



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 165 296**

② Número de solicitud: 200000124

⑤ Int. Cl.⁷: A01N 65/00
A23B 7/16

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **21.01.2000**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2002**

Fecha de concesión: **22.04.2003**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.05.2003**

⑯ Fecha de publicación del folleto de patente:
16.05.2003

⑰ Titular/es: **UNIVERSIDAD DE MURCIA**
Avda. Teniente Flomesta, 5
Edf. Convalecencia - 3ª pta.
30003 Murcia, ES

⑱ Inventor/es: **Río Conesa, José Antonio del;**
Ortuño Tomás, Ana María;
Arcas Miñarro, María Cruz y
Botia Aranda, Juana María

⑳ Agente: **Ungría López, Javier**

㉔ Título: **Procedimiento de obtención de un extracto antifúngico a partir del aceite esencial de limón.**

㉖ Resumen:

Procedimiento de obtención de un extracto antifúngico a partir del aceite esencial de limón.

Comprende un primer procesado del aceite esencial de limón con hexano para eliminar los terpenos y carotenoides y un segundo procesado con benceno para extraer las flavonas polimetoxiladas antifúngicas, llevándose a cabo ambos procesados en presencia de agua.

Aplicación en el sector agrícola de cítricos.

ES 2 165 296 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Procedimiento de obtención de un extracto antifúngico a partir del aceite esencial de limón.

Campo técnico de la invención

En las condiciones climáticas y de cultivo mediterráneas, los cítricos son muy susceptibles de ser atacados por hongos del género *Penicillium* y *Phytophthora*. Actualmente, la lucha directa contra las enfermedades mediante la aplicación de fungicidas sintéticos es tan solo preventiva, ya que si la infección ya se ha producido, el fungicida no impedirá que se desarrolle el hongo en el interior de los tejidos de los frutos.

En este sentido la presente invención proporciona un método para la obtención de un antifúngico efectivo y de origen natural contra *Penicillium digitatum*, a partir del aceite esencial de limón.

Estado de la técnica anterior a la invención

Actualmente, las enfermedades postcosecha que afectan a los cítricos durante el proceso de comercialización, en las que el agente productor es un hongo, ocupan un lugar prioritario entre las preocupaciones del sector agrio-alimentario en general, ya que desde el punto de vista económico, estas enfermedades producen pérdidas superiores al 12% de la producción cítrica total [(1) Tuset, J.J. (1987) Principales enfermedades de los agríos en el campo causadas por hongos. Levante Agrícola 273:67-72]

Las enfermedades causadas por el género *Penicillium* son las más comunes y a menudo las más destructivas de todas las enfermedades de postcosecha, dado que las características del clima mediterráneo, zonas de atmósfera cálida y húmeda, son las más óptimas condiciones de crecimiento para este hongo. Los *Penicillium* producen una podredumbre blanda en los frutos, desarrollando en la parte externa de la lesión una mohosidad cuyo color varía según la especie: verde si se trata de *Penicillium digitatum* y azul si se trata de *Penicillium italicum*.

Si bien las enfermedades causadas por ellos pueden ser disminuidas por las condiciones del almacenamiento y transporte de los frutos, éstas no son suficientes para proteger toda la cosecha; de aquí que se utilice la lucha química como lucha directa, mediante la aplicación de fungicidas sintéticos tales como: Difenil fenilfenato sódico, Diclorán, Thiabendazol, 2-Aminobutano, Benomyl o Imazalil. La penetración de los mismos en la corteza de los frutos cítricos es relativamente pequeña, por lo tanto, una vez iniciada la infección estos compuestos no inhiben el crecimiento del hongo, además, en muchos casos se detectan residuos en pulpa y/o corteza de frutos [(2) Cohen, E.; Shalom, Y.; Axelrod, Y.; Adato, Y.; and Rosenberger, Y. (1987) Pestic. Sci 20:83-91]. De aquí, que se aconseje el uso de fungicidas sintéticos sólo como medida de carácter preventivo y a dosis relativamente bajas.

