

**EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y VALORACIÓN DE GENIPINA A PARTIR  
DEL FRUTO DE LA GENIPA AMERICANA**

**GISELLE ALVAREZ OCHOA**

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
DEPARTAMENTO CIENCIAS QUÍMICAS  
SANTIAGO DE CALI  
2013**

**EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y VALORACIÓN DE GENIPINA A PARTIR  
DEL FRUTO DE LA GENIPA AMERICANA**

**GISELLE ALVAREZ OCHOA**

**Trabajo de grado para optar por el título de Químico Farmacéutico**

**TUTOR  
GUILLERMO LEÓN MONTOYA PELÁEZ Ph.D**

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
DEPARTAMENTO CIENCIAS QUÍMICAS  
SANTIAGO DE CALI  
2013**

## Tabla de contenido

RESUMEN DEL PROYECTO .....	8
ABSTRACT .....	9
1. INTRODUCCIÓN .....	10
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO .....	12
2.1 Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia: .....	12
2.2 Marco teórico y estado del arte .....	14
2.3 OBJETIVOS .....	19
2.3.1 Objetivo general.....	19
2.3.2 Objetivo Específicos .....	19
2.4 Metodología Propuesta .....	20
2.4.1 Extracción de la genipina .....	20
2.4.2 Caracterización de la genipina .....	20
2.4.3 Valoración de la genipina.....	20
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	22
2.5.2 Extracción de la genipina.....	24
2.5.3 Comparación de métodos.....	26
2.5.4 Caracterización de la genipina .....	29
2.5.5 Valoración de la genipina por UPLC.....	40

2.6	CONCLUSIONES .....	45
2.7	RECOMENDACIONES.....	46
3.	BIBLIOGRAFIA.....	47
	ANEXO .....	51

## Listado de figuras

Figura 1 Hidrólisis del geniposido a genipina por acción de la $\beta$ -glucosidasa inmovilizada. ....	14
Figura 2 Hidrolisis de la genipina .....	14
Figura 3 Reacción 1 .....	15
Figura 4. Reacción 2.....	15
Figura 5 Árbol de <i>Genipa americana</i> .....	16
Figura 6 Áreas de distribución natural de la <i>Genipa americana</i> .....	17
Figura 7 Fruto <i>Genipa americana</i> .....	17
Figura 8 Procedimiento de extracción de genipina a partir de <i>Gardenia jasminoides</i> . .....	27
Figura 9 Procedimiento propuesto de extracción de genipina a partir de <i>Genipa americana</i> .....	28
Figura 10 Cromatograma de la genipina. Pureza del pico .....	30
Figura 11 Espectro ultravioleta de la genipina .....	30
Figura 12 Espectro de masas de la genipina (modo positivo) .....	31
Figura 13 Espectro de masas de la genipina (modo negativo) .....	31
Figura 14 Espectro FTIR de la molécula extraída.....	32

Figura 15 Estructura química de la genipina con numeración. ....	33
Figura 16 Espectro de RMN DEPT-135 de la genipina.....	33
Figura 17 Espectro RMN 13C de la genipina. En color azul se muestra el desplazamiento químico de cada uno de las señales y en color verde la asignación de los carbonos a una señal .....	34
Figura 18 Espectro RMN 1H de la genipina. En color azul se muestra el desplazamiento químico de cada uno de las señales y en color magenta la multiplicidad de la señal.....	35
Figura 19 Espectro RMN 2D HSQC de la genipina .....	37
Figura 20 Espectro RMN 2D HMBC de la genipina .....	38
Figura 21 Espectro de RMN 2D COSY de la genipina.....	39
Figura 22 Espectro de RMN 2D NOESY de la genipina .....	39
Figura 23 Curva de calibración de la genipina.....	40
Figura 24 Cromatograma de la genipina a una concentración de 300 ppm.....	41
Figura 25 Cromatograma de la muestra 1 .....	44

