

TÍTULO DE PATENTE No. 357455

Titular(es): CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.

Domicilio: Av. Normalistas 800, Colinas de la Normal, 44270, Guadalajara, Jalisco, MÉXICO

Denominación: PROCESO DE SECADO POR MICRO ASPERSIÓN Y PREPARACIÓN DEL COMPLEJO DE INCLUSIÓN HESPERIDINA/CICLODEXTRINA.

Clasificación: CIP: C08B37/16; A61K31/724; A61K31/7048; A61P3/02; C07H17/07; C08B30/18
CPC: C08B37/0015; A61K31/724; A61K31/7048; C07H17/07; C08B30/18; C08B37/0021

Inventor(es): MA. DE LOS ÁNGELES SÁNCHEZ CONTRERAS; MANUEL OCTAVIO RAMÍREZ SUCRE; NEITH ARACELY PACHECO LÓPEZ; INGRID MAYANIN RODRÍGUEZ BUENFIL

SOLICITUD

Número: MX/a/2014/015444
Fecha de Presentación: 16 de Diciembre de 2014
Hora: 09:38

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 16 de diciembre de 2034

Fecha de Expedición: 21 de junio de 2018

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6º fracciones III y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.) 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012 y 09/04/2012); artículos 1º, 3º fracción V inciso a), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1º, 3º y 5º inciso a) del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

El presente oficio se signa con firma electrónica avanzada (FIEL), con fundamento en los artículos 7 BIS 2 de la Ley de la Propiedad Industrial; 3o de su Reglamento, y 1 fracción III, 2 fracción V, 26 BIS y 26 TER del Acuerdo por el que se establecen los lineamientos para el uso del Portal de Pagos y Servicios Electrónicos (PASE) del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, en los trámites que se indican.

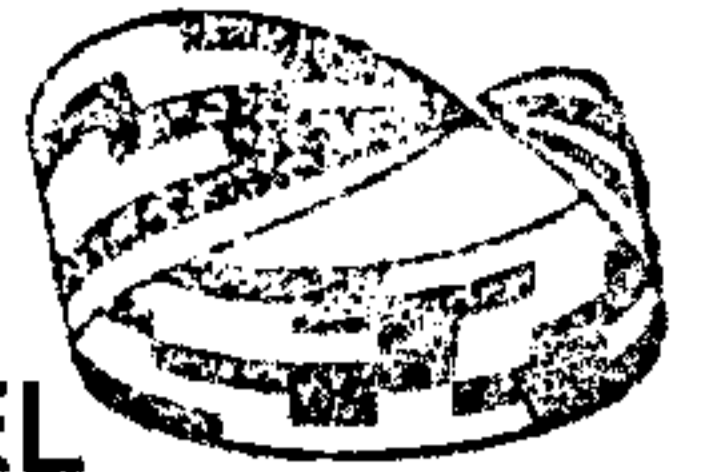
LA DIRECTORA DIVISIONAL DE PATENTES NAHANNY CANAL REYES



Cadena Original:
NAHANNY MARISOL CANAL REYES|00001000000403252793|Servicio de Administración Tributaria|1695||MX/2018/57745|MX/a/2014/015444|Título de patente normal|1223|GAGV|Pág(s) 1|PN5VL6Zrvq7VgXBE2mY9UVzvwZQ=

Sello Digital:
rELKI5cjZcBI3e12iDPYEFdiYQSGBy4Q8iHQM6InKgXWV8eA9+iYgQwqS3nkt9I6hVI6b4xXzAPuIK+nV32HDM0gm5eIC/88peil3ENusyIOfkncCBz8whwhUDIE697XQ97tWjuNn/yC67TDyGAfEmVHV5jJvVWIXiQw5QxbP3nFmc6Nj2h0+p9KmYz/R3GbxIKXULCPnPYpXgVSp4zfY6EJYGgoK2nSfB+Bh0xIGI5WleRFIqZMcX0iZfhPejh9hokqLkiU/Fe9Ua Nk/0Gf6dR2wMxuautxm74Qb4AjZk/CS6E6ctwlpKuwAlp3dH9WrpXg6BHzQIHW6NmTI5qXQ==





**PROCESO DE SECADO POR MICRO ASPERSIÓN Y PREPARACIÓN DEL
COMPLEJO DE INCLUSIÓN HESPERIDINA/CICLODEXTRINA**

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se relaciona con hesperidina, particularmente con su proceso de formación del complejo de inclusión hesperidina/ciclodextrina, y secado para su uso en alimentos y bebidas.

OBJETO DE LA INVENCION

- 10 El objeto de la presente invención es un método para lograr un aumento en la solubilidad de flavonoides como la hesperidina aumentando su estabilidad térmica y disminuyendo su fotosensibilidad para poder ser usada en la suplementación de alimentos y bebidas con pH ácido.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

Los flavonoides se emplean desde hace mucho tiempo como colorantes de lana y actualmente se usan en la conservación de grasas o jugos de frutas debido a las propiedades antioxidantes de algunas polihidroxi flavonas. Su acción farmacológica es también extensa y variada, son bien conocidas sus actividades como auxiliares en la fragilidad capilar, dilatadores de las coronarias, espasmolíticas, destacándose la actividad antimicrobiana de flavonoides prenilados y otros fenoles y la acción fungitóxica de las isoflavonas.

20

En frutas cítricas, el flavonoide más abundante es la polihidroxi flavona llamada hesperidina, la cual ha sido ampliamente estudiada por su uso potencial en el tratamiento de enfermedades degenerativas e infecciosas.

25

La hesperidina está presente en las diferentes partes del fruto, así como en la planta misma, de donde es cosechado. Ha sido comprobado que la mayor cantidad de dicho flavonoide se encuentra en la fracción de flavedo de la cáscara de naranja, alcanzando hasta 1700-2300 mg/100 g de peso de fruto fresco, aunque también se encuentra en las semillas, la cáscara y el jugo (422, 1400 y 94 mg/100g peso fresco, respectivamente). Por la cantidad presente en este último, es importante considerar la suplementación adicionando hesperidina, proveniente de la cáscara y el flavedo, para aumentar su capacidad como preservadores naturales y antioxidantes en el jugo natural.

30

En la actualidad, existen estrictas regulaciones sobre el uso de productos químicos en alimentos, muchos de los cuales han sido retirados del mercado. En consecuencia, se han

venido desarrollando diversas alternativas al uso de estos compuestos para el control de enfermedades o como preservadores naturales y antioxidantes (Baker KF. 1987. Annu. Rev. Phytopathol. 25:67-85; Cook RJ. 1993. Annu. Rev. Phytopathol. 31:53-80).

En el estado de la técnica, existen múltiples trabajos que refieren el proceso de obtención de extractos de flavonoides cítricos que incluyen a la citroflavona hesperidina a partir del residuo del procesamiento industrial. Sin embargo, no se encuentra referencia al empleo de la hesperidina pura y encapsulada obtenida a partir de los desechos generados del proceso de extracción del jugo, para la suplementación de los mismos. Desde los años 40's se tienen patentes registradas para obtener derivados de la hesperidina, cuyo objetivo principal es aumentar su solubilidad en soluciones acuosas, a fin de poder añadirla a bebidas para consumo humano. En el caso de la patente US 2,350,804 (Masaki Otha, 1939), cuyo objetivo era obtener productos solubles en agua y aplicarlos en la industria farmacéutica. El proceso protegido por Masaki desde 1939 se ha seguido empleando hasta la fecha, este proceso consiste en disolver hesperidina con potasa o sosa, luego reaccionar con clorocarbonato de etilo en alcohol u otro solvente, para incorporar un radical alquilo en la hesperidina, obteniendo un nuevo producto más soluble en agua. Actualmente, la obtención de hesperidina podía realizarse mediante el uso de una solución alcalina metanólica, con sosa o lechada de cal y metanol, aplicando la extracción a la corteza de cítricos previamente triturada, posteriormente se filtraba y se precipitaba la hesperidina con ácido, para finalmente lavarla y deshidratarla. Sin embargo, este procedimiento es costoso por las dificultades de filtrar y los tiempos prolongados de contacto hacen que el producto pueda perder sus cualidades nutraceuticas. López Sánchez en julio de 1985, propuso mediante la solicitud de patente española No. 545,275 una mejora de proceso aplicada a cítricos. El proceso consistía en trituración y molienda de la materia prima, deshidratada o no, hasta el tamaño de partícula deseado, desde 2-3 mm para la mejor extracción de la hesperidina. Se enviaba a los reactores de extracción, previa mezcla de cal apagada (pH 11-12), en un tiempo mínimo y sin formación de coloides, posteriormente se separaba el líquido filtrado alcalino, se neutralizaba con ácido mineral (pH de 2-5) a temperatura ambiente, enseguida se decantaba y separaba el precipitado cristalizado para lavarse. Finalmente, se secaba con aire caliente a 100°C y con ello se podía obtener un producto con un contenido de hesperidina del 97%. Si se deseaba incrementar la pureza, se re-disolvía la hesperidina en medio alcalino, se hacía una extracción metanólica para separar gomas, pectinas, grasas, etc. Posteriormente, se filtraba, diluía, precipitaba, lavaba y secaba nuevamente la hesperidina, obteniendo un producto con un contenido de hasta el 99.5% de pureza.

