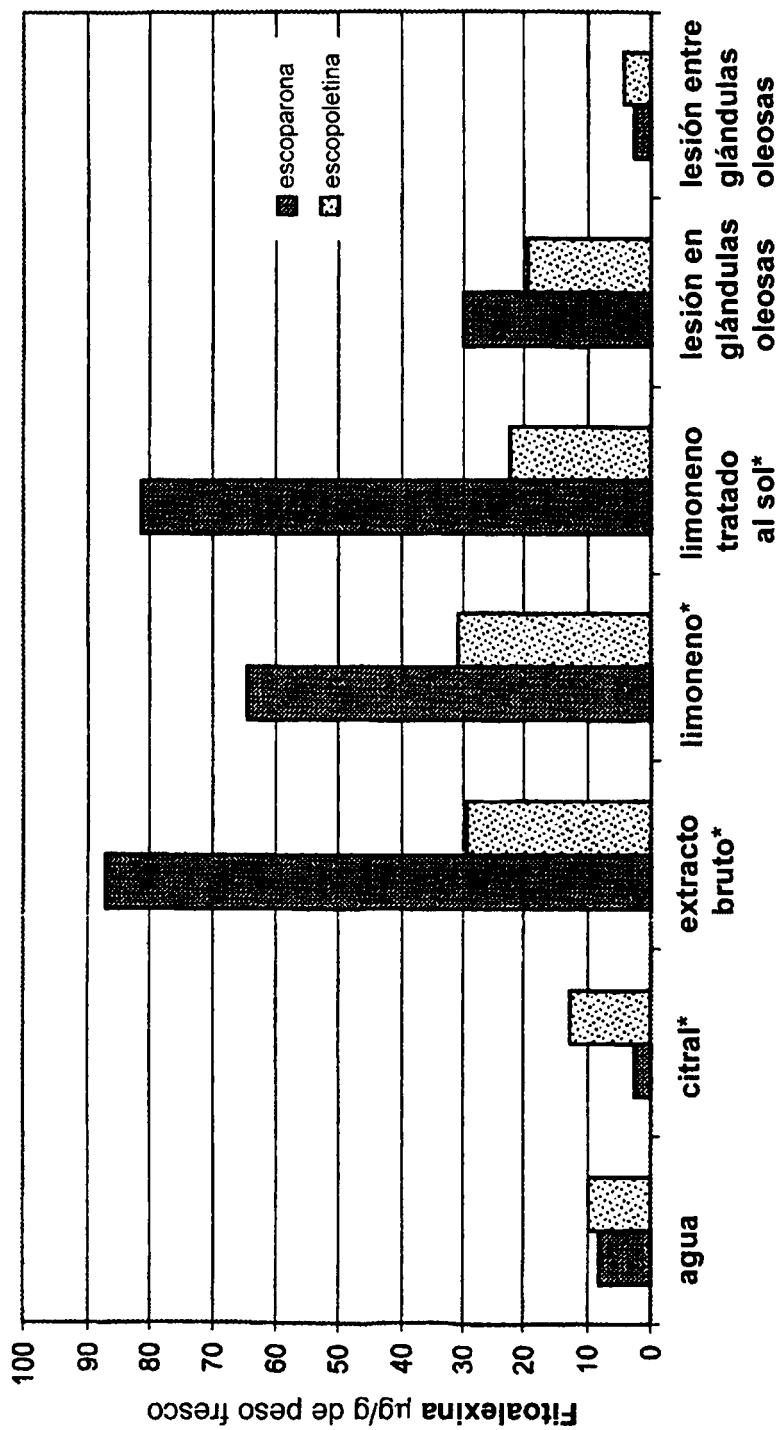
50 10. Un método según la reivindicación 9 para proteger frutos y vegetales de la pudrición posterior a la recolección.

55

60

65

EFFECTO DE DIFERENTES TRATAMIENTOS SOBRE EL CONTENIDO DE FITOALEXINA DE FLAVEDO DE LIMON



*Cinco µl de este producto químico se inyectaron en el albedo inmediatamente debajo del tejido de flavedo

FIG. 1

INDUCCION DE LA PRODUCCION DE ESCOPARONA POR EL CONTENIDO
LIBERADO DE LAS GLANDULAS EN LIMONES VERDES MADUROS Y AMARILLOS

