



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①① Número de publicación: **2 159 268**

②① Número de solicitud: 200000402

⑤① Int. Cl.<sup>7</sup>: A01N 3/02

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

②② Fecha de presentación: **21.02.2000**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.09.2001**

Fecha de concesión: **29.04.2002**

④⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.06.2002**

④⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:  
**01.06.2002**

⑦③ Titular/es:  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Serrano, 117  
28006 Madrid, ES  
Universidad Miguel Hernández**

⑦② Inventor/es: **Romojaro Almela, Félix;  
Serrano Mula, María;  
Martínez Madrid, María Concepción;  
Pretel Pretel, María Teresa y  
Fernández Parra, Pedro**

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Conservante para flor ornamental cortada.**

⑤⑦ Resumen:

Conservante para flor ornamental cortada.  
La invención consiste en un conservante para flor ornamental cortada, diseñado como una mezcla de compuestos a base de azúcar comercial, ácido cítrico, citrato de sodio, germicida, inhibidor de la síntesis de etileno y humectantes que se prepara para disolver en un litro de agua y mantener en él los claveles cortados. De esta forma la vida comercial útil de la flor cortada se verá considerablemente incrementada. La principal ventaja que presenta esta composición sobre las ya existentes en el mercado es su mayor efectividad retardando la senescencia o envejecimiento de la flor cortada y el no contener compuestos que puedan ser contaminantes para el medio ambiente o nocivos para la salud humana o de animales.

ES 2 159 268 B1

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

## DESCRIPCION

Conservante para flor ornamental cortada.

**Sector de la Técnica**

Conservación de flores ornamentales, especialmente clavel.

**Estado de la técnica**

La senescencia de la flor ornamental se acelera cuando se separa de la planta, lo que determina que en pocos días la flor pierda su valor comercial. Se considera como longevidad de la flor el tiempo que ésta conserva sus cualidades decorativas; es decir, el tiempo que tardan en aparecer claros síntomas de marchitez, que, por ejemplo, en el caso del clavel son enrollamiento y necrosis de los pétalos. Este proceso de senescencia está programado genéticamente y controlado por la hormona etileno, produciéndose los cambios relacionados con él por la expresión de genes específicos (*Van Alvorst, A.C. y Bovy, A.G. 1995. The role of ethylene in the senescence of carnation flowers, a review. Plant Growth Regulation 16:43-53.*)

Además, al inicio de la senescencia de determinadas especies de flor ornamental cortada se produce un ligero aumento de peso durante los primeros días desde la recolección y posteriormente éste desciende de forma muy acusada. Coincidiendo con el inicio de la pérdida de peso fresco, también comienza a aumentar la tasa de producción de etileno. Esta producción de etileno es autocatalítica, lo que significa que el etileno producido estimula su propia síntesis (*Woodson, W.R. y Lawton, K.A. 1988. Ethylene-induced gene expression in carnation petals. Relationship to autocatalytic ethylene production and senescence. Plant Physiol. 87:498-503.*), lo que hace aumentar bruscamente la tasa de producción de etileno hasta alcanzar un máximo, que seguidamente desciende en los dos últimos días de la senescencia. En las flores climatéricas es ésta hormona la que inicia y regula los procesos que finalmente conducen a su muerte programada. Por ello, los primeros síntomas de envejecimiento se detectan cuando se inicia la producción de etileno, lo que coincide también con el descenso del peso fresco.

Debido a la importancia del etileno en la senescencia de las flores climatéricas, se han realizado numerosos estudios utilizando inhibidores de los dos enzimas clave implicados en la biosíntesis de la hormona (ACC sintetasa y ACC oxidasa) o de su acción hormonal; compuestos que consiguen inhibir la producción de etileno y retrasar la senescencia (*Halevy, A.H. 1987. Recent advances in postharvest physiology of carnations. Acta Horticulturae, 216:243-254; Wang, H. y Woodson, W.R. 1989. Reversible inhibition of ethylene action and interruption of carnation petal senescence by norbornadiene. Plant Physiology 89:434-438; Serrano, M., Romojaró, F., Casas, J.L., Del Río, J. y Acosta, M. 1990. Action and mechanism of -aminoisobutyric acid as a retardant of cut carnation senescence. Scientia Horticulturae. 4:127-134; Van Alvorst, A.C. y Bovy, A.G. 1995. The role of ethylene in the senescence of carnation flowers, a review. Plant Growth Regulation 16:43-53.*)

Sin embargo, muchos de estos inhibidores son

muy útiles para estudios sobre fisiología de la senescencia en laboratorio, pero su aplicación práctica es escasa, ya que algunos son tóxicos e incluso cancerígenos y otros, que no resultan nocivos para la salud ni para el medio ambiente, tienen unos precios muy elevados, lo que limita su empleo en la post-recolección de flores. Esta situación nos ha llevado a estudiar las posibilidades de retrasar la senescencia con un potencial de aplicación práctica, ensayando compuestos que puedan ser utilizados realmente en este sector de la agricultura.