Concluyeron que partiendo de cortezas frescas, el rendimiento podía variar de entre 0.6 y 0.91%; en cambio con cortezas secas incrementaba hasta 1.0 %.

Posteriormente, en ese mismo año los españoles Oliva y Hernández solicitaron una patente (No. 546,924), donde ellos mencionaban que los residuos de las separaciones sucesivas del método alcalino anteriormente descrito, eran un verdadero problema ecológico y prácticamente por ese motivo había cerrado una empresa importante que utilizaba dicho proceso. Ellos plantearon un nuevo proceso que consistió en aprovechar la solubilidad de la hesperidina en solventes orgánicos que contenían nitrógeno (formamida, piridina y NN-dimetil formamida). Mediante maceraciones, decantaciones, filtraciones y lavados obtuvieron producto hesperidina con una pureza entre 94 y 98%. Manifiestan obtener mejores rendimientos que los obtenidos en el proceso alcalino.

En años más recientes Timothy A. Anglea y colaboradores (Florida, Estados Unidos), solicitaron en 2008 la patente (PCT, patrocinada por Coca Cola) con publicación No. US 2010/0159115 A1, intitulada "Extracto de cítricos rico en flavonoides" con enfoque a bebidas funcionales. Los antecedentes que menciona la patente citada, estriban en que los cítricos han sido reconocidos por algunos de sus nutrientes como biológicamente activos (funcionales) en humanos (US 2002/006953 A1), principalmente los fitoquímicos que se clasifican en: limonoides, carotenoides y flavonoides. De estos últimos identificaron en dichos extractos entre otros compuestos a la hesperidina, narirutina y didimina.

Por otro lado, sabemos que estos compuestos poseen un sabor amargo, por lo que también se han realizado investigaciones, con el objetivo de lograr la remoción de los flavonoides que confieren ese sabor característico y mejorar la calidad de los productos cítricos que se comercializan. Como ejemplo podemos citar la patente US2004/0081734, donde se propuso una alternativa de proceso para eliminar algunos componentes "indeseables" de los extractos de cítricos, mediante columnas con resinas de adsorción. En la patente US2006/9195089 se planteó también el uso de resinas de adsorción del tipo de vinil benceno para refinar un jugo extraído de los subproductos cítricos y reducir con ello sustancialmente el nivel de componentes que naturalmente están presentes, incluyendo los flavonoides (hesperidina y narirutina) y terpenos (limonina). Esta patente protege el método para lograr la remoción de algunos componentes amargos indeseables. Sin embargo, también eliminaba compuestos bioactivos con cualidades nutraceuticas deseables. En forma similar fue solicitada la patente US 2006/0141114 A1, en la que se incluyó a la uva y los cítricos para obtener ingredientes secundarios, para fortificar jugos primarios. Esta misma patente cita a la patente US 6,506,427, en la cual se propuso la obtención de sólidos coloidales en forma

cristalina a base de polifenoles y bioflavonoides, entre los que distinguen la abundancia de la naringina obtenida a partir de la toronja, y la hesperidina, obtenida de naranja. Así mismo, la patente US 7,108,887 (Chu, 2006) defiende un proceso para fortalecer un jugo, considerando las pérdidas naturales en los procesos de los flavonoides, compuestos polifenólicos tipo carotenoides y las flavonas. En el proceso propuesto por Yehuda y Anglea mediante la patente US2010159115 A1, los residuos de cítricos provenientes del proceso de extracción de jugo, fueron reducidos en tamaño, pasando a una segunda etapa de despectinación enzimática, el cual se filtró y este filtrado fue desactivado térmicamente, para una posterior clarificación y centrifugación, después de haber removido buena parte de los sólidos suspendidos enseguida el jugo fue desamargado con resinas de adsorción, se pasteurizó y concentró posteriormente hasta 65°Brix, se ajustó el pH por acidulación y se envasó asépticamente o se congeló, ofreciendo de este modo una estabilidad de al menos 2 años de vida de anaquel. Con el proceso anterior se obtuvo un extracto de al menos 700 mg/L de flavononas cuando el jugo es reconstituido a 11.8 °Brix.

15 Considerando el efecto benéfico para la salud, que representa el consumo de flavonoides, es importante mantener e incluso mejorar la cantidad de hesperidina contenida en los jugos naturales de naranja. Siendo que las flavanonas son los principales fitocompuestos presentes en los desechos de industrialización de Naranja (*Citrus sinensis*). Y que la hesperidina (Hes) es la flavanona que se encuentra en mayor proporción, apreciada por su capacidad antioxidante, pero su uso como aditivo alimentario se encuentra limitado, debido a que es poco soluble en agua y altamente sensible a la oxidación por temperatura, pH y luz. Recientemente se han reportado otros métodos de solubilización de flavonoides empleando un álcali fuerte al cual se añade a una solución de polisacárido incrementando la viscosidad y el pH. (JP10101705). En otra patente describen un método para mejorar el sabor de un alimento o bebida añadiendo un glucósido hesperidina, capaz de reducir los sabores desagradables y olores de la comida, como el sabor amargo, astringente, amargo sabor, olor de hierba, sabor picante, otros olores peculiares y gustos peculiares, para mejorar el sabor de la comida o la bebida. En este método para mejorar el sabor de un alimento o bebida realizan la adición de un glucósido hesperidina en el que una cadena comprende de uno a veinte moléculas de glucosa unidas beta-1,4 a la posición 4 de la glucosa de la hesperidina a través de un enlace beta-1,4 y por medio una glicosiltransferasa (ciclodextrina glucanotransferasa) la cual se obtiene para actuar sobre la hesperidina y dextrina como materias primas. (JP 11318379).

Otra patente JP2008271839, describe el proceso para elaborar una composición de flavonoides que mejora la estabilidad y la solubilidad en agua de los flavonoides difícilmente solubles. Obtiene la composición mediante el uso de un método de preparación que comprende la mezcla del flavonoide difícilmente soluble con ciclodextrina en una solución alcalina de agua, una solución mixta agua-disolvente orgánico o un disolvente acuoso bajo un estado supercrítico. Refiriendo concentraciones hesperidina-ciclodextrina mol a mol de 1,5-5,0 y 0,1-1,0 mol.

A diferencia de las invenciones anteriormente citadas, y de la literatura existente respecto al trabajo de la hesperidina, en la presente invención el problema técnico a resolver es mejorar la solubilidad de la hesperidina y aumentar su estabilidad sin afectar la palatabilidad de los alimentos suplementados.

En la presente invención se considera el empleo de las ciclodextrinas alfa- beta- y gama- (CDx) debido a que han sido ampliamente estudiadas por su capacidad para formar complejos de inclusión con numerosos compuestos, declarándose segura para consumo humano. Por ello, el objeto de esta invención es obtener hesperidina de los residuos del procesamiento de naranja para encapsularla molecularmente formando complejos de inclusión Hesperidina-CDx con el fin de aumentar su estabilidad a la luz, temperatura y pH, mejorando su solubilidad. Adicionalmente, este complejo de inclusión ha favorecido la disminución de la carga bacteriana de jugos no pasteurizados, siendo una solución para suplementar con ello alimentos y bebidas para mejorar la salud.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Cromatograma del extracto metanólico crudo de cáscara de naranja $\lambda = 290$ nm (HPLC)

Figura 2. Espectro de absorción en UV de Hesperidina obtenida a diferente concentración.

Figura 3. El flavonoide hesperidina, compuesto por la flavanona hesperitina y el disacárido rutinosa.

Figura 4. Espectro de IR de hesperidina obtenida de residuos cítricos empleando método de extracción criogénico y comparación contra hesperidina comercial.

Figura 5A. Espectro de fragmentación de masas de hesperidina comercial de residuos cítricos empleando método de extracción criogénico.

Figura 5B. Espectro de fragmentación de masas de hesperidina obtenida de residuos cítricos empleando método de extracción criogénico.

Figura 6. Disolución de hesperidina en función de la concentración de Ciclodextrina.

Figura 7. Estabilidad de la actividad antioxidante del complejo Hes/CDx a diferentes temperaturas.

Figura 8. Micrografía electrónica de Barrido del complejo de inclusión Hes/CDx, que muestra la cristalización del complejo en relación molar (1:3)

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un proceso de secado por aspersion para la preparación de complejos de inclusión cristalinos de hesperidina (Hes) empleando ciclodextrina (CDx) como encapsulante, el proceso comprende disolver Hes, que se obtiene de residuos cítricos por extracción criogénica, en una solución de CDx, con una configuración β - ó γ -, en una relación al menos de 1:3 pudiendo realizarse en múltiplos de la misma, eliminar los sólidos no disueltos o partículas precipitadas para generar la solución de aspersion con un pH que puede variar de 3 a 7; alimentar la solución de aspersion a un sistema de secado por microaspersion empleando aire caliente y una bomba de presión para lograr la formación de micro gotas, en donde la temperatura de entrada de secado va de 100-117°C y la de salida de 75-90°C; realizar el secado de las micro gotas en la cámara de secado para formar instantáneamente partículas sólidas; recuperar las partículas de polvo, que resultan en partículas de forma cristalina del complejo de inclusión Hes/CDx.