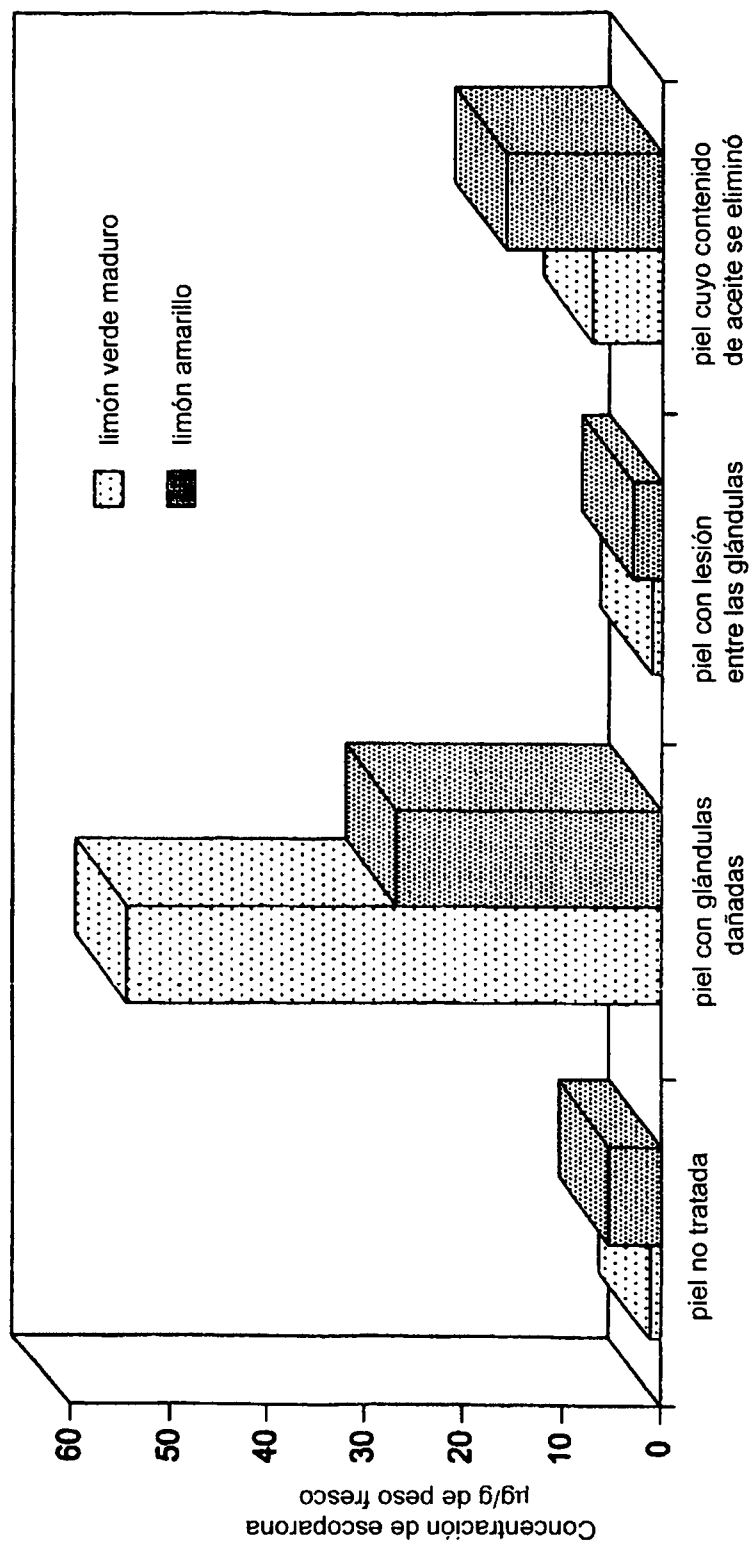


FIG. 2

EFFECTO DEL CITRAL Y EL GERANIOL SOBRE LA PUDRICION DE POMELO INOCULADO CON *P. digitatum*

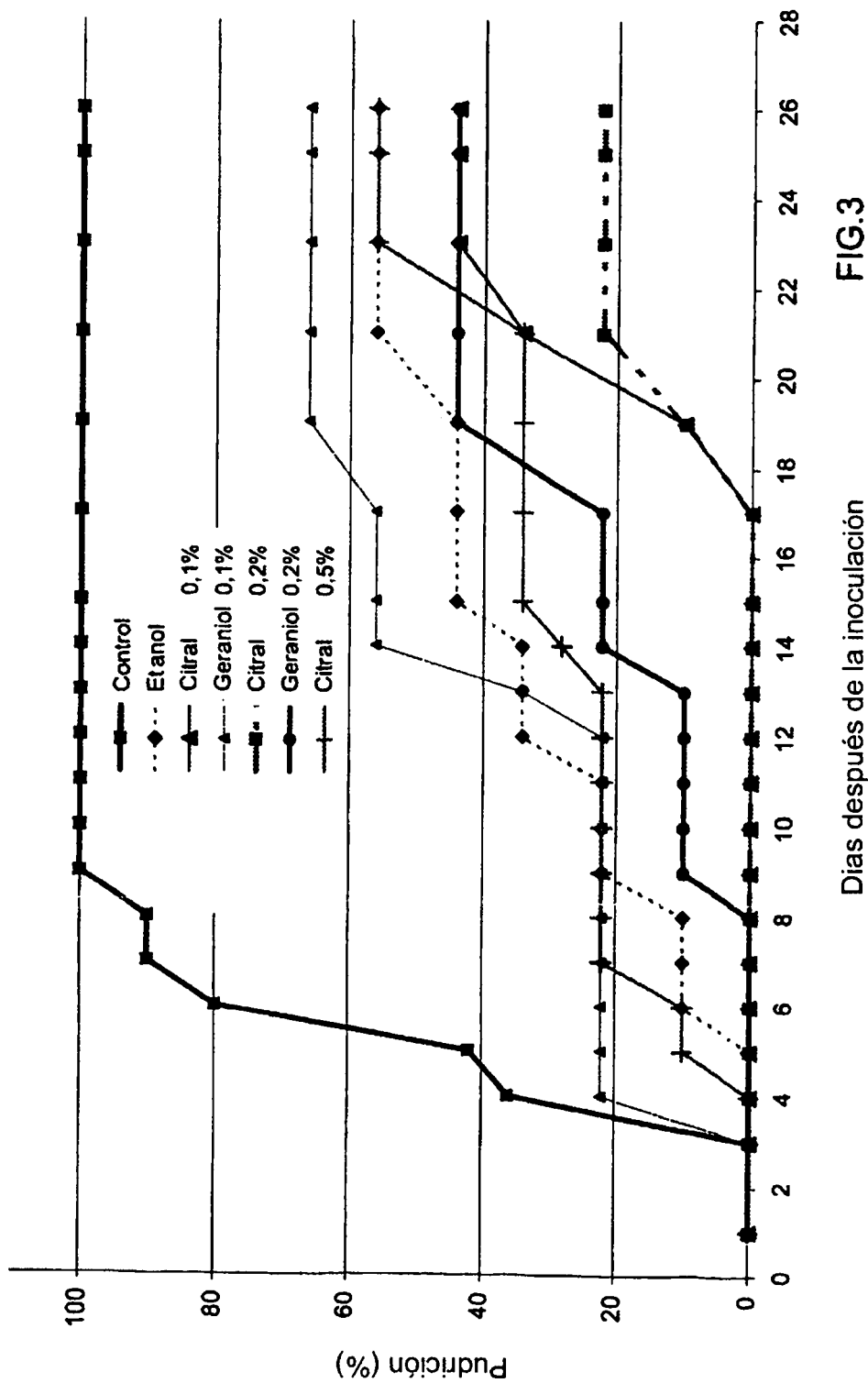
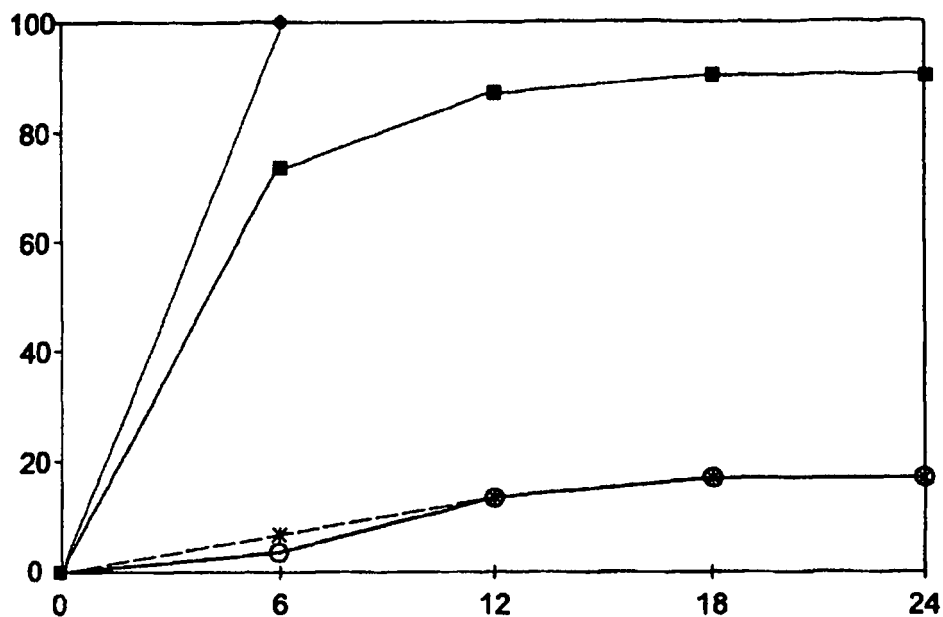