La forma más eficaz de retrasar la senescencia de la flor climatérica cortada es mediante inhibidores de la biosíntesis de etileno. En este sentido, es importante señalar que en los últimos años se han obtenido cultivares de este tipo de flor que no producen etileno durante su senescencia, como en el caso del clavel Killer (*Serrano et al., 1990 b*), *Sandrosa, Sandra y Chinera [Mayak, S. y Tirosch, T. 1993. Unusual ethylene-related behaviour in senescing flowers of the carnation Sandrosa. Physiol. Plant., 88:420-426; Wu, M.J., Zaccarías, L. y Reid, M.S. 1991. Variation in the senescence of carnation (Dianthus caryophyllus L.) cultivars. II. Comparison of sensitivity to exogenous ethylene and of ethylene binding. Scientia Hortic. 48:109-116]*. Estos cultivares de clavel tienen una longevidad muy superior a la que presentan los cultivares climatéricos, por lo que podríamos concluir que serían mucho más adecuados para utilizar como flor ornamental, ya que además tienen un tamaño de flor y una longitud y grosor de tallo muy buenos. Sin embargo, el clavel Killer se cultiva muy poco debido a que presenta una gran sensibilidad a los trips, lo que merma considerablemente la producción de las plantaciones y además los claveles infectados por trips suelen tener una senescencia acelerada [*Serrano, M., Riquelme, F. y Romojaró, F. 1991.a. Activación del metabolismo del etileno en claveles infectados por trips (Frankliniella occidentalis). Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment., 31:359-365]*.

Por otra parte, para aumentar la longevidad de la flor climatérica cortada, además de inhibir la biosíntesis de etileno, también es necesario mantener un aporte de agua adecuado a la flor, por lo que la disolución conservante debe tener compuestos que impidan la proliferación de microorganismos, que taponarían los vasos conductores, así como aportar a la flor una fuente nutritiva que satisfaga sus necesidades metabólicas.

Todas las disoluciones diseñadas tienen una base común que denominamos solución nutritiva (SN) y que consiste en tampón cítrico-citrato, pH 4, que contiene además sacarosa como fuente carbonada, para mantener un aporte energético a la flor, y Tritón X-100, como agente tensoactivo y humectante [*Serrano, M., Rosauero, J., Del Río, J.A. y Acosta, M. 1987. Conservación de la flor cortada de clavel (Dianthus caryophyllus, L. Cv. Arthur). I. Uso de disoluciones conservadoras. Anales de Biología 14 (Biología General, 3): 39-44]*.

La SN ya es eficaz retrasando la senescencia de los claveles, ya que la longevidad de los claveles mantenidos en ella fue de 11,5 días, 2 días más que la de los claveles control mantenidos en agua

destilada. Este efecto es debido a los dos componentes de la SN. El tampón cítrico-citrato mantiene un pH que limita o impide el crecimiento microbiano e inhibe la actividad de ciertos enzimas oxidantes que, junto con los microorganismos, podrían taponar los vasos conductores del xilema y por tanto contribuye a mantener un balance hídrico adecuado en la flor cortada [Degrés, C. Y Paulin, A. 1981. Intérêt de l'emploi de solutions nutritives a l'issue d'une conservation frigorifique de durée variable d'oëillet Scania. Rev. Gén. Froid, 71(4):187-189]. La sacarosa también contribuye a mantener el balance hídrico en la flor cortada, al provoca el cierre de los estomas (impidiendo así la pérdida inicial de agua), y además, favorece la retención de agua y solutos por las células, preservando la integridad de la membrana través de procesos dependientes del metabolismo energético (De Stigter, 1980).

Sin embargo, la SN no consigue eliminar totalmente la contaminación microbiana lo que constituye un problema durante la manipulación, comercialización y mantenimiento posterior de las flores en casa del consumidor. Para intentar eliminar este problema se ensayaron diferentes compuestos germicidas, encontrando que los amonio cuaternarios eran los que presentaban las mejores prestaciones.