Del proceso anteriormente descrito se obtiene un complejo de inclusión de Hes/CDx caracterizado por ser un polvo color crema con P.F. entre 278 y 294 °C, es altamente soluble en agua alcanzando valores de solubilidad con Ks entre 64 y 87 mM dependiendo de la ciclodextrina empleada β ó γ .

Dicho complejo puede utilizarse para formulaciones de uso en bebidas o alimentos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un proceso de secado por micro aspersion y preparación del complejo de inclusión hesperidina/ciclodextrina para suplementación de jugos. El problema técnico a resolver es incrementar la solubilidad, estabilidad térmica y preservar las cualidades antioxidantes de la hesperidina sin afectar su palatabilidad. El método propuesto utiliza el método de la solicitud de patente Mx/a/2012/014554, para lograr la obtención del extracto flavonólico de residuos cítricos. La aplicación de este método de extracción incluye una extracción criogénica con metanol-agua en proporciones variables en función de la

polaridad del extracto que se desea extraer mayoritariamente. Posteriormente se realiza una purificación y concentración empleando extracción en fase sólida con una resina catiónica, ampliamente comercializada (AmberlitaXAD2). Sin embargo, sabiendo que uno de los mayores limitantes que presenta la hesperidina para su uso es su baja solubilidad y alta sensibilidad a degradación por luz y temperatura, en este método se detalla el proceso de inclusión molecular de hesperidina en β - y γ -ciclodextrinas. Una vez establecidas estas condiciones de encapsulamiento se ha realizado el proceso a escala semipiloto, para realizar la suplementación de jugos naturales de naranja, a los cuales se les ha evaluado sensorialmente, para verificar su aceptación, y su evaluación fisicoquímica y microbiológicamente para verificar su inocuidad.

Ejemplo 1

Obtención de harina de la cáscara.

Los residuos obtenidos de la extracción del jugo (cáscara, flavedo albedo y semillas), son deshidratados en una estufa con recirculación de aire en donde la temperatura varía entre 40 y 85 °C, por un tiempo definido en función de la temperatura empleada que va de (4 - 24 hrs) hasta alcanzar una humedad relativa entre (10.87% y 14.23 %). Los residuos deshidratados se reducen de tamaño empleando un molino industrial hasta alcanzar tamaños de partícula uniformes entre 40 y 200 μm .

Ejemplo 2

Extracción y concentración e identificación de la hesperidina.

La harina de naranja obtenida en el ejemplo 1 se somete a extracciones criogénicas empleando un volumen metanol/agua variable establecido entre 10 y 50% de contenido de agua la temperatura disminuye (de -10 a -40 °C) cuando se adiciona CO₂ sólido. Esta mezcla criogénica se mantiene en agitación constante por 3-10 hrs. para posteriormente recuperar el extracto, el cual es concentrado a presión reducida (0.25-4.0 mBar) a (40- 70°C) logrando una reducción de volumen de los extractos de entre 50 y 80 %. Este extracto contiene hesperidina mayoritariamente. En la figura 1 se muestra el cromatograma de HPLC realizado.

CONDICIONES Y EQUIPAMIENTO DE LA DETERMINACIÓN POR HPLC

Equipo: Finnigan Surveyor, Autosampler Plus.

Detector: Finnigan Surveyor PDA Plus Detector.

Columna: Phenomenex, 00F-4435-E0, Gemini 5 μ , C 18 110 Å, 150 x 4.60 mm, 5 micron.

Vol. Inyección: 25 μ l

Disolvente A: Agua HPLC, con ácido fórmico al 0.1 %

5 Disolvente B: Acetonitrilo. Con ácido fórmico al 0.1 %

Programa de corrida: Detección $\lambda=290$ nm, $\lambda=350$ nm

Tiempo de corrida: 80 minutos, dividido en 6 etapas de acuerdo a la tabla1 en donde se detalla el tiempo y proporción de solventes, manteniendo un flujo constante de 1ml/min

10 Tabla 1. Rampas de elución para la separación de hesperidina por HPLC.

Etapa	TIEMPO (min)	SOLVENTE A (%)	SOLVENTE B (%)
1	1	90	10
2	40	74	26
3	70	35	65
4	71	0	100
5	75	0	100
6	80	90	10

El extracto reducido se percoló en amberlita XAD2 lavando primero con agua y después con fracciones de concentración creciente de Agua-Metanol, hasta llegar a solo metanol. La caracterización de la hesperidina y determinación de su pureza se realizó mediante la determinación del punto de fusión comparado con estándares de pureza conocida.

Las propiedades físicas y químicas de la hesperidina obtenida se describen a continuación:

- Estado físico: polvo
- Color: amarillo-marrón, Color en medio alcalino: amarillo intenso
- Punto de fusión: 275 °C.
- 20 • Índice de refracción: 1.695
- Actividad antioxidante (Método DPPH): 1.59 mEq de Trolox/mg hesperidina
- Pureza: 90%, determinada por HPLC.
- Solubilidad: Fuertemente soluble en metanol y agua a pH 11.0, medianamente soluble en etanol, poco soluble en agua.
- 25 • Espectrofotometría: En agua tiene un máximo de absorción a 265 nm, en etanol y metanol absoluto el máximo es a 285 nm, figura 2 en la que se pueden observar dos bandas de máxima absorción a 282 y 345 nm. La banda I, de mayor longitud de onda en el rango 360-390 nm asociada con la

funcionalidad cinamoilo, y la banda II, entre 250-280 nm de banda aromático A (funcionalidad benzoilo). La posición de la banda I coincide con el tipo de flavonoide: las flavonas la muestran en 310-350 nm, los flavonoles 3-O-sustituidos en 330- 360 nm, los flavonoles en 350-385 nm, flavanonas 360-390.

La hesperidina se caracterizó también por IR y EM comprobando la estructura de Hesperitina y el azúcar rutinosa, figura 3. En el espectro de IR, figura 4, puede verse que en las zonas donde se involucran los estiramientos y deformaciones OH se observan los mayores cambios de intensidad y corrimiento de las bandas debido a desprotonación y/o coordinación de los grupos OH del azúcar en un medio alcalino fuerte. Por el estiramiento en 878 cm⁻¹ se determina que el residuo glucosa se une a la hesperitina como el anómero β y la de 818 cm⁻¹, da cuenta de que el residuo de desoximansa está presente como anómero α. En la tabla 2, se describen las asignaciones de cada señal observada en el espectro de Infra rojo.

Tabla 2. Asignaciones de estiramiento y vibración de los enlaces de la molécula de hesperidina en una frecuencia de infrarrojo cercano.

Hesperidina	Asignaciones
1647 mf	v (C=O)
1609 f	v (C=C), anillo
1447 m	δ (CH ₂)
1361 m	δ (COH)
1285 f	δ (COH), v (C-O-C)
1196 f	δ (CH ₂)
1129 f	
1090 h	v (C-O) _{endo}
1072 mf	v (C-O) _{exo}
1030 h	
975 m	
	v (V=O)
878 h	δ (C1H), β glucosa
818 d	δ (C1H), α desoximansa
743 d	
671 d	

La caracterización de la hesperidina también se realizó mediante la fragmentación de masas. En la Figura 5A se muestra la fragmentación de la hesperidina comercial y en la figura 5B la fragmentación de la hesperidina obtenida. Podemos observar una mayor estabilidad de la

hesperidina extraída por el método criogénico (Figura 5B), en comparación con la hesperidina comercial ya que se obtienen dos picos de ion molecular estables de 575 y 503 unidades de masa atómica.

5 Ejemplo 3

Obtención y secado del complejo de inclusión Hesperidina-Ciclodextrina.

La hesperidina obtenida puede ser acomplejada o incluida con β - o γ - ciclodextrina, estas ciclodextrinas se caracterizan por tener un núcleo hidrofílico con tamaño de cavidad suficiente para obtener complejos donde la molécula huésped o sustrato, queda incluida o encapsulada en el interior de la ciclodextrina. La formación del complejo está regida por un proceso de reconocimiento molecular donde es importante la compatibilidad geométrica, el tamaño y forma, además de la polaridad de la molécula a encapsular ya que a una mayor polaridad de la ciclodextrina menor capacidad de formar complejos. Una vez formado el complejo de inclusión la molécula huésped sufre cambios en sus propiedades fisicoquímicas, tales como aumento de la solubilidad, lográndose un aumento en la biodisponibilidad del soluto en una solución acuosa.

La formación del complejo se realiza manteniendo la CDx en solución con pH y oxígeno disuelto controlado. A medida que se incrementa la concentración de la CDx (β - o γ -), se logra una mayor disolución de la hesperidina añadida, alcanzando una concentración en disolución desde 20mM hasta 79.3 mM de hesperidina cuando la concentración de CDx varía de 3 a 9 mM (Fig 6). En este proceso el valor de pH puede variar de 3 a 7, formando un complejo que no se ve afectado al ser adicionado a soluciones ácidas como los jugos naturales de cítricos.

Otros factores que se ven afectados favorablemente son la estabilidad térmica, la oxidación o degradación fotoinducida, y en otros aspectos también podemos mencionar los cambios en el enmascaramiento de sabor o reducción de su foto sensibilidad.