Otro método de control del hongo como medios indirectos son los mecanismos de resistencia desarrollados por los cítricos. Se han postulado dos mecanismos de resistencia a las infecciones:

1º) Compuestos tóxicos ya existentes que inhiben al patógeno y que están presentes en la

corteza de los frutos de cítricos, entre ellos los derivados fenólicos y taninos, que constituyen la primera línea de defensa [(3) Darvill, A.G. and Albersheim P. (1984) Phytoalexins and their elicitors a defense against microbial infection in plants. Annu. Rev. Plant Physiol 35:243-275; (4) Ben-Yehoshua, S.; Shapiro, B.; Kim, J.J.; Sharoni, J.; Carmeli, S. and Kashman, Y. (1988) Resistance of citrus fruit to pathogens and its enhancement by curing. In Proc. 6th Intl. Citrus Cong. pp:1371-1379; (5) Kuc, J. (1991) Plant immunization. A non pesticide control of plant disease. Petria. 1:79-83]; y

2º) La producción de fitoalexinas (cumarinas) inducidas tras la infección del hongo y consideradas como otra línea de defensa [(6) Swinburne, T.R. (1983) Wuiesscent infections in post-harvest diseases. In "Post-harvest pathology of fruits and vegetables" (Denni C. Edit) Academic Press, New York, pp: 1-21; y (7) Afek, U and Sztejnberg, A (1988) The involvement of scoparone (6,7-dimethoxycoumarin) in resistance of citrus rootstocks against *Phytophthora citrophthora* Proceeding of the sixth International Citrus Congress. Goren, R. and Mendel, R. (Eds) Israel. pp: 779-785]. En este sentido, se ha comprobado que cuando se inoculan frutos de limón con *Penicillium digitatum* se observa un incremento de la actividad antifúngica que está directamente relacionado con la inducción de la fitoalexina escoparona [(8) Kim, J.J.; Ben-Yehoshua, S.; Shapiro B.; Henis, Y. and Carmeli, S. (1991) Accumulation of scoparone in heat-treated lemon fruit inoculated with *Penicillium digitatum*. Plant Physiol. 97:880-885]; cuando estos mismos frutos son tratados con luz UV llegan a inhibir el crecimiento del hongo en un 75% [(9) Ben-Yehoshua, S.; Kim, J. J.; Rodov, V.; Shapiro, B. and Carmeli, S. (1992a) Reducing decay of Citrus fruits by induction of endogenous resistance against pathogens. Proc. Int. Soc Citriculture, 3:1053-1056].

La presencia de sustancias antifúngicas en la corteza de cítricos fue demostrado por primera vez por Ben-Aziz [(10) Ben-Aziz, A (1967) Nobiletin is main fungistat in tangerines resistant to mal secco. Science 155:1026-1027]. Ben-Yehoshua [(11) Ben-Yehoshua, S.; Rodov, V.; Kim, J.J. and Carmeli, S. (1992b) Preferred 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] aisló de tejido de flavedo de limón diversos compuestos: citral, limequina, 5-geranoxi-7-metoxycumarina e isopimpinellina, los cuales actúan en la primera línea de defensa contra patógenos. En este sentido, el solicitante ha identificado diversas flavonas: sinen-setina, nobiletina, heptametoxyflavona, quercetogentina y tangeretina, que se encuentran presentes en diversas especies de cítricos, pero localizadas únicamente en la corteza y asociadas a las vesículas de aceite de flavedo. Estos compuestos se encuentran enriquecidos en los aceites esenciales obtenidos de los diferentes cítricos y son probablemente éstos junto con los otros componentes, los que confieren cierto grado de resistencia en los cítricos, y así ha sido puesto de manifiesto por Del Río [(12) Del Río, J.A.; Arcas, M.C.; Benavente-

García, O. and Ortuño, A (1998) Citrus polymethoxylated flavones can confer resistance against *Phytophthora citrophthora*, *Penicillium digitatum*, and *Geotrichum* species. J. Agric. Food Chem. 46(10):4423-4428] donde el *Penicillium digitatum* es totalmente inhibido por el extracto de aceite esencial de clementina y naranja dulce.

Descripción detallada de la invención

La presente invención, tal y como se indica en su enunciado, se refiere a un procedimiento para la obtención de un extracto antifúngico a partir del aceite esencial de limón. Más específicamente, dado que el limón es el agrío más importante en la zona mediterránea desde el punto de vista económico, la presente invención se ha centrado en el desarrollo de un método para la obtención de un antifúngico frente a *Penicillium digitatum* a partir de aceite esencial de limón. Es sabido, a este respecto, que el aceite esencial de limón, que conlleva algunas de las flavonas mencionadas anteriormente, entre ellas la targeretina, produce una inhibición total del crecimiento de *Penicillium digitatum*.