## Lista de Tablas

Tabla 1. Principales características de la <i>Genipa americana</i>	17
Tabla 2. Condiciones de trabajo del UPLC	27
Tabla 3. Desplazamiento químico de las señales de carbono. RMN DEPT-135	32
Tabla 4. Desplazamiento químico de los carbonos. RMN 13C	33
Tabla 5. Parámetros obtenidos a partir del análisis del espectro RMN 1H de la genipina	34
Tabla 6. Correlación entre los carbonos y los hidrógenos presentes en la estructura de la genipina	35
Tabla 7. Condiciones de trabajo del UPLC para la realización de la valoración de la genipina.	38
Tabla 8. Recopilación de los datos obtenidos a partir del cromatograma de la genipina a una concentración de 300 ppm.	39
Tabla 9. Recopilación de los datos obtenidos a partir del cromatograma de la genipina a una concentración de 230 ppm.	40
Tabla 10. Recopilación de los datos obtenidos a partir del cromatograma de la genipina a una concentración de 150 ppm.	40
Tabla 11. Recopilación de los datos obtenidos a partir del cromatograma de la genipina a una concentración de 110 ppm.	40
Tabla 12. Recopilación de los datos obtenidos a partir del cromatograma de la genipina a una concentración de 60 ppm.	41
Tabla 13. Recopilación de los datos obtenidos a partir del cromatograma de la genipina a una concentración de 20 ppm.	41
Tabla 14. Concentración de genipina en las muestras de fruto	42

## RESUMEN DEL PROYECTO

Este trabajo explora la extracción eficiente de genipina de alta pureza a partir del fruto verde del árbol *Genipa americana* empleando un método de extracción sencillo y económico y la caracterización de la genipina obtenida mediante técnicas instrumentales. El árbol *Genipa americana*, es nativo de América Central y América del sur tropical, por lo que presenta un gran potencial de aprovechamiento en la industrialización de los frutos como alternativa para la extracción de la genipina.

Los frutos verdes de *Genipa americana* se recolectaron en la ciudad de Buga, Valle del Cauca, Colombia. Se seleccionó como método de extracción la extracción líquido-líquido asistida por ultrasonido, empleando como solvente acetato de etilo, la separación se realiza mediante cromatografía flash, la valoración de la genipina obtenida se realizó por Cromatografía Líquida de Ultra alta eficiencia (UPLC) con detector de matriz de fotodiodos (PDA) y su caracterización por las siguientes técnicas instrumentales: Espectrometría de Masas con Ionización por Electrospray (ESI-MS), Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), UPLC y Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) unidimensional y bidimensional.

A partir de los resultados obtenidos se encontró que empleando el método descrito se logró la extracción de genipina de alta pureza a partir del fruto de la *Genipa americana* con un porcentaje de rendimiento del 45%, el cual se encuentra cercano al rendimiento obtenido por métodos más costosos.

**PALABRAS CLAVES:** Extracción de genipina, genipina, propiedades farmacológicas genipina, mecanismo de entrecruzamiento genipina.

## ABSTRACT

This Project aims to explore an efficient extraction of high purity genipin from the green fruit of the tree *Genipa americana*, using a simple and inexpensive extraction method and the extracted genipin characterization through instrumental methods. *Genipa americana* tree, is native to Central America and northern South America, meaning a great potential for industry use of genipin fruits as an alternative of economical genipin extraction.

Green fruits of *Genipa Americana* were collected from Buga, Valle del Cauca, Colombia. It was selected the liquid-liquid extraction as the extraction method, using the solvent ethyl acetate assisted with ultrasound, the separation is done through flash chromatography, the extracted genipin assessment was executed by Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) with photodiode Array (PDA) and its characterization through the following instrumental techniques: Electrospray Ionization mass spectrometry (ESI-MS), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIS), UPLC and unidimensional and bidimensional Nuclear Magnetic Resonance (NMR).

It was found that using a simple and inexpensive method as the liquid-liquid extraction with ethyl acetate assisted with ultrasound and its separation through flash chromatography, it was achieved a high purity genipin extraction from the fruit of *Genipa Americana*, yielding 45.48%, a nearly value to more expensive methods.

**KEYWORDS:** Genipin extraction, genipin, pharmacological properties genipin, crosslinking mechanism genipin.

## 1. INTRODUCCIÓN

Colombia es uno de los países más biodiversos del mundo debido a la región del Chocó biogeográfico, conformada por los departamentos de Chocó, Cauca, Nariño y Valle del Cauca. Siendo este último departamento uno de los más competitivos del país por su estructura productiva e infraestructura.

Los estudios de competitividad demuestran que para un mejor aprovechamiento de las ventajas comparativas y competitivas de Colombia y el Valle del Cauca, es necesaria una modernización tecnológica a nivel industrial, que permita la conformación de clústeres y encadenamientos de productos altamente especializados que aprovechen la gran mayoría de los subproductos de la industria generen nuevos productos a partir de la utilización de la biodiversidad.