Para proteger la formación del complejo la solución de inclusión es secada empleando un sistema de micro aspersión. La temperatura de entrada puede variar de 100 -117 °C y la temperatura de salida de 75-90 °C, manteniendo un flujo de aire entre 300-600 L/h, con una velocidad de alimentación variable entre 5-25 mL/min y una presión de atomización desde 10-25 psi. De este modo el complejo de inclusión hesperidina ciclodextrina, mantiene sus propiedades antioxidantes sin requerir protección de la luz ni refrigeración, figura 7 observándose que no se degrada fácilmente aun manteniendo el complejo a temperaturas de 60°C hasta por 40 días, mientras que la hesperidina sin encapsular pierde rápidamente su

capacidad antioxidante por el efecto de la temperatura. Adicionalmente se corroboró que el complejo Hesperidina/ciclodextrina logra cristalizar cuando se alcanza relaciones molares (1:3 de Hes:CDx) a diferencia de la hesperidina o ciclodextrina de forma independiente las cuales no cristalizan figura 8.

5

Ejemplo 4

El complejo de inclusión en polvo puede ser conservado a temperatura ambiente sin afectar sus propiedades antioxidantes (Figura 7) y ser reconstituido en soluciones ácidas (pH 3-7), como bebidas cítricas para su suplementación, sin afectar sus características fisicoquímicas ni sensoriales, de acuerdo a la siguiente tabla:

10

Tabla 3. Especificaciones fisicoquímicas de jugos de naranja procesados

<i>ESPECIFICACIONES *</i>	<i>Valores mínimos</i>	<i>Valores máximos</i>
Valores de pH	3	4
Acidez titulable	0.65	1.85
Sólidos solubles disueltos por lectura refractométrica a 20°C (expresado en grados Brix.	10.5	13.5
Relación entre el contenido de sólidos disueltos y acidez titulable (madurez)	12	20

La adición a jugos naturales se evaluó en jugo de naranja con y sin pasteurización, manteniendo estable el complejo de inclusión y sus propiedades.

15

La suplementación de jugos con este complejo de inclusión en polvo puede realizarse en un rango de 0.5 a 1%, sin afectar el color o sabor de la bebida encontrándose dentro del rango de aceptabilidad de parámetros fisicoquímicos para jugos procesados. La palatabilidad de la bebida suplementada se comparó ante un panel de jueces que realizaron dos pruebas sensoriales afectivas, una de preferencia en la que el atributo evaluado fue el sabor y otra de nivel de agrado en la que los atributos evaluados fueron el color, olor y sabor en pruebas, empleando muestras codificadas que correspondían a jugos suplementados con el complejo de inclusión o con cada uno de los componentes del complejo por separado o bien jugos naturales sin suplementación. Ver tabla 4. Los resultados indican un aumento en el nivel de

20

preferencia para los jugos suplementados con el complejo, cuando se evalúan por sus parámetros edénicos de color, sabor y olor.

5

Tabla 4.

TRATAMIENTO	ESCALA HEDÓNICA		
	Color	Olor	Sabor
Control	3.65 ± 0.75 ^{ab}	3.48 ± 0.72 ^b	2.42 ± 0.99 ^c
CDx	3.71 ± 0.64 ^{ab}	3.55 ± 0.57 ^{ab}	3.52 ± 1.06 ^b
HES	3.35 ± 0.80 ^b	3.52 ± 0.68 ^b	2.58 ± 0.99 ^c
Complejo CDx/HES	3.97 ± 0.66 ^a	3.87 ± 0.62 ^a	4.13 ± 1.88 ^a

CÓDIGO DE LA MUESTRA	TRATAMIENTO	PRUEBA DE PREFERENCIA
509	Complejo CDx/HES	3.29 ± 0.82
806	CDx	3.10 ± 0.98
259	HES	1.94 ± 0.81
462	Control	1.68 ± 0.91
Resultado Friedman	χ^2	36.755*

15 ar y secado por aspersión logra la obtención de hesperidina cristalizada, aumentando la temperatura de fusión de 275 para la hesperidina obtenida hasta a 294 °C para la hesperidina encapsulada en β -ciclodextrina, mejorando su capacidad antioxidante en un 40 % en relación a la hesperidina sin encapsular.

20 El complejo de inclusión obtenido, posee mejores propiedades antioxidantes, microbicidas y aumenta su solubilidad en comparación con la hesperidina no encapsulada, pudiendo ser adicionado a bebidas con pH ácido, para mejorar sus cualidades nutracéuticas sin afectar su palatabilidad.

REIVINDICACIONES



1. Un proceso de secado por aspersion para la preparaci3n de complejos de inclusi3n cristalinos de hesperidina (Hes) con ciclodextrina (CDx) caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
 - a) disolver Hes en una soluci3n de CDx, en una relaci3n molar Hes/CDx de al menos 1:3;
 - b) eliminar los s3lidos no disueltos o part3culas precipitadas para generar la soluci3n de aspersion, con un valor de pH de entre 3 a 7;
 - c) alimentar la soluci3n de aspersion a un sistema de secado por microaspersion empleando aire caliente y una bomba de presi3n para lograr la formaci3n de micro gotas;
 - d) realizar el secado de las micro gotas en la c3mara de secado para formar instant3neamente part3culas s3lidas, con una temperatura de entrada a la c3mara de secado de entre 100-117°C, y una temperatura de salida de entre 75-90°C; con una velocidad de alimentaci3n de entre 5 a 25 mL/min y una presi3n de atomizaci3n de 10 a 25 psi;
 - e) recuperar las part3culas de polvo, que resultan en part3culas de forma cristalina del complejo de inclusi3n Hes/CDx.
2. El proceso de conformidad con la reivindicaci3n 1, en donde la CDx puede tener la configuraci3n β - o γ -.
3. El proceso de conformidad con la reivindicaci3n 1, en donde la hesperidina es obtenida de residuos c3tricos.
4. El proceso de conformidad con la reivindicaci3n 3, en donde la hesperidina es obtenida a trav3s de extracci3n criog3nica.
5. Un complejo de inclusi3n de Hes/CDx en relaci3n molar 1:3 obtenible mediante el proceso de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por ser un polvo color crema con P.F. entre 278 y 294°C, y por ser altamente soluble en agua alcanzando una constante de solubilidad (Ks) entre 64 y 87 mM.

6. Uso del complejo de inclusión de la reivindicación 5, para la elaboración de formulaciones suplementarias en bebidas o alimentos.
7. El uso de conformidad con la reivindicación 6, en donde las formulaciones suplementarias mejoran las cualidades nutracéuticas de las bebidas y alimentos sin afectar su palatabilidad.

5

10

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención describe el proceso de secado por micro aspersion y la
5 preparación del complejo de inclusión Hesperidina/Ciclodextrina, para la elaboración
de jugos suplementados. En el proceso la hesperidina cristaliza y permanece estable
a la temperatura y la luz. El proceso es aplicable a escala piloto y fabricación comercial.
El complejo de inclusión obtenido, posee mejores propiedades antioxidantes,
microbicidas y aumenta su solubilidad en comparación con la hesperidina no
10 encapsulada, pudiendo ser adicionado este complejo (Hesperidina/Ciclodextrina) a
bebidas cítricas para mejorar sus cualidades nutracéuticas sin afectar su palatabilidad.