FIG.3

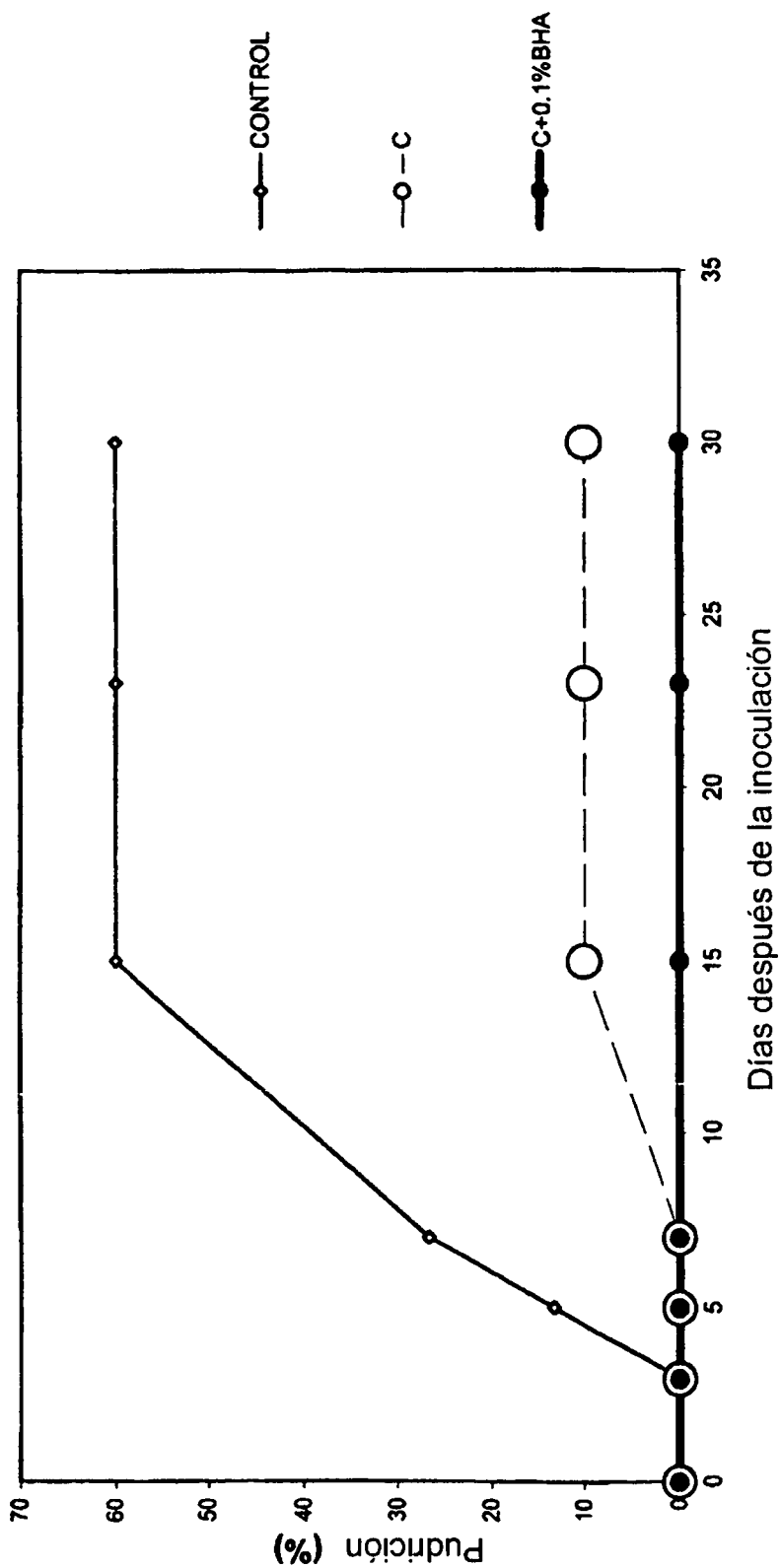
AUMENTO DEL EFECTO BIOCIDA DEL CITRAL POR UNA INMERSION EN ETANOL AL 25% O POR UNA FORMULACIÓN EN EMULSION



- ◆— inmersion en agua
- Etanol al 25%
- Ci 5000 ppm + amif 72 3000 ppm + β-CD 3000 ppm + Tween 20 5000 ppm
- *— Ci 5000 ppm + 25% Etanol + amif 72 3000 ppm + β-CD 3000 ppm + Tween 20 5000 ppm

FIG. 4

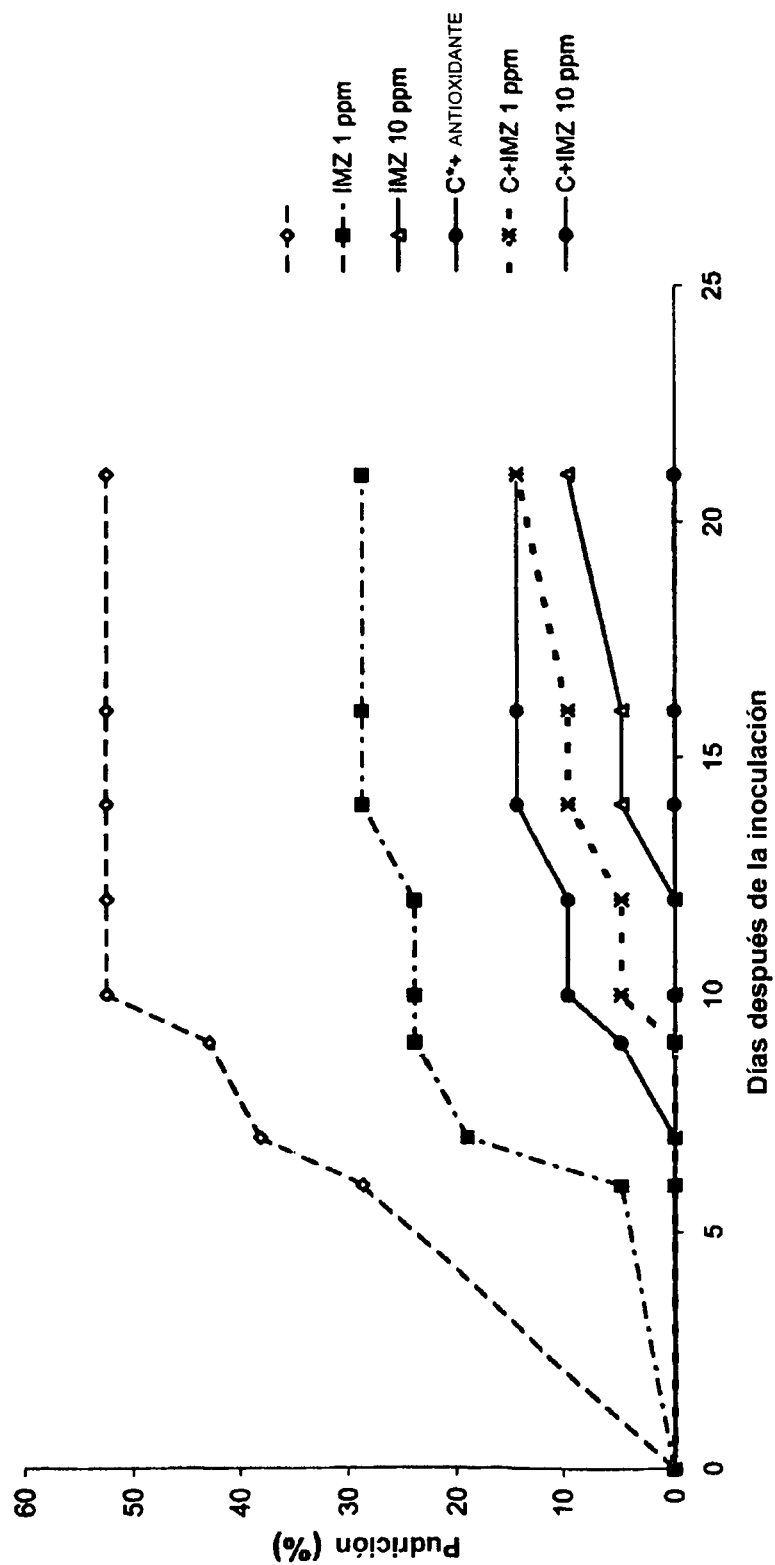
EFFECTO DEL CITRAL Y DEL ANTIOXIDANTE BHA SOBRE LA PUDRICION DE LIMONES INOCULADOS CON PENICILLIUM



C=Citral 1% +TRITON X100 2%.