Para bloquear la síntesis de etileno, responsable de la senescencia de las flores climatéricas, se han utilizado diversos compuestos que actúan sobre los enzimas implicados en la biosíntesis de esta hormona vegetal o sobre el receptor hormonal responsable, tras la unión con el etileno, de su acción fisiológica.

El conocimiento de la ruta biosintética que conduce a la producción de etileno en las plantas, ha permitido utilizar inhibidores en dos etapas claras de la misma, limitando y suprimiendo la síntesis de etileno y por lo tanto su acción senescente.

La primera de estas etapas es el paso de S-adenosilmetionina al ácido l-aminociclopropano-carboxílico (ACC), que está catalizada por la enzima ACC sintetasa. De los diferentes inhibidores que se han utilizado para bloquear su acción destacan aminoetoxivilglicina (AVG) y el ácido aminoxiacético (AOA).

La segunda etapa sobre la que se puede actuar es la conversión del ACC en etileno y que está regulada por el enzima ACC-oxidasa. Se puede inhibir su acción con los iones  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$  así como con otros compuestos como dinitrofenol y el ácido aminoisobutírico.

Aunque todos estos compuestos presentan una alta efectividad, sus aplicaciones prácticas son muy limitadas, debido esencialmente a su toxicidad para el consumidor también por su elevado coste, por lo que su utilización ha quedado restringida a la investigación.

Otra posibilidad de inhibir la síntesis de etileno es bloquear el receptor hormonal de forma que al impedir la unión de ambos compuestos se evita la acción fisiológica de etileno, y se retrasa sensiblemente el inicio de los procesos de senescencia de la flor cortada.

Algunos compuestos como el 2,5 norbonadieno y el diazociclopentadieno que bloquean al recep-

tor hormonal no pueden utilizarse en la práctica por ser altamente cancerígenos.

En la actualidad, para lograr esta acción y prolongar la vida comercial útil de la flor ornamental cortada, se está utilizando el ion  $\text{Ag}^+$ , aplicado bajo la forma de complejo con el ion tiosulfato. Las soluciones conservantes presentes en el mercado para los tratamientos en continuo o en pulsaciones contienen este complejo químico.

Sin embargo también se está cuestionando el empleo del ion  $\text{Ag}^+$  por su toxicidad para el consumidor y porque la eliminación de las soluciones utilizadas presenta un grave problema al ser altamente contaminantes y muy agresivas con el medio ambiente.

Ante esta problemática se ha diseñado una solución conservante que tuviera o superase la eficacia de las que se encuentran en el mercado actualmente y que no presentase problemas de toxicidad y contaminación.

### Descripción de la invención

#### Breve descripción de la invención

La invención consiste en soluciones conservantes para flor ornamental cortada que sintetiza etileno, para tratamientos en continuo y en pulsación. En el tratamiento en continuo la flor ornamental cortada se mantiene en la solución durante todo el período de conservación, no siendo necesaria la adición o cambio de la misma.

Los tratamientos de pulsación se realizan sumergiendo la flor en la solución conservante durante un tiempo máximo de 48 horas, para posteriormente transferirla a agua o a la solución de conservación en continuo.

Ambas soluciones están formuladas a base de azúcar comercial, ácido cítrico, citrato de sodio, germicida, inhibidor de la síntesis de etileno y humectante. Las concentraciones de cada uno de los constituyentes son diferentes para la solución en continuo y en pulsación.

#### Descripción detallada de la invención

En la actualidad existen en el mercado soluciones conservantes para prolongar la vida comercial útil de la flor ornamental cortada que presentan el inconveniente, en el caso de la conservación de flores climatéricas, de contener en su formulación compuestos con alta toxicidad para el consumidor y agresivos con el medio ambiente.

Es precisamente el utilizado para inhibir la síntesis de etileno, el responsable más directo del inicio de la marchitez de la flor cortada climatéricas el que presenta un alto índice de toxicidad, ya sea bajo la forma de nitrato de plata o de tiosulfato de plata. También en ocasiones se puede encontrar presente algún germicida del tipo de la hidroxiquinoleína que también presenta altos niveles de toxicidad.

A pesar de que estas soluciones conservantes sólo se utilizan para los tratamientos de flores, en algunos países de la Unión Europea existe una reticencia en los circuitos comerciales a la comercialización o a la adquisición de flores tratadas con soluciones conservantes que contengan ion plata. Esta situación se ha visto agravada en los últimos años en Holanda e Inglaterra, ya que algunos operadores comerciales exigen a sus proveedores que la flor no haya sido tratada con compuestos a base de plata.