En Colombia y en el Valle del Cauca, se encuentra en forma silvestre el árbol cuyo nombre científico es *Genipa americana*, de la familia Rubiaceae, nativo de América Central y América del sur, que presenta un gran potencial de aprovechamiento en la industrialización de los frutos como alternativa para la extracción de la genipina, la cual posee numerosos efectos farmacológicos, se utiliza como agente entrecruzante en sistemas de liberación de fármacos y su industrialización está relacionada con el uso como colorante.

Sin embargo, la extracción comercial de la genipina es costosa y limita su aplicación a pesar de su potencial farmacológico, puesto que la genipina se obtiene comercialmente del fruto de la *Gardenia jasminoides* mediante la hidrólisis enzimática del genipósido en medio acuoso-orgánico, utilizando la enzima  $\beta$ -glucosidasa, la cual es costosa. Este método presenta baja productividad debido a que la genipina es inestable en medio acuoso y presenta una fuerte tendencia a reaccionar con aminas, aminoácidos y proteínas, por lo tanto las enzimas empleadas en la extracción tenderían a reaccionar con la genipina, aumentando de esa manera los costos de la operación.

La presente investigación realizada en las instalaciones del laboratorio de investigación de fitoquímica de la Universidad ICESI pretende contribuir al desarrollo tecnológico de la extracción eficiente y económica de la genipina con un alto grado de pureza, para posteriores aplicaciones e innovaciones en procesos y productos de la *Genipa americana* como cosmecéutico y farmacéutico, mediante el hallazgo de un método de extracción sencillo, económico y no dependiente de enzimas que posibilite una mayor utilización de la genipina, no solo como colorante sino también como un producto con propiedades farmacológicas.

Los resultados del presente trabajo tienen como propósito contribuir a la investigación estratégica de compuestos con características bioactivas, mediante el desarrollo de una serie de procedimientos que permitan extraer una molécula presente en un fruto de un árbol tropical, facilitando de esta manera el estudio de este compuesto y de sus potencialidades al encontrar un método directo sencillo y económico, para su extracción, este es el valor agregado y contribución del presente estudio a la estrategia nacional de conocimiento acerca de nuestros recursos biológicos.

## 2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

### 2.1 Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia:

La genipina es un compuesto de origen natural que se obtiene a partir del genipósido procedente del fruto de *Gardenia jasminoides* y del fruto de *Genipa americana*. Los frutos aún verdes brindan un color azul, el cual es utilizado para diversas finalidades. Esta propiedad ya era conocida por los indígenas que lo utilizaban para teñir tejidos, accesorios, cerámicas y para pintar el cuerpo en ceremonias religiosas y batallas. El poder colorante es debido a la presencia de un iridoide denominado genipina, que se presenta originalmente incolora pero se torna azul en contacto con grupos amino (Almeida, 2008).

Además posee propiedades farmacológicas como antiinflamatorio, diurético, coleretico y hemostático. La característica destacable de la genipina es su capacidad de reaccionar con aminos primarios, dando lugar a estructuras entrecruzadas químicamente, lo cual permite su utilización como agente entrecruzante en sistemas de liberación de fármacos tales como microcápsulas e hidrogeles. Entre los más estudiados están los hidrogeles de quitosano entrecruzados con genipina, Fwu-Long y colaboradores (2001) prepararon microesferas de quitosano por un método de dispersión de agua en aceite, utilizando genipina como agente entrecruzante. Yuan et al. (2007) obtuvieron microesferas de quitosano, albumina bovina y genipina.

La extracción comercial de genipina es costosa y limita su aplicación. En la actualidad, la genipina se obtiene comercialmente del fruto de la *Gardenia jasminoides* mediante la hidrólisis enzimática del genipósido que utiliza la enzima  $\beta$ -glucosidasa cuyo costo es de 198.0 dólares americanos por gramo (Sigma-Aldrich). Considerando que el fruto presenta un muy bajo contenido de genipina, por lo que en el mercado un gramo de genipina de la empresa Linchuan Zhixin Bio-Technology Company se cotiza a 14 dólares americanos y 25 mg de genipina de la empresa Sigma Aldrich tiene un precio de 94.30 dólares americanos.

Es necesario tener en cuenta que la *Gardenia jasminoides* es un arbusto perteneciente a la familia de las Rubiaceas, originario de Asia central y de África tropical (InfoAgro), que se cultiva como planta ornamental, la cual puede adaptarse a otras regiones presentando graves problemas de plagas y enfermedades, lo que encarece aún más la obtención de genipina a partir de esta planta en países diferentes al lugar de origen.