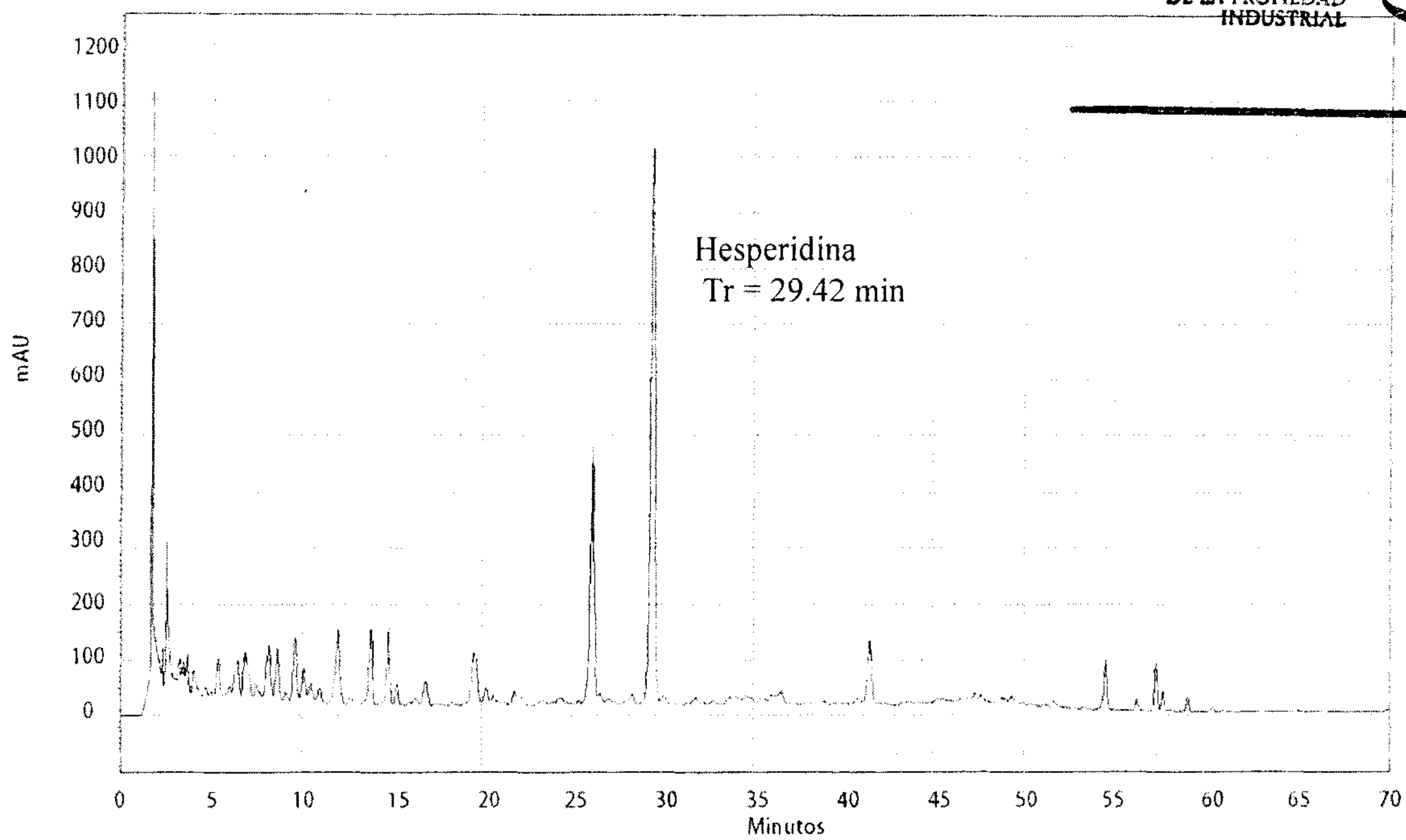


FIGURA 1

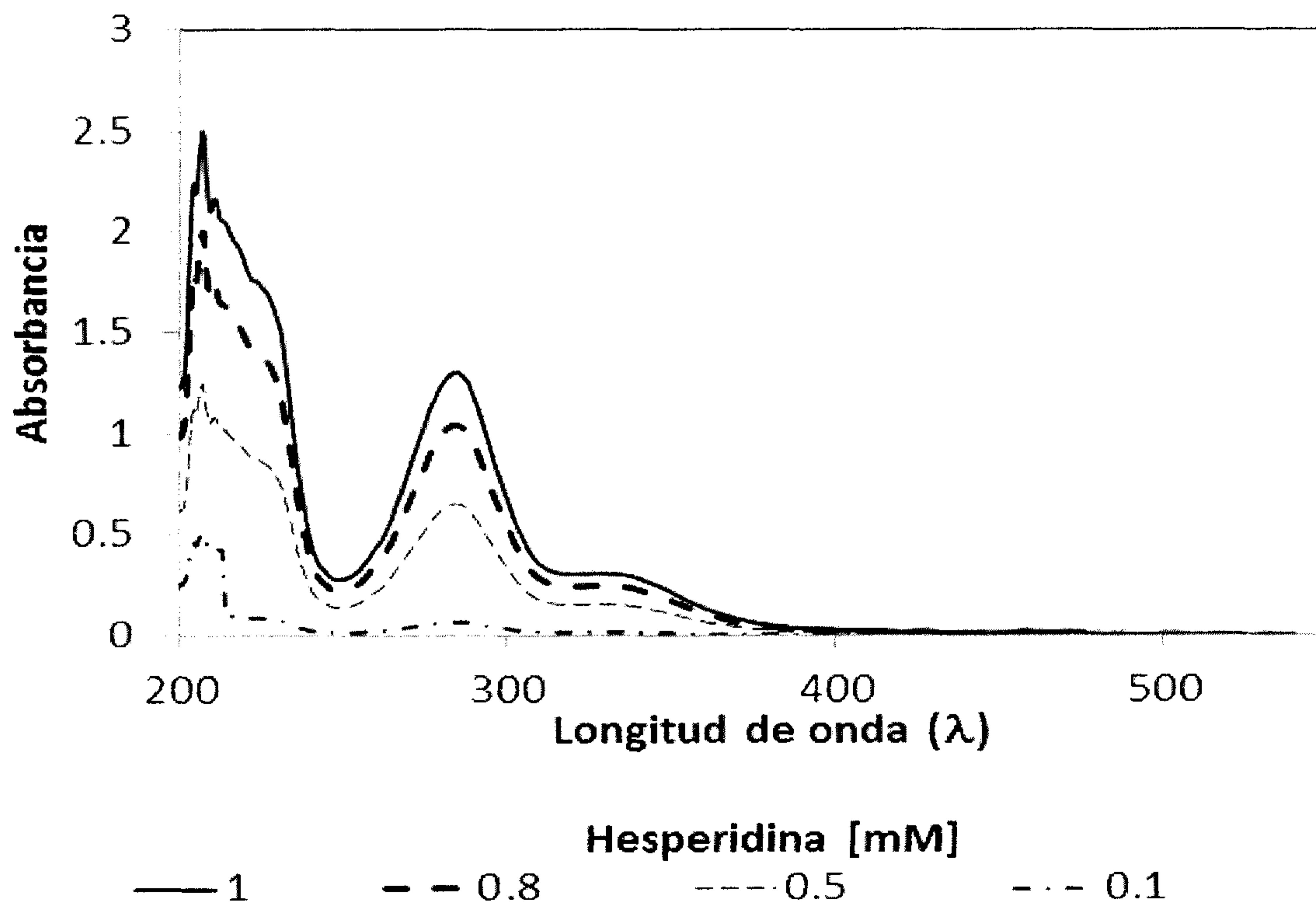
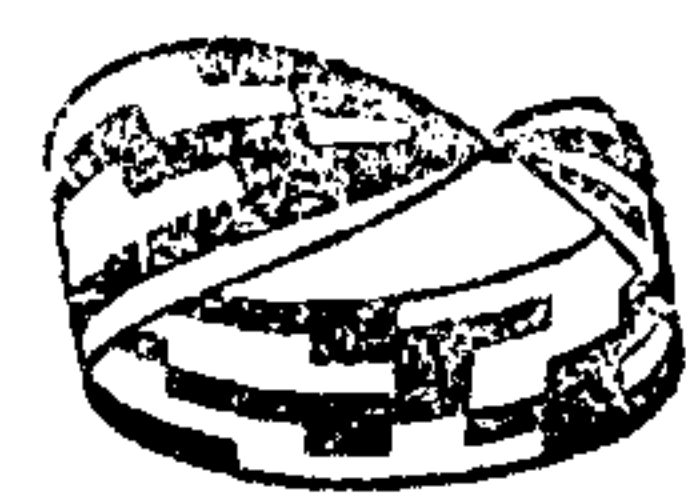