FIG. 5

EFFECTO DE LA ADICION DE IMAZALIL (IMZ) SOBRE LA REDUCCION DE LA PUDRICION EN LIMONES INOCULADOS MEDIANTE EL TRATAMIENTO CON CITRAL Y ANTIOXIDANTE A 20°C



*C=Citral, 0.5% + BHA, 0.3% + Tween 20, 0.5%

FIG. 6

EFEECTO DE UNA INMERSION DE EXTRACTO BRUTO EN DICLOROMETANO (CRU) DE FLAVEDO DE LIMON VERDE SOBRE EL PORCENTAJE DE PUDRUCION EN LIMON INOCULADO CON *Penicillium digitatum*

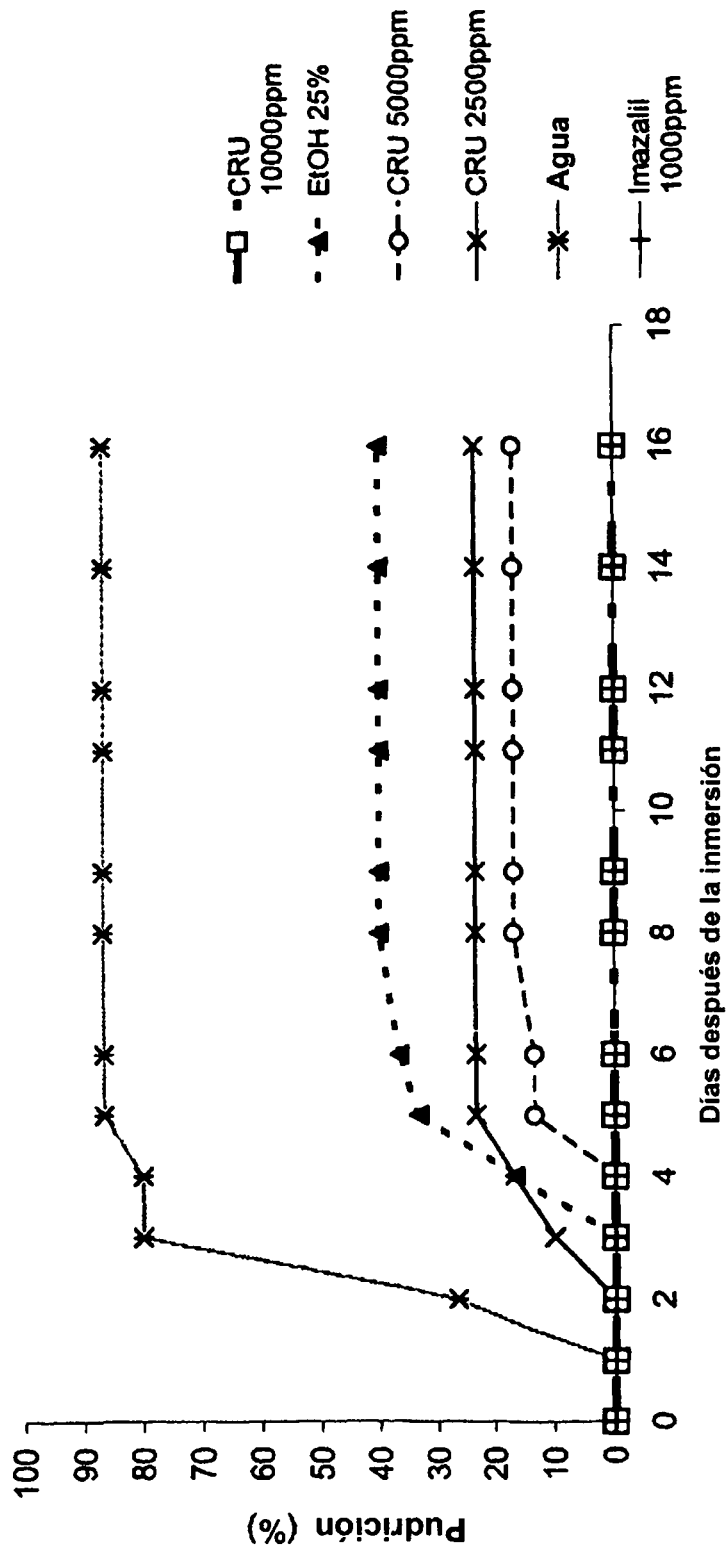


FIG. 7

EFFECTO DE UNA INMERSION EN CITRAL, 1-OCTANOL Y EXTRACTO BRUTO (CRU) TRATADO AL SOL Y/O SUS COMBINACIONES EN SOLUCION ACUOSA SOBRE LA PUDRICION DE LIMON VERDE MADURO INOCULADO