La solución conservante desarrollada por nosotros presenta la innovación de no incluir en su formulación germicidas con acción tóxica y haber sustituido el ion plata como inhibidor de la síntesis de etileno por un compuesto que se requiere en muy baja concentración y se utiliza en agricultura e incluso en algunos tratamientos oftalmológicos.

El germicida utilizado es un polímero de amonio cuaternario que presenta la característica de ser un potente bactericida, fungicida y algicida de amplia aplicación. Desde el punto de vista químico, el compuesto es un cloruro de alquildimetilzilamonio (cloruro de benzalconio, de cadena lateral 13-15).

Este compuesto se utiliza en la actualidad para tratamientos desinfectantes en la industria alimentaria, hospitalaria y tratamientos de aguas (industriales, consumo humano y piscinas). Estas utilizaciones, así como su baja toxicidad oral aguda, para ratas blancas (presenta un LD 50 de 530 mg/kg.), aseguran su carácter inocuo para la formulación de soluciones conservantes de flor cortada.

El inhibidor de la síntesis de etileno utilizado en la formulación de la solución conservante objeto de la patente es el ácido bórico en concentraciones muy bajas. Este compuesto actúa sobre el enzima ACC-sintetasa, responsable de la transformación del SAM (S-adenosilmetionina) en ACC (Acido 1-amino-1-carboxilicociclopropano) que a su vez se transforma en etileno por acción del enzima ACC-oxidasa.

El enzima que bloquea el ácido bórico (ACC-sintetasa) es precisamente el que regula la formación de etileno, modulando la cantidad de ACC disponible a nivel celular y por lo tanto la cantidad de etileno producido.

Tomando como base el cloruro de benzalconio y el ácido bórico se ha formulado una solución conservante matriz para flor climatérica ornamental cortada, para los tratamientos en continuo y pulsación.

Los compuestos utilizados y sus márgenes de concentración son los siguientes:

- Sacarosa: entre 1 % y 20 %
- Acido cítrico: entre 0,06 y 0,6 gramos/litro
- Citrato sódico: entre 0,066 y 0,66 gramos/litro
- Detergente: entre 0,01 y 0,1 ml/litro
- Acido bórico: entre 0,5 mM y 100 mM
- Cloruro de benzalconio: entre 0,01 y 2 ml/litro

La utilización de esta formulación en la conservación de clavel cortado, tanto en el tratamiento en continuo como en pulsación, ha permitido prolongar sensiblemente su longevidad con respecto a soluciones conservantes utilizadas en investigación o comerciales. Otro aspecto de gran interés económico es que con esta solución conservante el coste de tratamiento en continuo y en pulsación es inferior con respecto al obtenido con las soluciones comerciales existentes en el mercado.

### Ejemplo de realización de la invención

De las diferentes especies de flor ornamental, la más cultivada en los países productores es el clavel. Se caracteriza por ser climatérico y tener una vida comercial útil considerada como cortamedia que oscila, en función de la época del año, entre 5 y 9 días.

Con objeto de comprobar la eficacia de la solución conservante formulada para los tratamientos en continuo y en pulsación se ha ensayado con diferentes variedades de clavel, encontrando en todas ellas un aumento de la longevidad de la flor cortada.

Entre las posibles concentraciones y compuestos de la solución conservante ensayados con efectos positivos, hemos seleccionado como ejemplo de la realización los siguientes:

Para tratamientos en continuo:

Se ha utilizado agua comente a la que se ha añadido los constituyentes en el orden y concentración que se indican a continuación:

- Acido cítrico: 0,6 gramos/litro
- Citrato sódico: 0,66 gramos/litro
- Sacarosa (azúcar comercial): 5 gramos/litro
- Cloruro de benzalconio: 0,1 mililitro/litro
- Tritón X-100: 0,1 mililitro/litro

La aplicación en continuo de esta solución conservante al clavel cortado permite aumentar su longevidad con respecto al agua entre un 75 y un 100 %, y respecto a las soluciones conservantes comerciales, sobre un 20 %.