FIGURA 2



pieles de naranja →

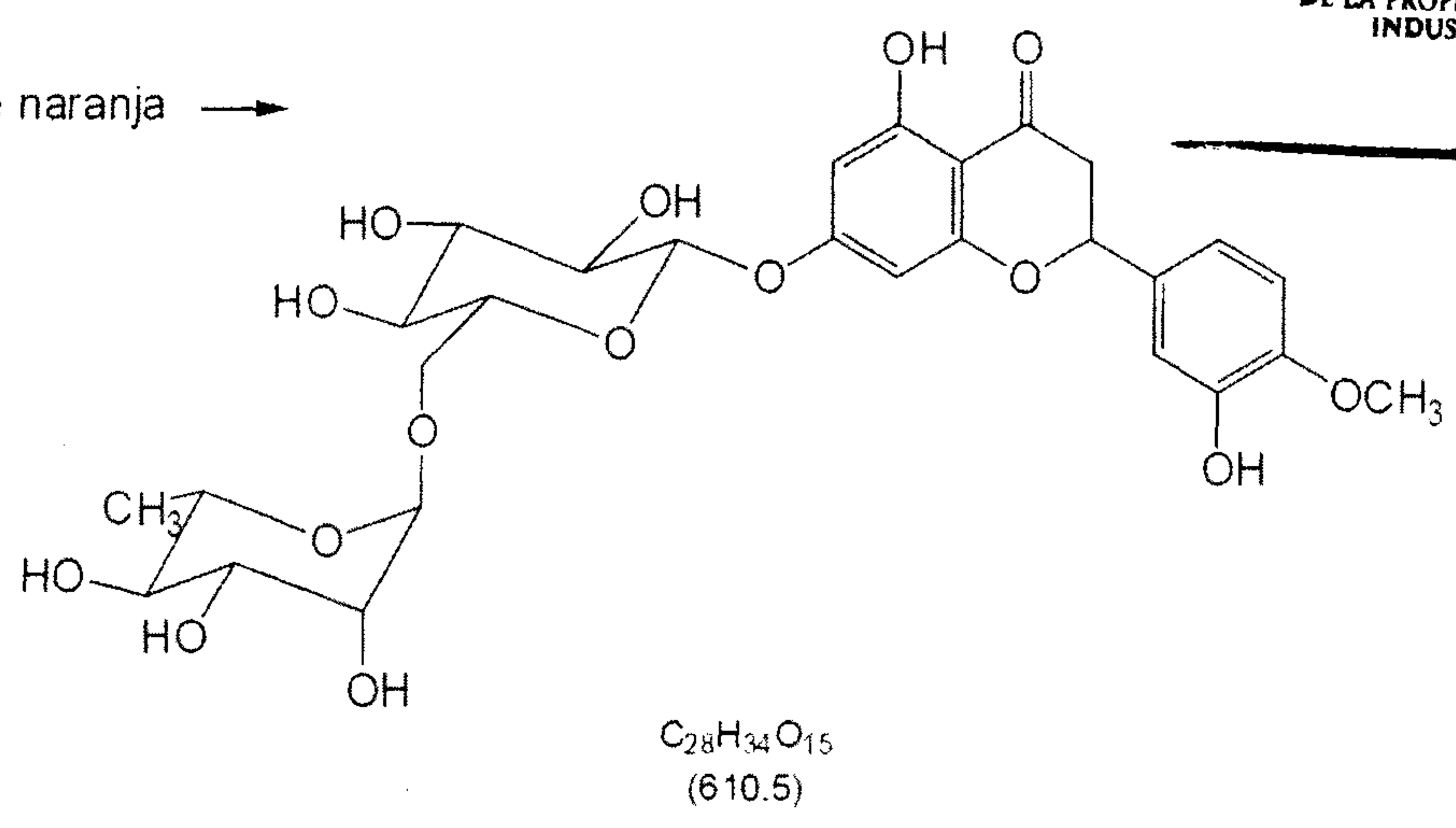


FIGURA 3

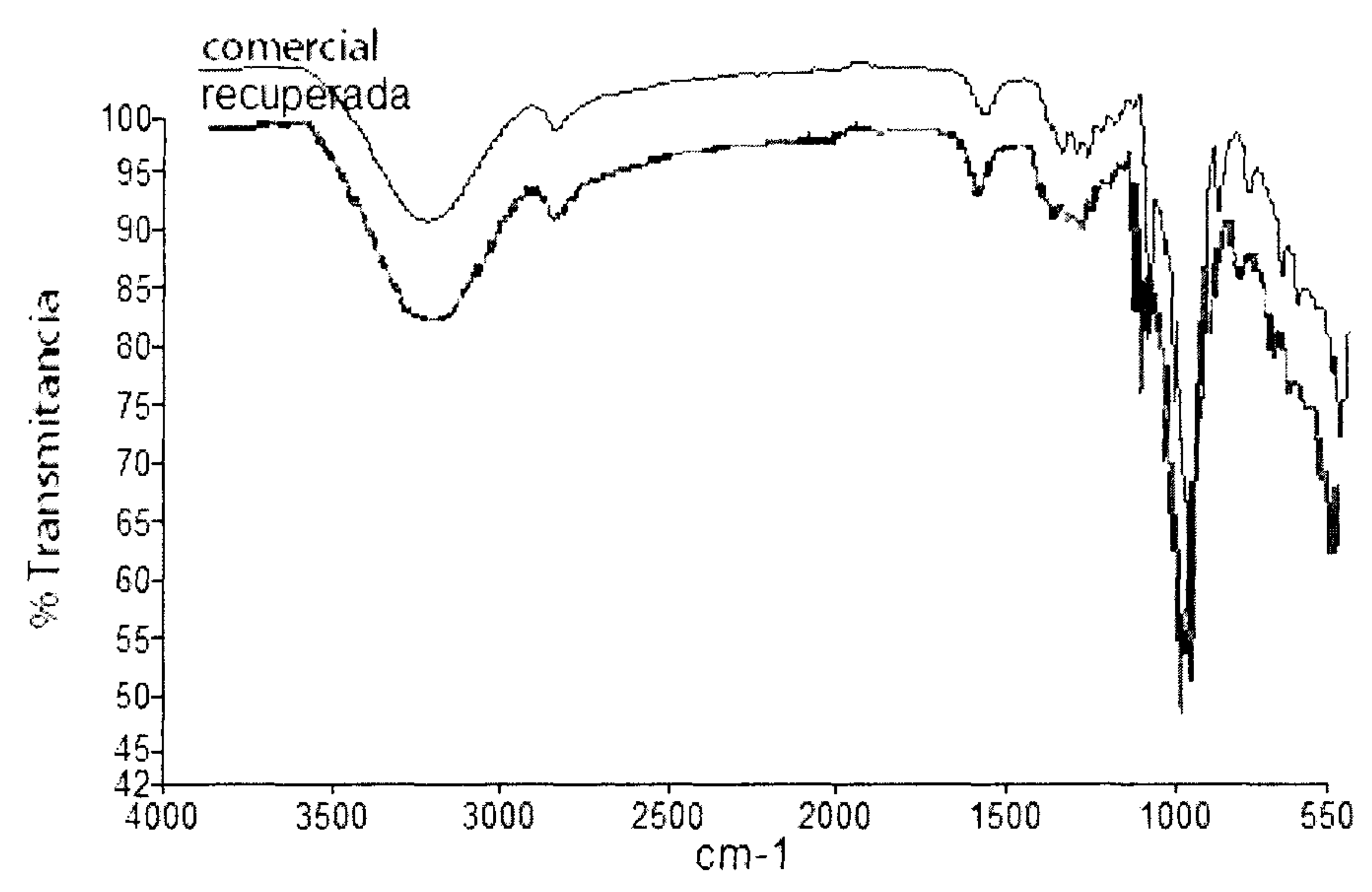


FIGURA 4

Hesperidina comercial

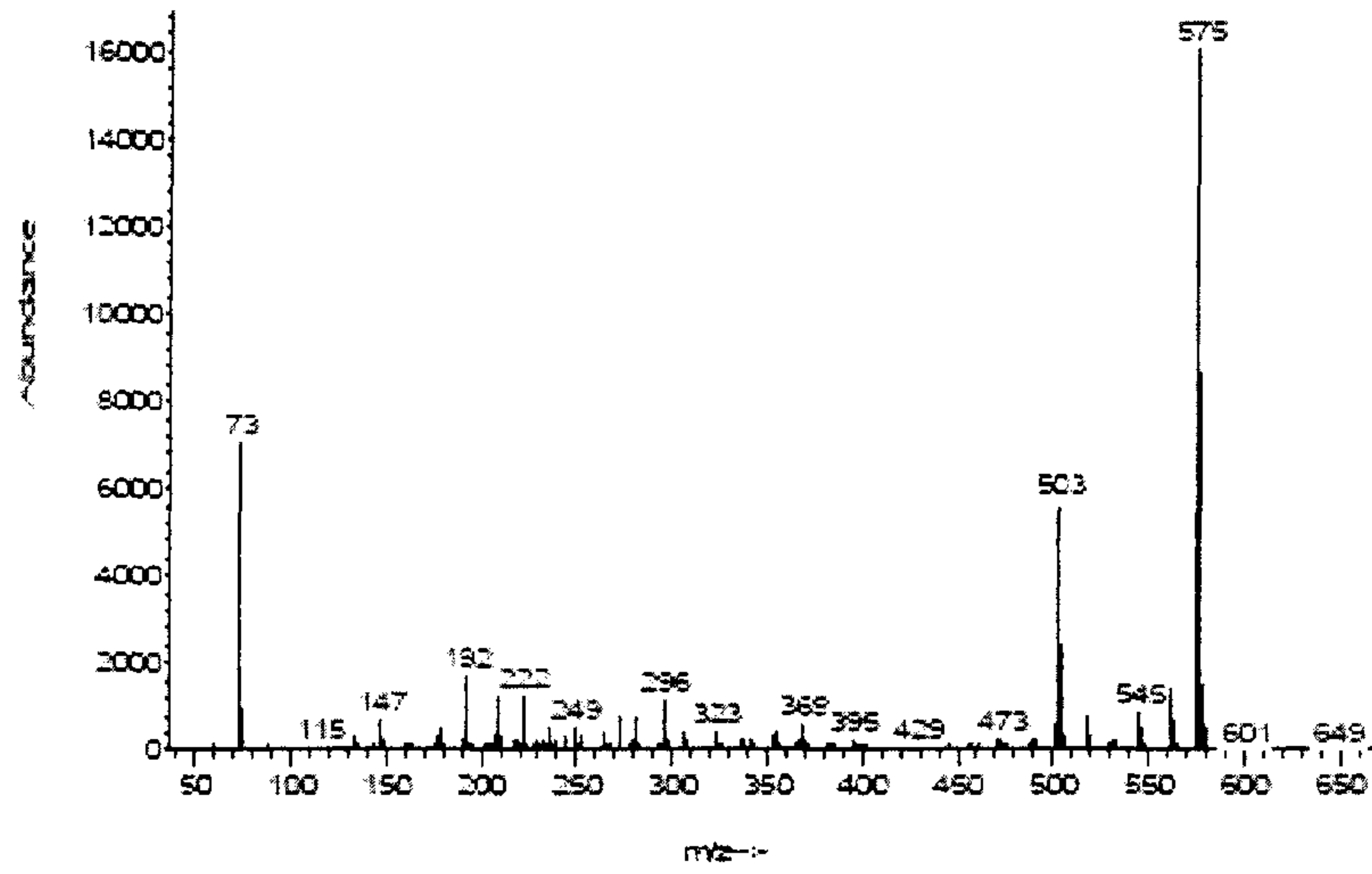