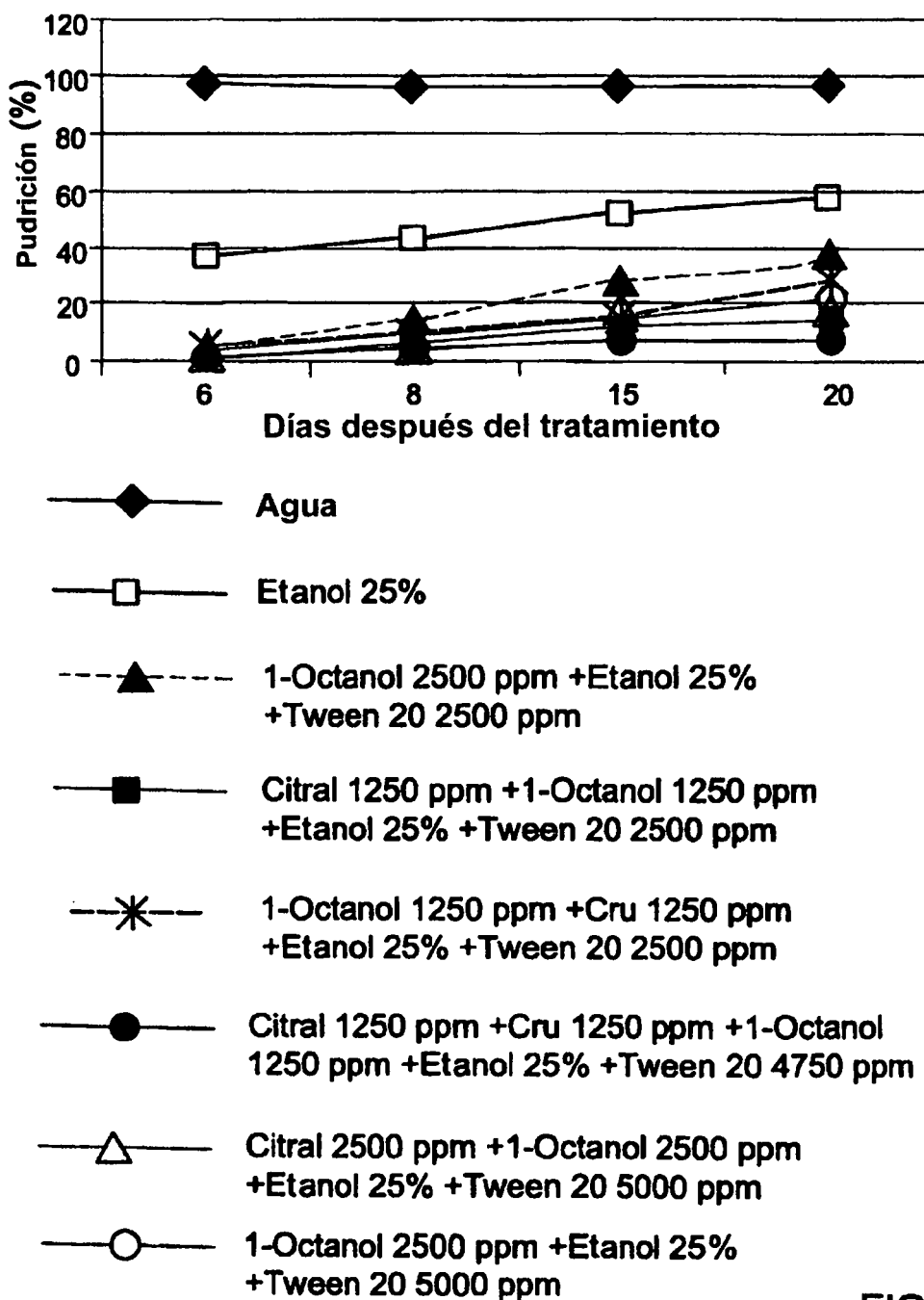


FIG. 8

EFFECTO DEL LIMONENO TRATADO AL SOL (3SL) SOBRE LA PUDRICION DE LOS LIMONES INOCULADOS CON *Penicillium digitatum*