Para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención se parte de aceite esencial de limón, al cual se añade alcohol isopropílico y agua y se agita la mezcla. Seguidamente se adiciona hexano y se continúa la agitación, La mezcla se deja decantar en un embudo de decantación, separándose la fase de hexano la cual se descarta. A la otra fase se añade nuevamente hexano repitiéndose el proceso y así una tercera vez. Este tratamiento con hexano se realiza con el fin de eliminar los terpenos y carotenoides contenidos inicialmente en el aceite esencial de limón de partida. Por ello, puede ser preciso repetir el tratamiento con hexano alguna vez más hasta la total eliminación de dichos productos.

La fase hidro-alcohólica procedente del tratamiento con hexano se concentra en un rotavapor para eliminar todo el disolvente orgánico, quedando como residuo un concentrado acuoso al cual se le adiciona agua y benceno. La mezcla se agita durante un cierto tiempo y después se separan las fases en un embudo de decantación. La fase bencénica se separa y se guarda, repitiéndose la extracción con benceno varias veces más para asegurar la extracción de todo el material antifúngico. Seguidamente se reúnen todos los extractos bencénicos, se secan y se concentran hasta casi sequedad, en un rotavapor.

El residuo así obtenido contiene flavonas polimetoxiladas que pueden utilizarse como un antifúngico natural.

El proceso se lleva a cabo en su totalidad a temperatura ambiente.

En la primera operación de extracción, el alcohol isopropílico se añade en una proporción de 0,100,30 ml de alcohol isopropílico por cada ml de aceite esencial de limón. El agua, por su parte, se adiciona en una proporción de 0,10-0,20 ml de agua por cada ml de aceite esencial de limón. En las posteriores re-extracciones con hexano, éste se añade en proporciones de 0,03-0,05 ml de hexano por ml de aceite esencial de limón.

El tiempo de agitación de la mezcla en la primera operación de extracción con hexano está

comprendido entre 0,5 y 1,5 h., mientras que en las siguientes extracciones con hexano, el tiempo empleado es del orden de 15-45 min.

Tras la concentración en rotavapor del residuo procedente de la extracción con hexano, la cantidad de agua que se añade al residuo es del orden de 0,10-0,20 ml y la cantidad de benceno es del orden de 0,20-0,40 por cada ml de aceite esencial de limón de partida.

Los períodos de extracción con benceno son del orden de 0,51,5 horas.

Para secar los extractos bencénicos se emplea un desecante convencional que sea inerte frente a la mezcla a desecar, por ejemplo, sulfato sódico anhidro.

Una vez seco el extracto bencénico, se concentra hasta una cantidad de 0,5-1,5 ml.

El extracto concentrado final así obtenido, correspondiente al extracto antifúngico de la presente invención tiene un contenido en flavonas polimetoxiladas del orden de 35-45 mg/ml de extracto.

De acuerdo con lo anterior, la obtención del extracto antifúngico de acuerdo con la presente invención proporciona importantes ventajas frente a los ya existentes. Así, al tratarse de un producto natural, no tiene efectos negativos sobre las cualidades organolépticas del fruto cítrico. Por otro lado, permite el aprovechamiento de un material normalmente de desecho, la corteza de los cítricos, que es precisamente la materia vegetal de partida del procedimiento de la presente invención. Finalmente, la gran eficacia comprobada por los inventores del extracto antifúngico de la invención, determina la importante repercusión de este producto para el sector agroalimentario.

Modos de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente Ejemplo, el cual no pretende ser limitativo de su alcance.

Ejemplo

Se toman 500 ml de aceite esencial de limón y se le adicionan 100 ml de alcohol isopropílico y 80 ml de agua. Se mantienen en agitación durante 1 hora. A continuación se le adicionan 20 ml de hexano y se mantiene en agitación durante media hora. Se deja decantar la mezcla en embudo de decantación y se separa la fase de hexano que se descarta. Se le adicionan de nuevo 20 ml de hexano y se repite el proceso. Para eliminar los terpenos y carotenoides es necesario realizar una tercera extracción con hexano.