Figura 5A

Hesperidina obtenida de residuos de citricos

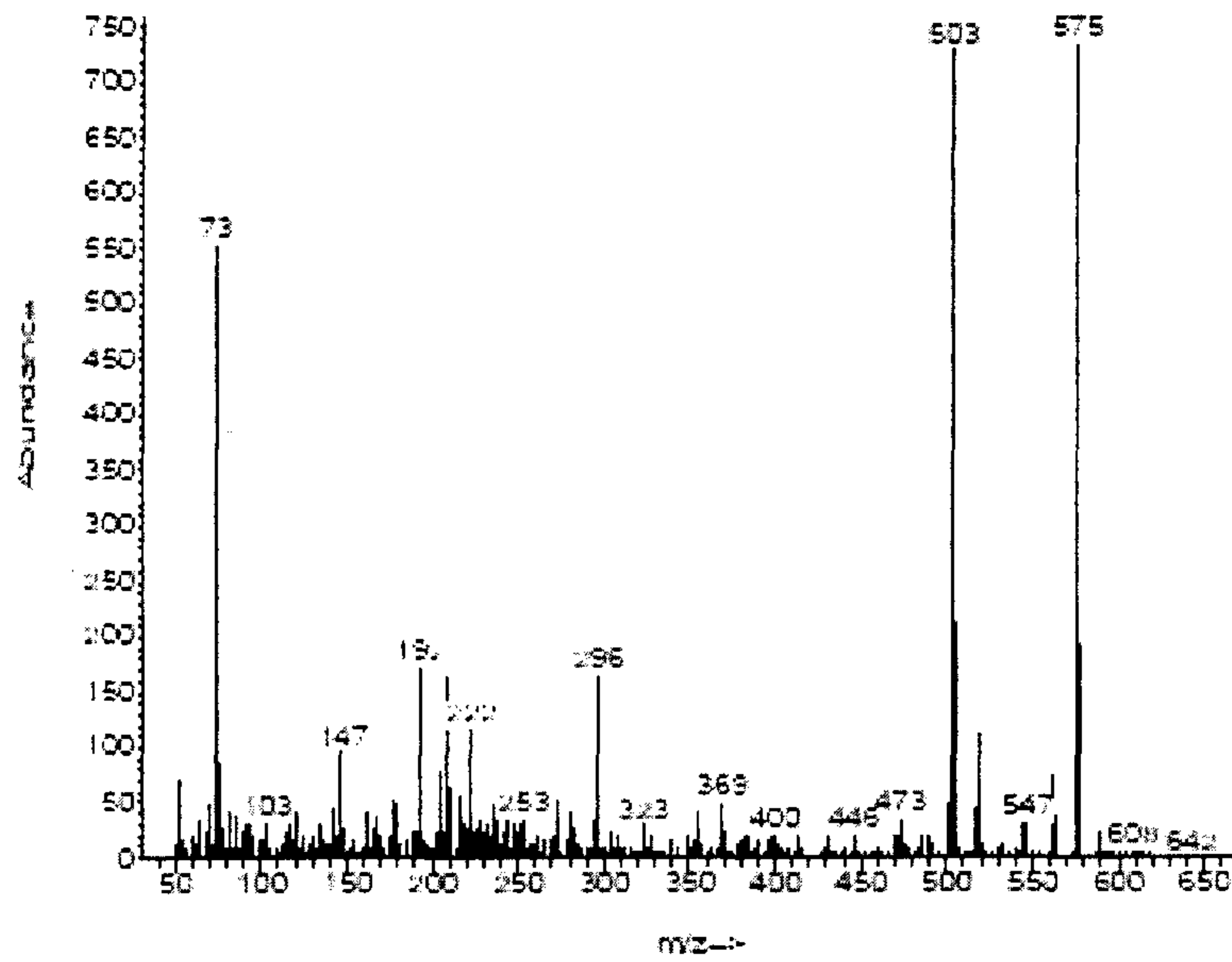


FIGURA 5B

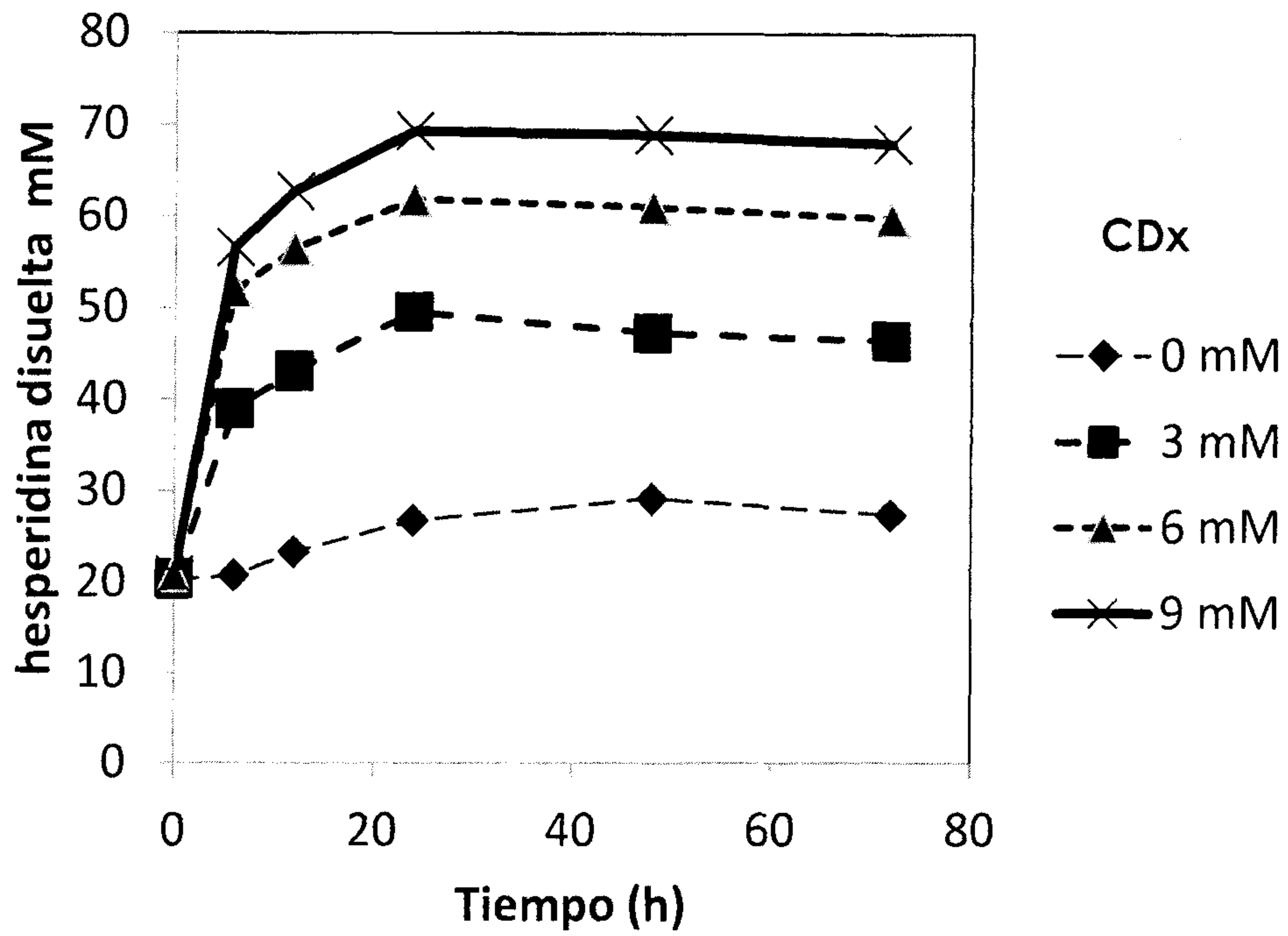
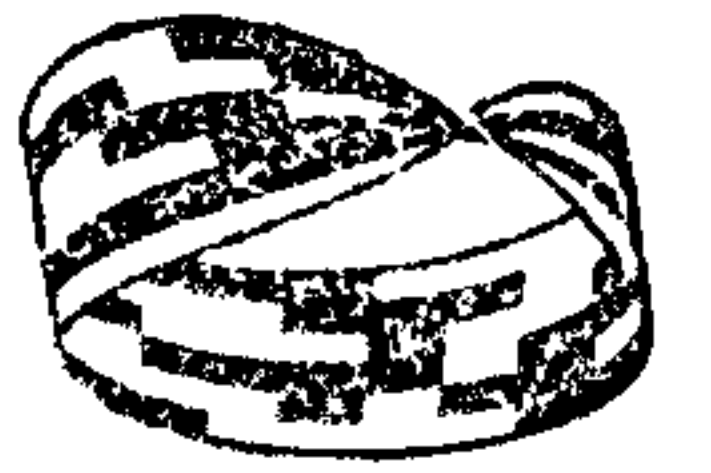