En Colombia, un país de gran biodiversidad, se encuentra en forma silvestre el árbol cuyo nombre científico es *Genipa americana*, perteneciente a la familia Rubiaceae, nativo de América Central y América del sur, que presenta un gran potencial de

aprovechamiento en la industrialización de los frutos como alternativa para la extracción de la genipina (Francis, 1993).

Es necesario encontrar un método de extracción de genipina preferiblemente no dependiente de enzimas a partir de *Genipa americana* sencillo y a menor costo, que posibilite una mayor utilización de la genipina, no solo como colorante sino también investigando sus potenciales propiedades farmacológicas. Igualmente presenta importancia como agente entrecruzante. (BYUNG-CHUL, y otros, 2005)

## 2.2 Marco teórico y estado del arte

En 1973 Endo y Taguchi reportaron la preparación de genipina basándose en varios pasos. Se inicia con la extracción del genipósido a partir del polvo pulverizado del fruto de gardenia con cloroformo y metanol. Posteriormente, se realiza un fraccionamiento cromatográfico y recristalización en acetona, obteniéndose el genipósido puro. Finalmente, el genipósido se hidroliza por acción de la  $\beta$ -glucosidasa para dar la genipina. Más tarde, el aislamiento del genipósido se realizó empleando diferentes solventes orgánicos y, extracción por reflujo y por ultrasonido. En cuanto a la transformación del genipósido en genipina se emplean otras enzimas hidrolíticas como la isolasa,  $\alpha$ -glucosidasa y amilasa. Todos los métodos se basan en la extracción y purificación del genipósido y luego la hidrólisis de este para obtener la genipina (Weerapath, Praneet, Tanasait, & Theerasak, 2013).

La genipina se obtiene comercialmente del fruto de la *Gardenia jasminoides* mediante la hidrólisis del genipósido por acción de una enzima hidrolítica como la  $\beta$ -glucosidasa (figura 1), la cual se efectúa en medio acuoso-orgánico, pero la genipina es inestable en agua, motivo por el cual la hidrólisis en medio acuoso (figura 2) reduce el rendimiento en la producción de genipina. La genipina producida puede ser extraída en la fase orgánica durante la reacción, no obstante, el disolvente orgánico puede destruir la enzima (Yi-Shun Yang, 2011).

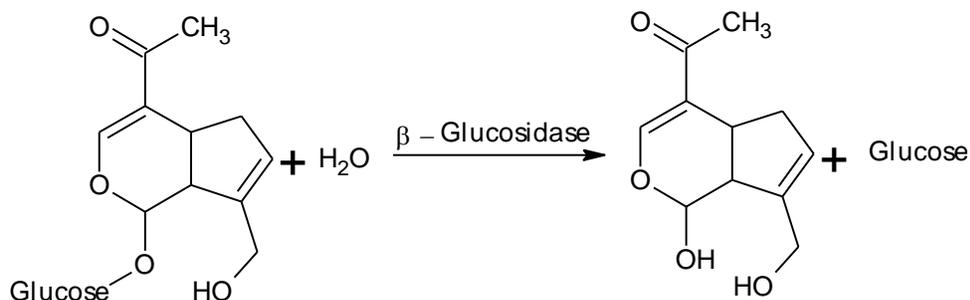


Figura 1 Hidrólisis del genipósido a genipina por acción de la  $\beta$ -glucosidasa inmovilizada.

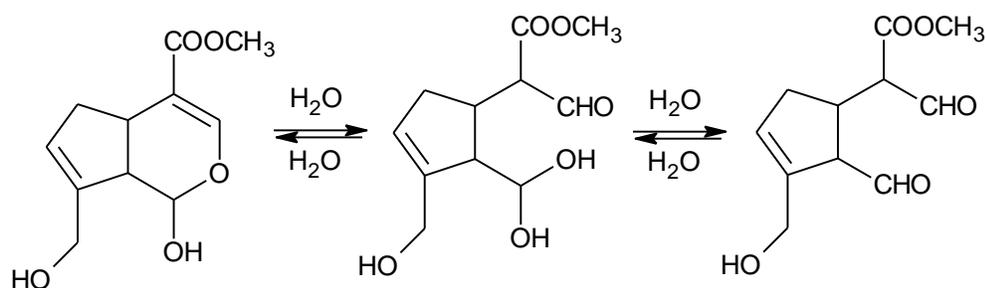


Figura 2 Hidrólisis de la genipina

La genipina presenta una fuerte tendencia a establecer enlaces cruzados con aminas, aminoácidos y proteínas, por lo tanto las enzimas usadas en la extracción tienen tendencia a reaccionar con la genipina, aumentando de esa manera los costos de la operación.