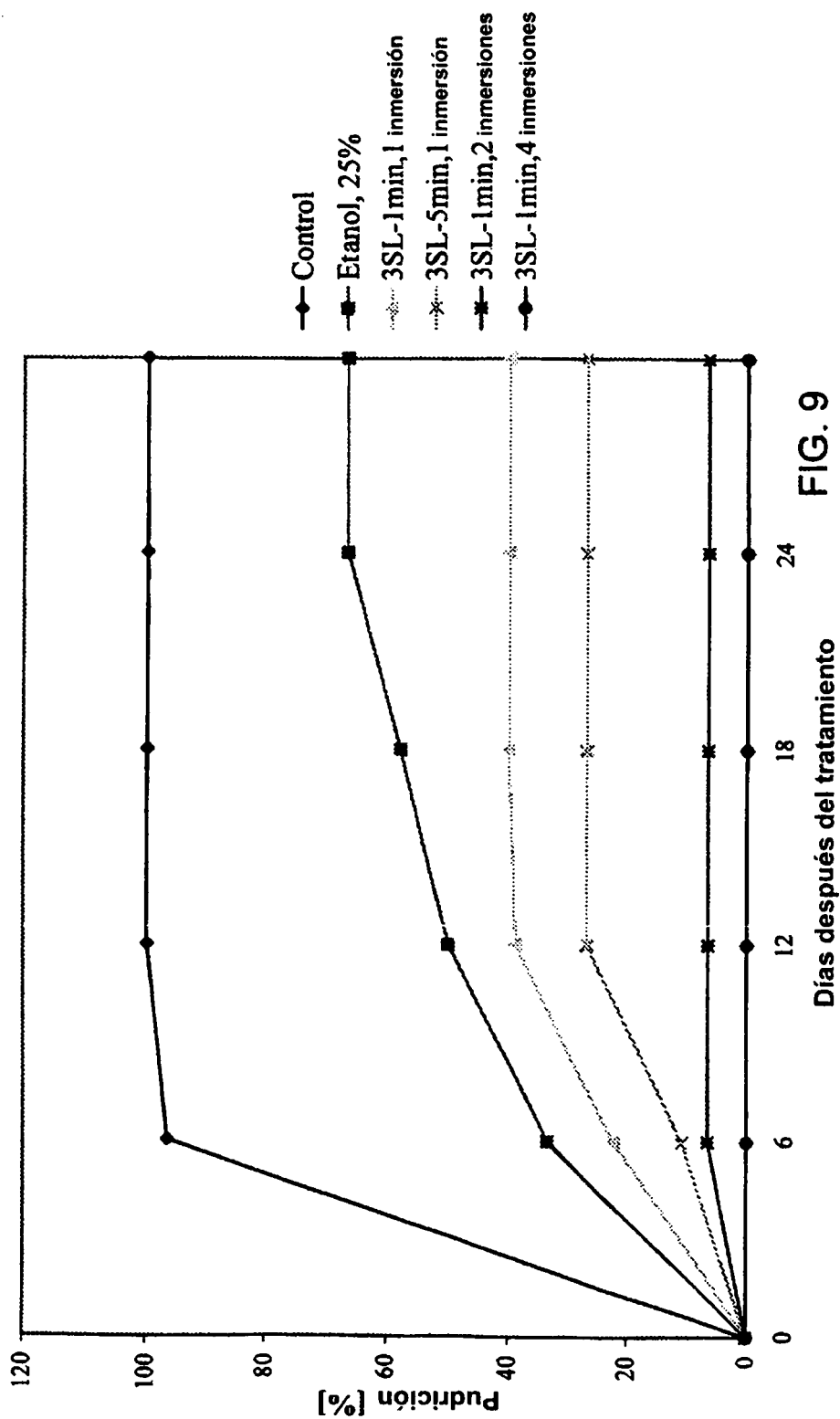


FIG. 9

**EFFECTO DEL LIMONENO TRATADO AL SOL (3SL) SOBRE LA
PUDRICION DE LIMONES INOCULADOS CON *Penicillium digitatum***

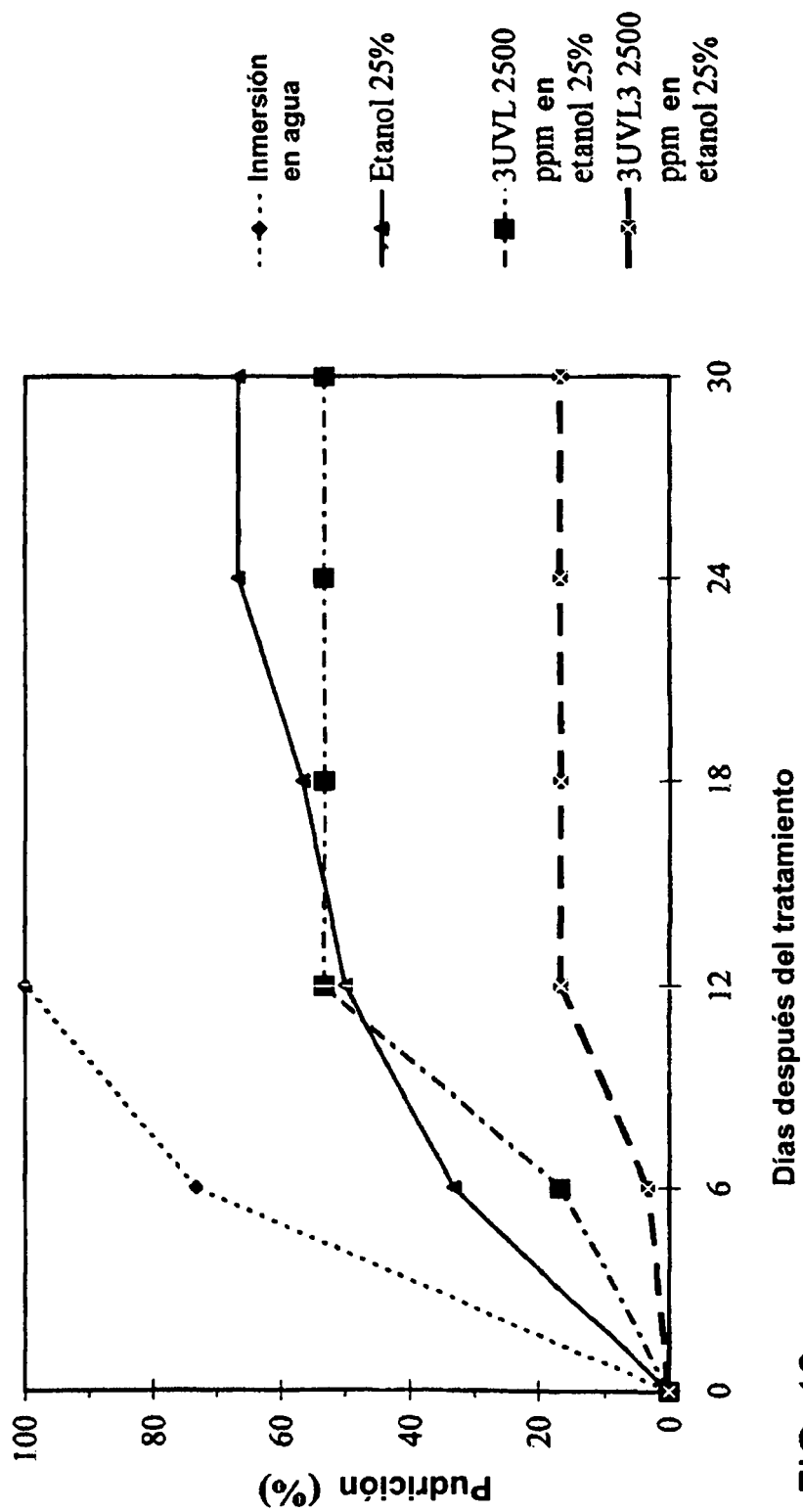


FIG. 10

**EFFECTO DEL HIDROPEROXIDO DE LIMONENO PREPARADO
MEDIANTE FOTOOXIDACION CON ROSA DE BENGALA SOBRE
EL PORCENTAJE DE PUDRICION DE LIMONES INOCULADOS
CON *Penicillium digitatum***

L= Hidroperóxido de limoneno; T= Tween 20; E= Etanol al 25%;
-RB= sin Rosa de Bengala

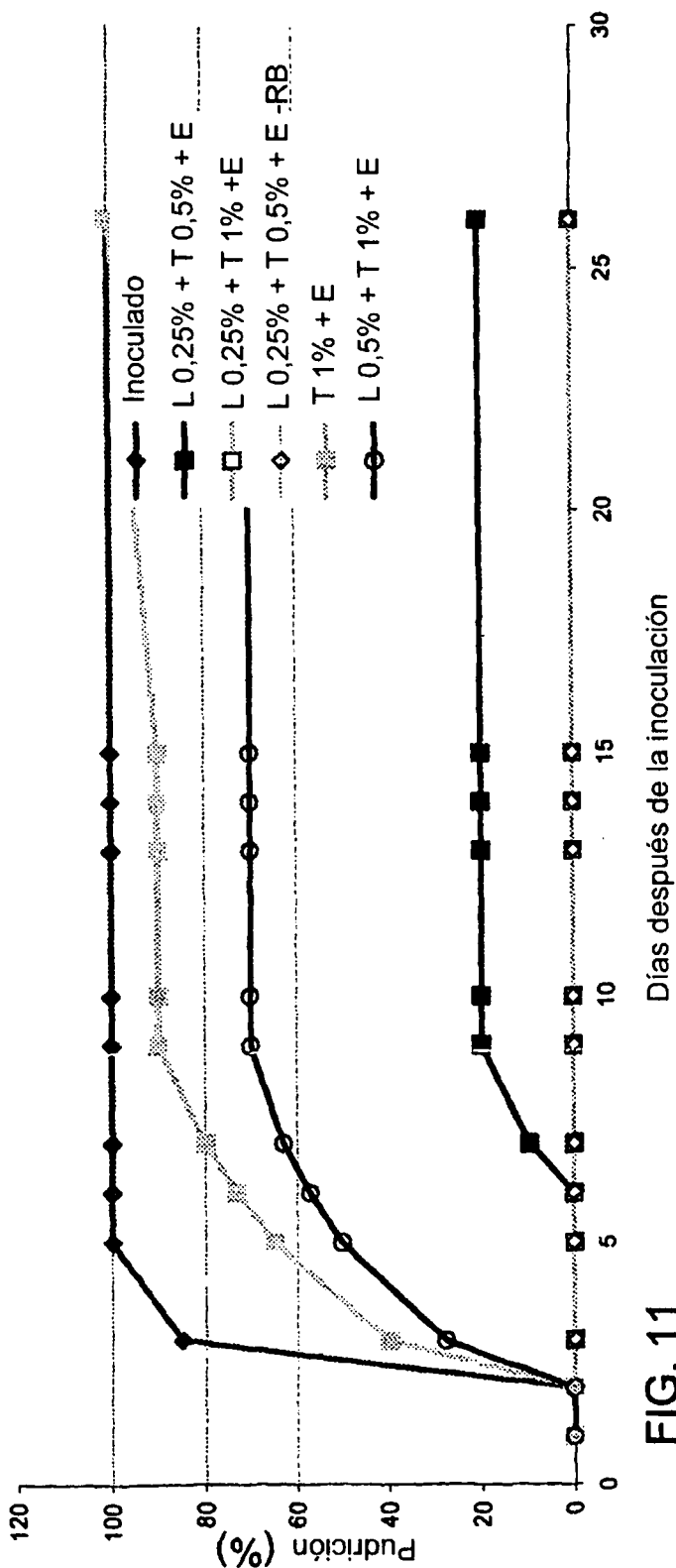


FIG. 11

**EFFECTO DEL HIDROPEROXIDO DE LIMONENO (LHPO) PREPARADO
CON UN CATALIZADOR DE MOLIBDATO SOBRE LA PUDRICION
DE LIMONES INOCULADOS CON *Penicillium digitatum*.**