FIGURA 6

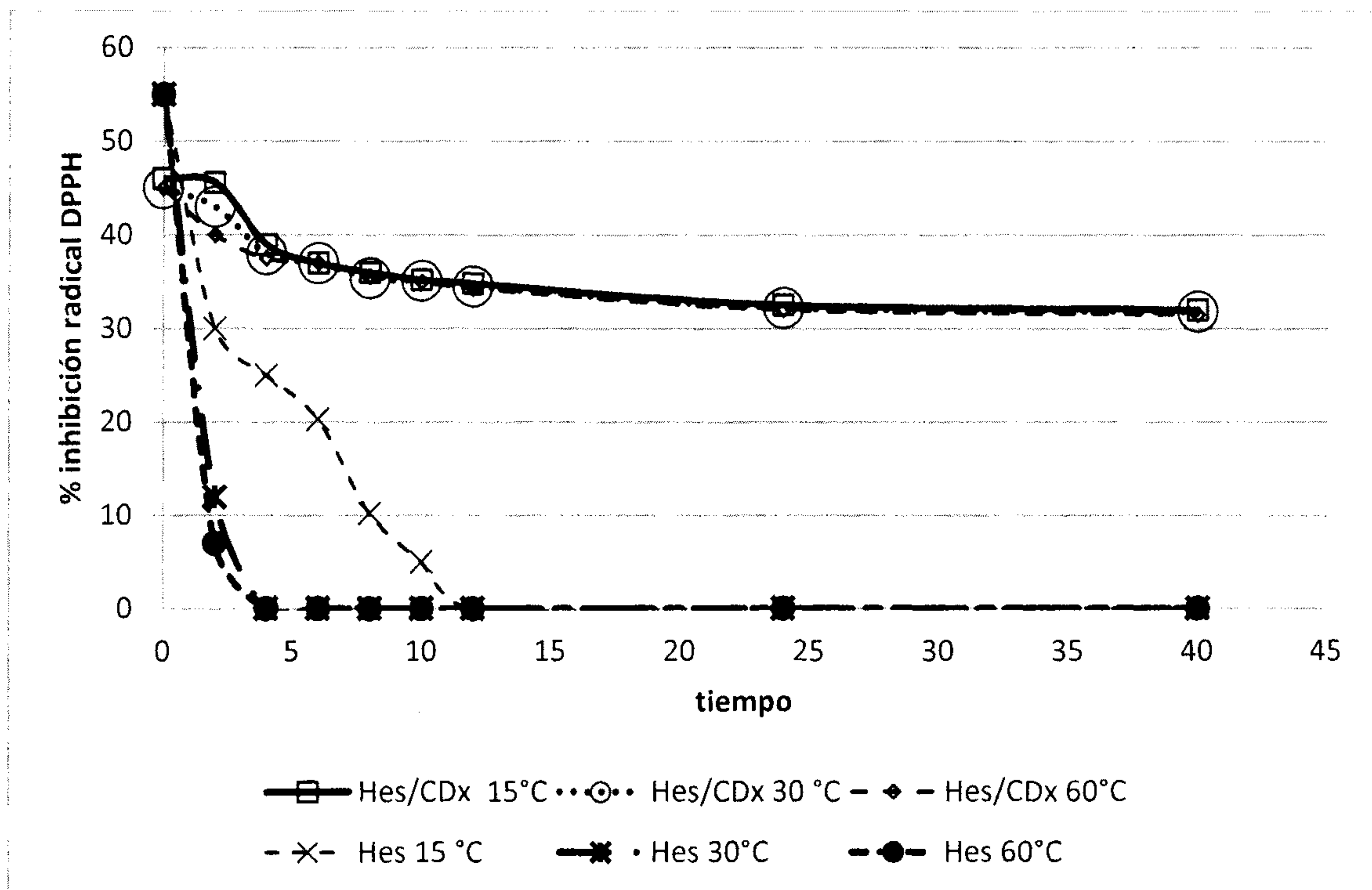


FIGURA 7

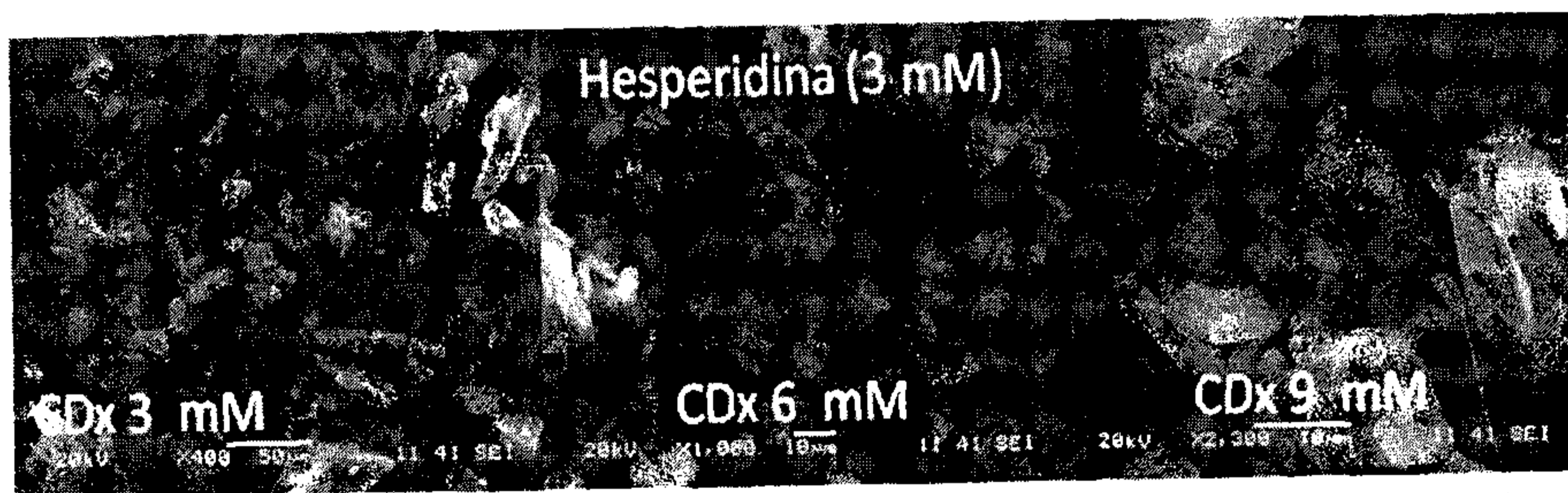
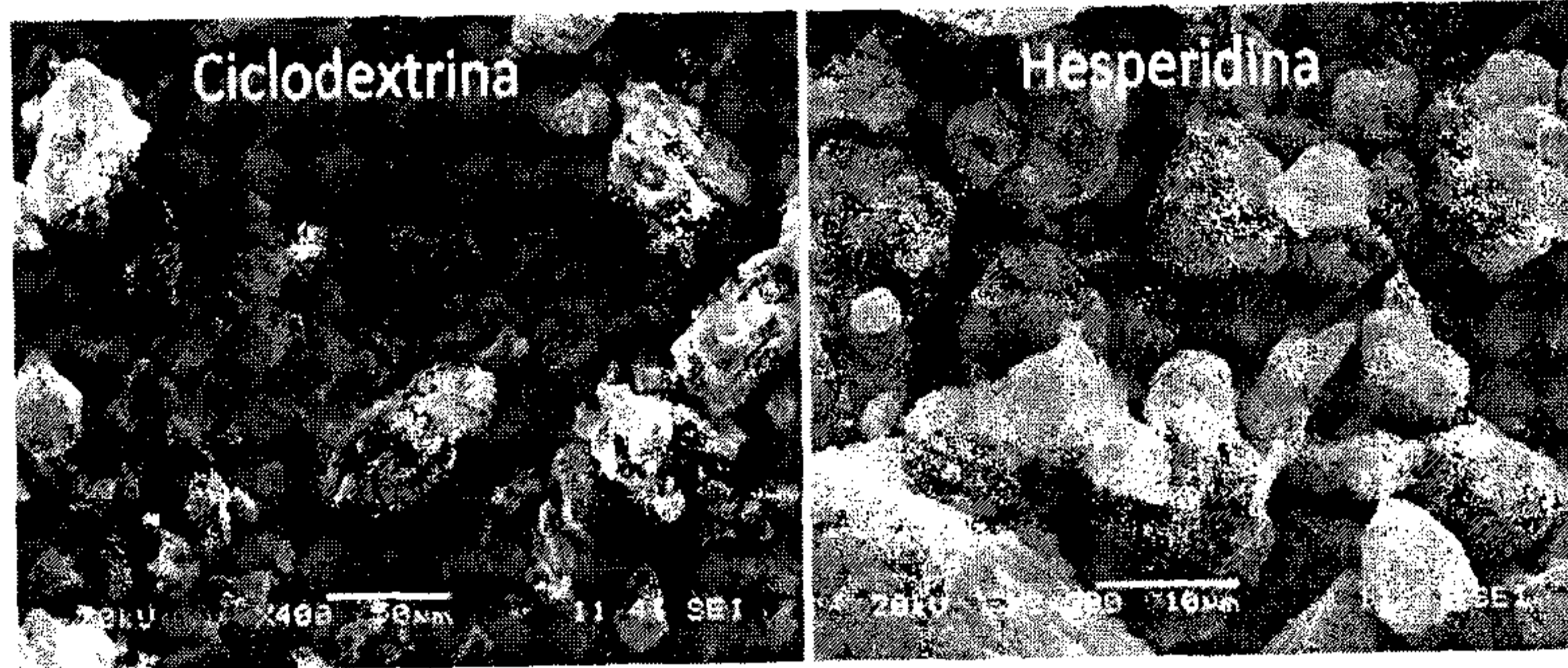


FIGURA 8