Se cree que la reacción de entrecruzamiento entre la genipina y los materiales que contienen grupos amino involucra dos etapas, las cuales se dan en distintos lugares de la molécula de genipina.

La reacción 1 (figura 3) es una sustitución nucleofílica (SN2) que involucra la sustitución del grupo éster de la molécula de genipina por una amina primaria generando una amida, liberando metanol.

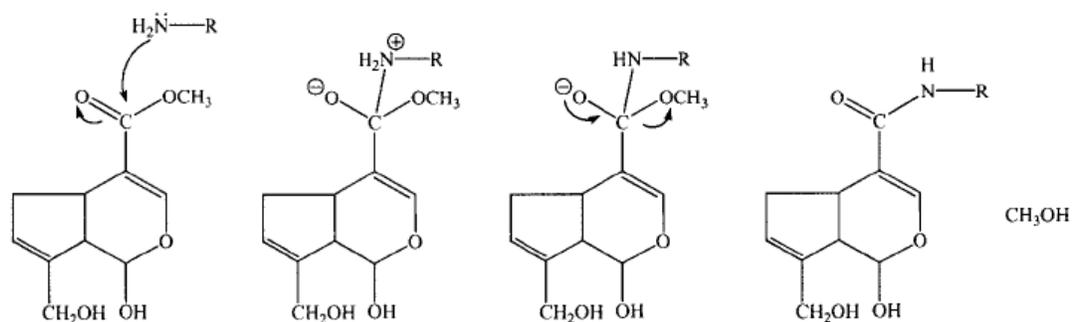


Figura 3 Reacción 1

Al mismo tiempo en que ocurre la sustitución del éster se da la reacción 2 (figura 4). Esta reacción comienza con un ataque nucleofílico de la amina primaria al carbono 3 de la genipina para formar un intermediario. Seguido de la apertura del anillo dihidropirano se tiene el ataque de la amina secundaria formada en el primer paso de la reacción sobre el grupo aldehído resultante. (Michael F. Butler, 2003)

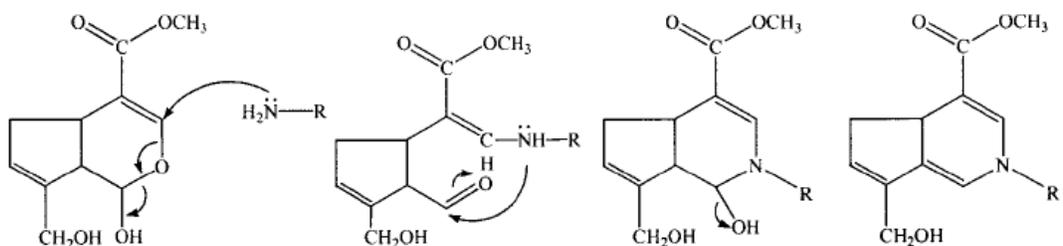


Figura 4. Reacción 2

Danielle de Almeida y col. ya estudiaron la posibilidad de usar ultrasonido y extracción por soxhlet del fruto de la *G. americana*, obteniendo rendimientos de hasta el 51%, comparado con el rendimiento de cerca del 48% reportado por Yang

y colaboradores usando la hidrólisis enzimática. Ambos grupos emplearon metanol y fases acuosas en sus procedimientos de extracción.

Es evidente que se requiere de un método de extracción directa, preferiblemente no dependiente de enzimas y de ser posible evitando la hidrólisis de la genipina, con alto rendimiento y pureza.

En Colombia se encuentra la *Genipa americana* (figura 5) en forma silvestre.