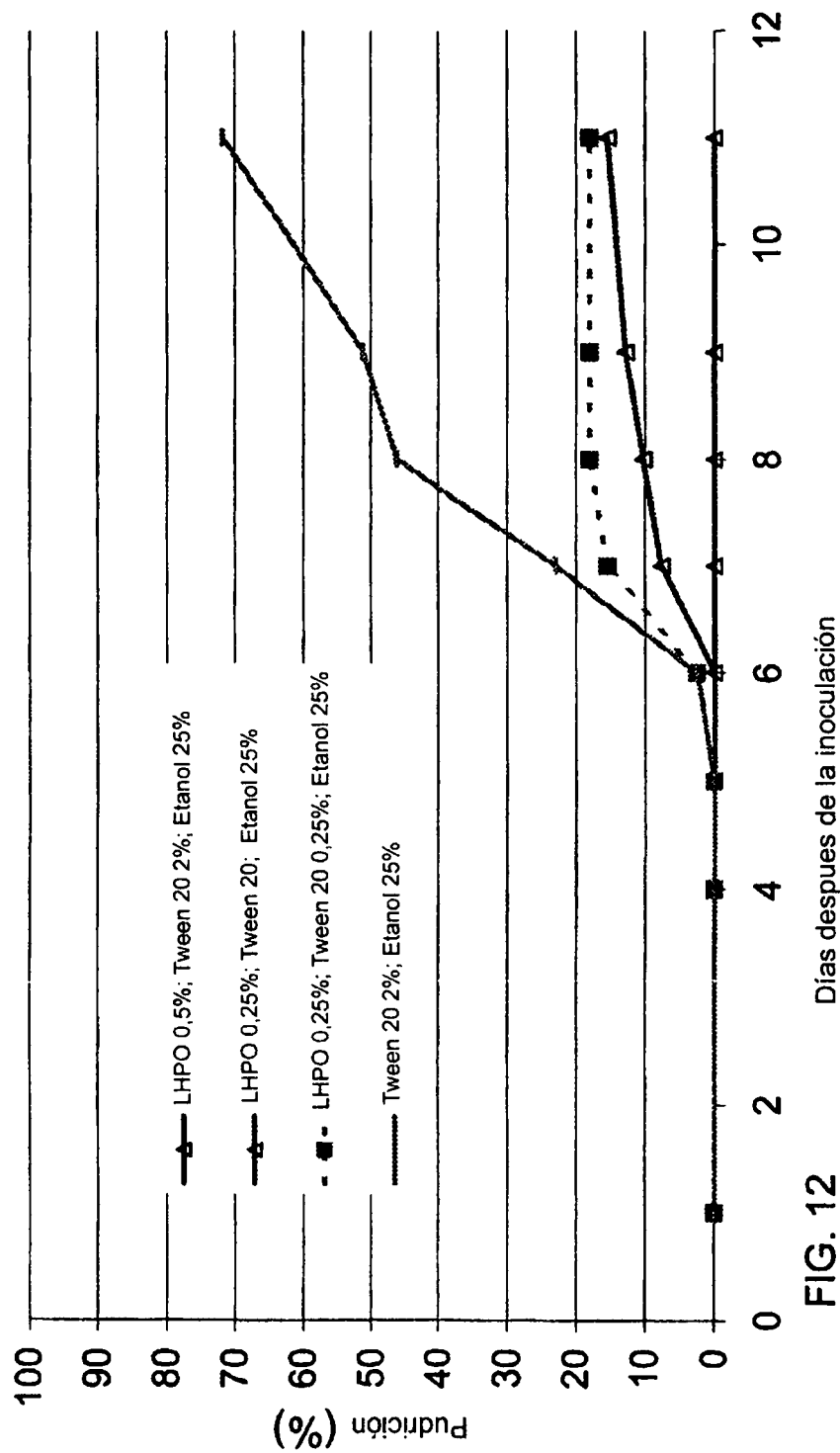


FIG. 12 Días después de la inoculación

**EFFECTO DEL ROSA DE BENGALA Y LA DOSIFICACION DE Tween 20
SOBRE LA FITOTOXICIDAD DE LOS LIMONES**

L = Hidroperóxido de limoneno; T= Tween 20;
E = Etanol al 25%; -RB = sin Rosa de Bengala