Para tratamientos en pulsación:

Se añaden al agua comente los compuestos en el orden y concentración que se indican a continuación:

1. Acido cítrico: 0,6 gramos/litro
2. Curato de sodio: 0,66 gramos/litro
3. Sacarosa (azúcar comercial): 100 gramos/litro
4. Acido bórico: 6,52 gramos/litro
5. Cloruro de benzalconio: 2 mililitros/litro
6. Eter octofenólico del deca-etilenglicol: 0,1 mililitro/litro

Los tallos de la flor ornamental cortada deben estar sumergidos sobre 10 cm y se mantienen entre 12 y 48 horas. A continuación se sacan las flores y se sumergen en agua corriente o en la solución conservante en continuo.

Con este sistema la longevidad del clavel ha aumentado con respecto a la flor sumergida en agua entre un 100 y un 120 % y a las soluciones comerciales, entre un 30 y 40 %.

La presencia del germicida permite su utilización durante 32 días sucesivos, no habiéndose detectado durante ese periodo de tiempo en la solución conservante desarrollo de microorganismos aeróbicos mesófilos, mohos y levaduras.

## REIVINDICACIONES

1. Conservante para flor ornamental cortada **caracterizado** porque contiene en su composición soluciones formuladas a base de azúcar comercial, ácido cítrico, citrato de sodio, germicida, inhibidor de la síntesis de etileno y humectante.

2. Conservante según reivindicación 1 **caracterizado** por una formulación que toma como base cloruro de benzalconio y ácido bórico, con los compuestos y márgenes de concentración siguientes:

- Sacarosa: entre 1 % y 20 %
- Acido cítrico: entre 0,06 y 0,6 gramos/litro
- Citrato sódico: entre 0,066 y 0,66 gramos/litro
- Detergente: entre 0,01 y 0,1 ml/litro
- Acido bórico: entre 0,5 mM y 100 mM
- Cloruro de benzalconio: entre 0,01 y 0,5 ml/litro

3. Procedimiento de aplicación de un conservante según reivindicación 1 para tratamiento en continuo de flor ornamental **caracterizado** porque se añaden al agua los constituyentes en el orden y concentración siguientes:

- Acido cítrico: 0,6 gramos/litro
- Citrato sódico: 0,66 gramos/litro
- Sacarosa (azúcar comercial): 5 gramos/litro
- Cloruro de benzalconio: 0,1 mililitro/litro
- Tritón X-100: 0,1 mililitro/litro

4. Procedimiento de aplicación de un conservante según reivindicación 1 para tratamiento en pulsación de flor ornamental **caracterizado** porque se añaden al agua los constituyentes en el orden y concentración siguiente:

- Acido cítrico: 0,6 gramos/litro
- Citrato de sodio: 0,66 gramos/litro
- Sacarosa (azúcar comercial): 100 gramos/litro
- Acido bórico: 6,52 gramos/litro
- Cloruro de benzalconio: 2 mililitros/litro
- Eter octofenólico del deca-etilenglicol: 0,1 mililitro/litro

estando los tallos cortados sumergidos sobre 10 cm. durante 12 a 48 horas.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>: A01N 3/02

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados   | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| Y         | JP 02-304001 A (DAICEL CHEM IND LTD) 17.12.1990. Resumen obtenido de la Base de Datos PAJ (Patent Abstracts of Japan) en EPOQUE "on line". Resumen de la Base de Datos.  | 1                          |
| Y         | GB 2189676 A (HALO PRODUCTS CLOSE CORPORATION) 04.11.1987, reivindicaciones 1,3,7,10-11,19-21,26,29.   | 1                          |
| Y         | WO 9534199 A1 (ABBOT LAB.) 21.12.1995, reivindicaciones 1,2,4.   | 1                          |
| A         | SU 1583064 A (BOGDAN GP) 07.08.1990. DW 199113. Resumen obtenido de la Base de Datos WPI (World Patents Index) (Derwent Publications Ltd.) en EPOQUE "on line". N.º de acceso 1991-093688 (13). Resumen de la Base de Datos.                                 | 1                          |
| A         | EP 562898 A2 (TAKEDA GARDEN PRODUCTS CO. LTD.) 29.09.1993, página 3, líneas 41-42; ejemplos 23,26,39-40; reivindicaciones 1,3,6,10-11.   | 1-2                        |
| A         | SERRANO, M. et al. "Conservación de la flor cortada del clavel (Dyanthus caryophyllus, L. c.v.Arthur) I. Uso de disoluciones conservadoras". ANALES DE BIOLOGIA, 14 (Biología General, 3) 1987: 39-44. Secretariado de Publicaciones. Universidad de Murcia. |                            |

**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.º:

**Fecha de realización del informe**

21.05.2001

**Examinador**

I. Galíndez Labrador

**Página**

1/1