Figura 5 Árbol de *Genipa americana*

Tabla 1 Principales características de la *Genipa americana*

<b>Clasificación taxonómica (Linnaeus)</b>	Familia: Rubiaceae Género: <i>Genipa</i> . Especie <i>G. americana</i> .
<b>Nombre común</b>	Jagua o Huito
<b>Áreas de distribución natural</b>	<p>Ampliamente distribuida en América Central y América del Sur tropical. En Colombia se encuentra en todo el territorio.</p>  <p>Figura 6 Áreas de distribución natural de la <i>Genipa americana</i></p>
<b>Etimología: <i>Genipa</i></b>	<p>Derivado de <i>tupi-guarani</i> que significa mancha oscura o fruto que sirve para pintar; americana: procedente de América.</p>  <p>Figura 7 Fruto <i>Genipa americana</i></p>
<b>Datos fenológicos</b>	Florece desde octubre hasta diciembre; frutos maduros en febrero y marzo (Francis, 1993)
<b>Fruto:</b>	El fruto de este árbol, de 10 cm de largo y 7 cm de diámetro
<b>Usos:</b>	<p>En Colombia se emplea como árbol maderable, su fruto se utiliza como colorante por las comunidades del Pacífico especialmente los pueblos indígenas (Chalá, y otros, 2003)</p> <p>se ha encontrado que la mejor aplicación industrial de esos frutos es la extracción de sustancias farmacológicamente activas presentes en ellos, como la genipina cuyo nombre IUPAC es (1<i>R</i>,2<i>R</i>,6<i>S</i>)-2-Hidroxi-9-(hidroximetil)-3-oxabicyclo[4.3.0]nona-4,8-dieno-5-carboxilato de metilo, pero solo se aprovecha su capacidad como colorante (Rodrigues, 2008)</p>

### *Estudios químicos en la especie Genipa americana:*

La *Genipa americana* es químicamente caracterizada por la presencia de iridoïdes. La genipina fue el primer iridoïde aislado de frutos de la especie en el Brasil (Djerassi, 1960) y su estructura fue elucidada en el año siguiente (Djerassi, 1961).

Se ha reportado recientemente que la genipina posee numerosos efectos farmacológicos: hepatoprotector (Seok-Joo, Joon-Ki, Dong-Ung, Jong-Hwan, & Sun-Mee, 2010), colerético (Shoda, y otros, 2004), antiinflamatorio (Guang-fa, y otros, 2009), anticanceroso (Cao, y otros, 2010), antitrombótico (Suzuki, Kondo, Ikeda, & Umemura, 2001), antibacterial (Lelono, Tachibana, & Itoh, 2009), antidiabético (C.Y. Zhang, 2006), disminuye el riesgo de gastritis y revierte lesiones gástricas (Lee, Lee, & Jeong, 2009), neuroprotector (M. Yamazaki, 2009) y antidepresivo (Jun-Sheng, y otros, 2004). Además, ha sido usada como agente entrecruzante natural con baja citotoxicidad para polímeros como la gelatina y el quitosano en aplicaciones como la ingeniería de tejidos (Melika, Fathollah, & Masoud, 2013), hidrogeles (Muzzarelli, 2009) y ensayos colorimétricos de aminoácidos (Sang-Won, Jong-Min, Seong-Hee, Young-Sook, & Tae-Ryong, 2003).

La industrialización de la *Genipa americana* está relacionada con el uso como colorante, lo cual se evidencia en las patentes: en el año 1996 se patentó en Japón un producto obtenido del jugo de este fruto para teñir el cabello, en el año 2005 en Brasil se patentó un método para el uso del jugo de *Genipa americana* en tatuajes corporales no permanentes (Almeida, 2008) y en el año 2011 la empresa colombiana Ecoflora S.A patentó un método para la fabricación de un colorante azul como líquido o como sólido, este colorante es derivado del jugo obtenido de la pulpa de fruta de la *Genipa americana*. (Estados Unidos Patente nº 7927637, 2011)

## **2.3 OBJETIVOS**

### **2.3.1 Objetivo general**

Avanzar en el desarrollo tecnológico de la extracción eficiente y económica de la genipina con un alto grado de pureza, para posteriores aplicaciones industriales.

### **2.3.2 Objetivo Específicos**

1. Extraer la genipina a partir del fruto de *Genipa americana* empleando un método de extracción sencillo y económico.
2. Caracterizar la genipina obtenida mediante técnicas instrumentales.
3. Valorar por Cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia (UPLC) la genipina extraída.

## **2.4 Metodología Propuesta**

Este proyecto se realizó en las instalaciones del laboratorio de investigación de fitoquímica de la Universidad Icesi.

### **2.4.1 Extracción de la genipina**

Se recolectaron los frutos verdes de *Genipa americana* en la ciudad de Buga, Valle del Cauca, Colombia. Primero se hizo el tratamiento del fruto, el cual consistió en la preparación de un jugo en acetato de etilo (aproximadamente 900 mL por 400 gramos de pulpa). Luego se realizó la extracción líquido-líquido al colocar el jugo obtenido en el equipo de ultrasonido durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, el extracto se filtró a gravedad y el filtrado se secó por rota-evaporación.