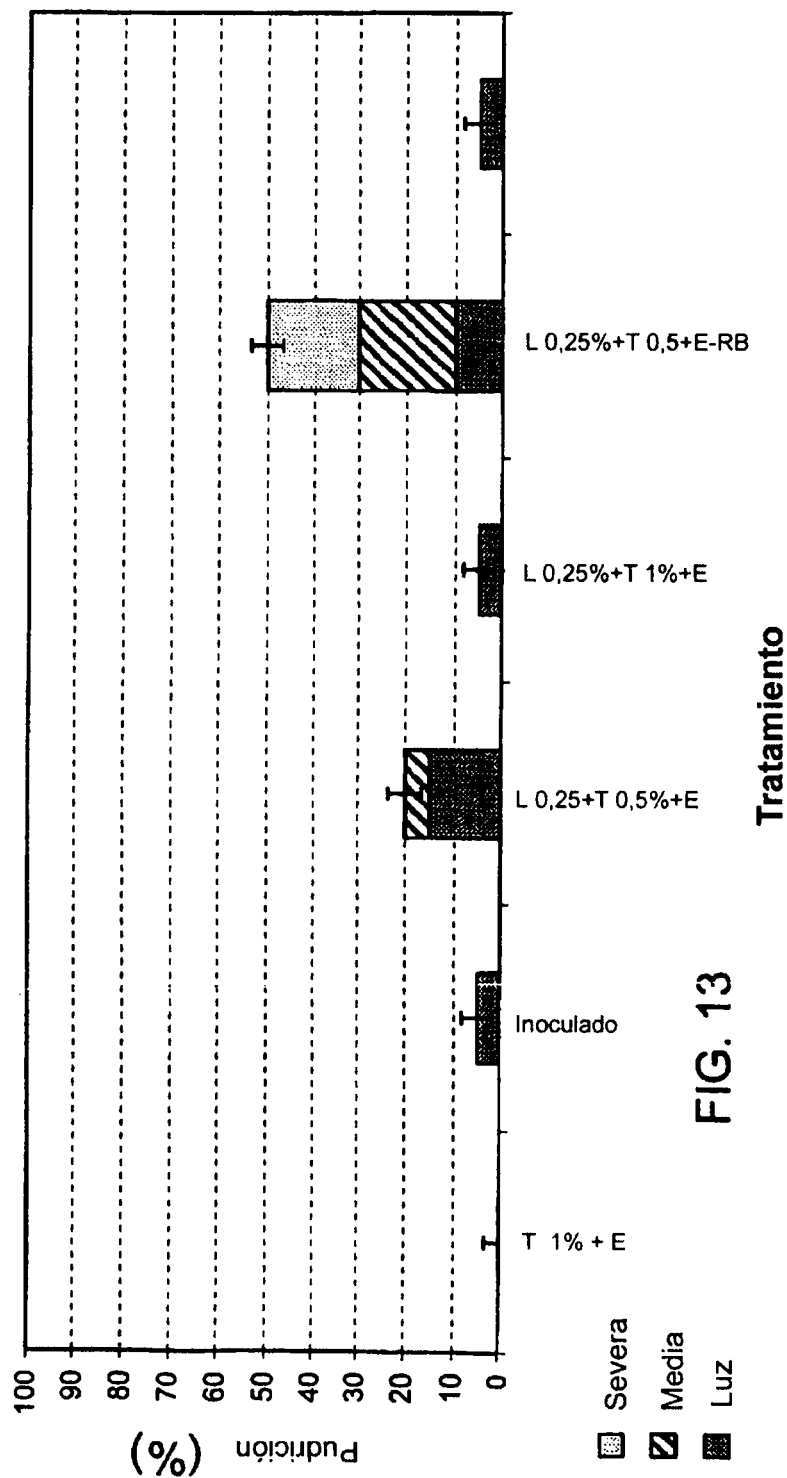
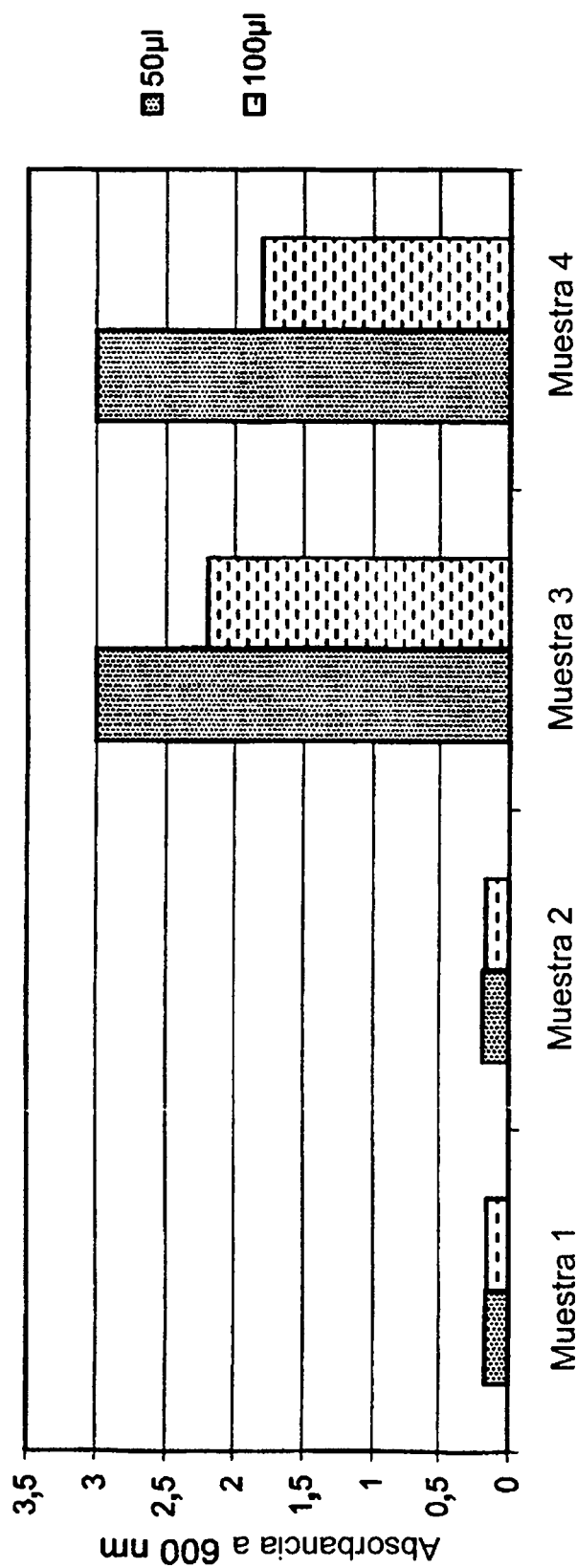


FIG. 13

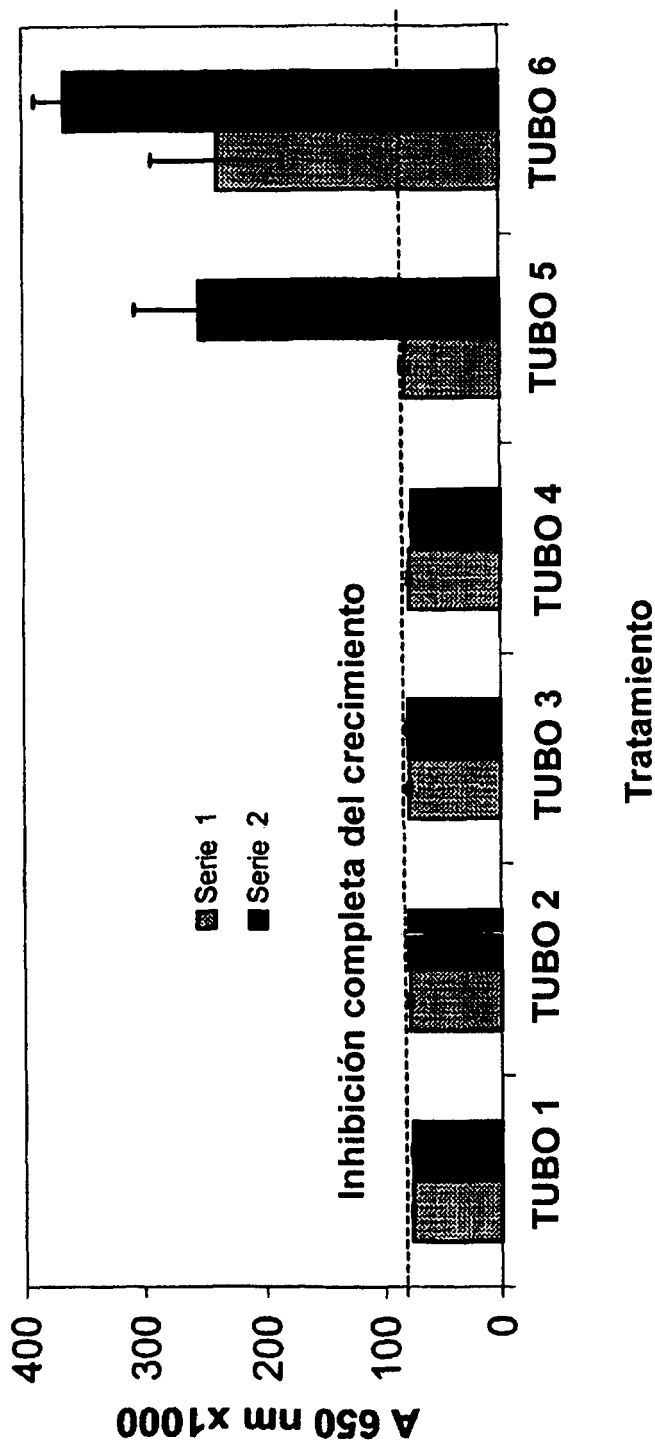
**EFFECTO DE LA FORMULACION DE CITRAL SOBRE EL
CRECIMIENTO DE CELULAS DE *Staphylococcus aureus***



Tratamiento

FIG. 14

**EFFECTO DEL CITRAL Y DEL LIMONENO TRATADO AL SOL
SOBRE EL CRECIMIENTO DE CELULAS DE *Candida albicans***



Candida se desarrolló durante 48 horas a 37°C. Y después se determinó su densidad a una DO de 650 nm Serie 1 (diluida x 1:5). Serie 2 diluida x 1:10.

FIG. 15