A continuación la fase alcohólica se concentra en rotavapor para eliminar todo el disolvente orgánico y quedarse solamente con el agua. Una vez concentrado, se le adicionan 100 ml de agua destinada y 150 ml de benceno. Se mantiene en agitación durante una hora y se separan las fases en embudo de decantación. La fase de benceno se guarda y se repite la extracción con benceno tres veces más. Los 600 ml de benceno se deshidratan con sulfato sódico anhidro y se concentran hasta un mililitro en rotavapor.

Esta fracción contiene flavonas polimetoxiladas en una concentración de 40 mg/ml y pueden ser usadas como antifúngico natural.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de un extracto antifúngico a partir del aceite esencial de limón, cuyo procedimiento comprende un primer procesado del aceite esencial de limón con hexano para eliminar los terpenos y carotenoides y un segundo procesado con benceno para extraer las flavonas polimetoxiladas antifúngicas, llevándose a cabo ambos procesados en presencia de agua.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho primer procesado con hexano comprende una primera etapa de extracción en la que se añade a dicho aceite esencial de limón alcohol isopropílico y agua previamente a la adición de dicho hexano, se agita la mezcla, se decanta y se separan las fases, descartándose la fase de hexano y una o más etapas posteriores de reextracción de la fase hidro-alcohólica así obtenida con hexano para eliminar de la misma los terpenos y carotenoides.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque dicho alcohol isopropílico se añade en una proporción de 0,10 a 0,30 ml por cada ml de aceite esencial de limón de partida.

4. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque dicha agua se añade en una proporción de 0,10-0,20 ml de agua por cada ml de aceite esencial de limón de partida.

5. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque en dichas etapas posteriores de reextracción con hexano, éste se añade en proporciones de 0,03-0,05 ml de hexano por ml de aceite esencial de limón de partida.

6. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque el tiempo de agitación de la mezcla para la primera etapa de extracción con hexano está comprendido entre 0,5 y 1,5 h.

7. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque el tiempo de agitación de la mezcla para las posteriores reextracciones con hexano es de 15-45 minutos.

8. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la fase hidro-alcohólica procedente de las extracciones sucesivas con hexano se concentra en rotavapor, para dejar un residuo que se emplea directamente como producto de partida para dicho segundo procesado con benceno.

9. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho segundo procesado con benceno comprende primeramente la adición de agua y benceno al residuo concentrado de la reivindicación 8, seguido de agitación de la mezcla, decantación de la misma y separación de las fases, guardándose la fase bencénica y posteriormente una o varias reextracciones de la fase acuosa con benceno, para asegurar la extracción de todo el material antifúngico, reuniéndose todos los extractos bencénicos, los cuales previo secado con un agente desecante se concentran en un rotavapor hasta casi sequedad, para obtener un residuo que constituye dicho extracto antifúngico.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** porque la cantidad de agua que se añade a dicho residuo es de 0,10-0,20 ml y la cantidad de benceno es de 0,20-0,40 por cada ml de aceite esencial de limón de partida.

11. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** porque los periodos de extracción con benceno están comprendidos entre 0,5 y 1,5 horas.

12. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** porque el agente desecante es sulfato sódico anhidro.

13. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** porque los extractos bencénicos ya secos, se concentran en rotavapor hasta un volumen final de 0,5-1,5 ml.

14. Procedimiento según la reivindicación 13, **caracterizado** porque el concentrado final obtenido tiene un contenido en flavonas polimetoxiladas del orden de 35-45 mg/ml.



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: A01N 65/00, A23B 7/16

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	RIO, J.A. Del et al. "Citrus Polymethoxylated Flavones can confer resistance against Phytophthora citrophthora, Penicillium digitatum, and Geotrichum species". J. Agric. Food. Chem., 1998, Vol. 46, n° 10, páginas 4423-4428. Página 4424, columna 1, Materials and Methods, Polymethoxyflavone Extraction and Purification.	1-5,8-10, 12
X	CHKHIKVISHVILI, I.D. et al. "Composition of Polymethoxylated Flavone Complex from Unshiyu tangerine peel". Applied Biochemistry and Microbiology, 1994, Vol. 29, n° 4, páginas 451-454. Página 451.	1
A	VARGAS, I. et al. "Antimicrobial and Antioxidant compounds in the nonvolatile fraction of expressed orange essential oil". Journal of Food Protection, 1999, Vol. 62, n° 8, páginas 929-932.	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe

05.02.2002

Examinador

Asha Sukhwani

Página

1/1