La separación de los diferentes componentes del extracto se hizo por cromatografía en columna flash. Para la elución de los componentes se utilizaron 7 sistemas de solventes (aproximadamente 200 mL de cada sistema): 1. Diclorometano, 2. Diclorometano-acetato de etilo 9:1; 3. Diclorometano-acetato de etilo 7:3; 4. Diclorometano-acetato de etilo 6:4; 5. Diclorometano-acetato de etilo 7:3; 6. Acetato de etilo y 7 Metanol. Se recolectaron las fracciones eluidas y se secaron empleando el sistema Rapidvap. A continuación, se realizó cromatografía planar de las fracciones empleando fase móvil diclorometano-acetato de etilo 1:1 y como revelador el 2-aminodifenilborinato.

Se juntaron las fracciones en las cuales se encontró una banda azul oscuro en las placas cromatográficas después de ser reveladas, lo cual es positivo para genipina. Se obtuvo un rendimiento del 45,49%.

### **2.4.2 Caracterización de la genipina**

La genipina extraída se caracterizó mediante Espectrometría de Masas con ionización por Electro spray (ESI-MS), Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) empleando un equipo *Shimadzu FTIR Affinity*, Cromatografía Líquida de Ultra-alta eficiencia (UPLC) con detección Ultravioleta de marca *WATERS ACQUITY H-CLASS* y Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) unidimensional y bidimensional empleando un equipo *Bruker Avance II 400 MHz*.

### **2.4.3 Valoración de la genipina.**

#### *Curva de calibración*

Se realizó una curva de calibración de genipina, para esto se preparó una solución stock de 1mg/mL (1000 ppm) en metanol y a partir de esta solución se hicieron 6 diluciones de las siguientes concentraciones: 300 ppm, 230 ppm, 150 ppm, 110 ppm, 60 ppm y 20 ppm. La curva se hizo por duplicado.

### *Obtención de muestras*

Se dividió el fruto en cinco partes de un tamaño de 2x2 cm de la *Genipa americana* y de cada fracción se pesaron 500mg que fueron licuados con 10 mL de agua tipo I empleando un homogeneizador para cada una de las muestras. Posteriormente, se realizó una extracción líquido-líquido con acetato de etilo, asistida por ultrasonido durante 5 minutos, este proceso fue realizado por duplicado con el propósito de tener mayores rendimientos en la extracción.

Se recogió la fase orgánica de la extracción líquido-líquido para concentrarla en el rotoevaporador, el sólido obtenido se solubilizo con 1 mL de metanol grado HPLC. De la solución metanólica anterior se tomaron 200  $\mu$ L y se llevaron a 1000  $\mu$ L con metanol, en seguida, se filtró utilizando un filtro de nylon de 0.22  $\mu$ m.

Finalmente, se realizó el corrido de las 5 muestras y se determinó la concentración de cada una de ellas por medio de la curva de calibración obtenida previamente.

## 2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.5.1 Matriz de marco lógico

<b>Objetivo General:</b> Avanzar en el desarrollo tecnológico de la extracción eficiente y económica de la genipina con un alto grado de pureza, para posteriores aplicaciones industriales			
<b>Objetivos Específicos</b>	<b>Actividad</b>	<b>Indicadores</b>	<b>Supuestos</b>
Extraer la genipina a partir del fruto de <i>Genipa americana</i> empleando un método de extracción sencillo y económico.	Determinar los elementos necesarios para la realización del método de extracción.	Encontrar los elementos necesarios para realizar la extracción.	La columna cromatografía, los solventes, la bomba de vacío y el ultrasonido se encuentran disponibles.
	Determinar el mejor solvente para la extracción liquido-liquido.	Se estableció el mejor solvente para la extracción liquido-liquido	El solvente se encuentra disponible
	Determinar la mejor serie de solventes para realizar la separación empleando cromatografía en columna.	Se estableció la mejor serie de solventes para realizar la separación empleando cromatografía en columna.	Los solventes necesarios para la separación en columna se encuentran disponibles.

	Verificar la presencia de la genipina realizando una lectura en un espectrómetro ultravioleta-visible.	Encontrar el máximo de absorción característico de la genipina	El equipo se encuentra disponible.
Caracterizar la genipina obtenida mediante técnicas instrumentales	Analizar por Infrarrojo (IR)	Encontrar las bandas de absorción características de los grupos funcionales presentes en la genipina	El equipo se encuentra disponible.
	Analizar por espectrometría de masas	El peso molecular obtenido corresponde al peso molecular teórico de la genipina.  Las fragmentaciones obtenidas corresponden a la estructura de la genipina	El análisis por esta técnica instrumental se puede realizar en la Universidad de Antioquia.

	Analizar por Resonancia Magnética Nuclear unidimensional y bidimensional	La estructura del compuesto obtenido, dilucidada a partir de esta técnica instrumental coincide con la estructura de la genipina	El análisis por esta técnica instrumental se puede realizar en la Universidad del Valle
	Analizar la pureza del compuesto obtenido por UPLC	El pico detectado a la longitud de onda característica no presenta impurezas.	El equipo se encuentra disponible
Valorar por UPLC de la genipina extraída.	Determinar los parámetros de flujo y temperatura que se deben introducir en el software del equipo UPLC para realizar un corrido óptimo.	Se lograron establecer los parámetros de flujo y temperatura óptimos.	El equipo UPLC se encuentra disponible y funciona correctamente.

### 2.5.2 Extracción de la genipina.

Se tomaron frutos verdes y maduros de *Genipa americana*, los cuales se secaron en un horno a una temperatura de 45°C. Los frutos secos fueron sometidos a una extracción por Soxhlet empleando como solvente metanol. Asimismo, se realizó la extracción utilizando frutos frescos.

La separación cromatográfica se realizó empleando como eluyente diclorometano:acetato de etilo en diferentes proporciones (1:1, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4) y como revelador 2-aminoetil-difenilborinato, el cual al poseer un grupo amino forma

un pigmento azul al reaccionar con la genipina. Se obtuvo que el mejor sistema eluyente es diclorometano:acetato de etilo 1:1.

Para determinar si se empleaban los frutos frescos o los frutos maduros se hizo una extracción soxhlet con metanol a los frutos verdes y a los frutos maduros y una separación por cromatografía de capa fina. A partir de los resultados obtenidos por cromatografía planar se observó que hay una mayor extracción de genipina (banda más ancha) en los frutos verdes y frescos. Además, al partir los frutos maduros, estos presentaban una coloración azul en su interior, lo cual indicó que parte de la genipina presente se había entrecruzado y por lo tanto, el rendimiento de extracción sería menor.

La extracción soxhlet sirvió como preliminar para conocer cuales frutos serían empleados para la extracción. Ahora el siguiente parámetro a determinar era cual método de extracción sería más eficiente. Se probaron 3 métodos: extracción soxhlet, extracción asistida por ultrasonido y extracción líquido-líquido.

Se realizó cromatografía planar del extracto obtenido por cada método, y los resultados obtenidos permitieron concluir que la extracción líquido-líquido era el método más eficiente de los empleados.

Una vez se determinó el método más eficiente, se realizaron los estudios pertinentes para escoger el mejor solvente. Se preparó jugo de genipa y teniendo en cuenta que la genipina es polar se realizaron extracciones líquido-líquido con solventes y sistemas de solventes de polaridad media (diclorometano, diclorometano:acetato de etilo, acetato de etilo. Se debe resaltar que no se empleó metanol para evitar la extracción de otras moléculas polares, como por ejemplo azúcares.

Los resultados de cromatografía planar de los extractos orgánicos obtenidos indicaron que el acetato de etilo es el mejor solvente para realizar la extracción líquido-líquido.

La separación de la genipina de otros compuestos químicamente similares se realizó por cromatografía flash. El sistema y el orden de los eluentes se indican a continuación:

1. Diclorometano
2. Diclorometano:acetato de etilo 9:1,
3. Diclorometano:acetato de etilo 7:3,
4. Diclorometano:acetato de etilo 6:4;
5. Diclorometano:acetato de etilo 3:7,
6. Acetato de etilo
7. Metanol.

Se hizo un barrido de polaridad, partiendo de un sistema medianamente polar y terminando en un solvente bastante polar.

Las fracciones eluidas fueron recogidas en tubos de ensayos. A continuación, se analizó cada una de las fracciones y se reunieron las fracciones en las cuales aparecía la banda para la genipina, se rotaevaporaron y finalmente se obtuvo un sólido blanco.

Con el fin de evitar la hidrólisis de la genipina, se modificó el método, preparando el jugo de genipina en acetato de etilo y no en agua. El sólido obtenido por este método modificado, se caracterizó para confirmar que efectivamente correspondía a la genipina.

### **2.5.3 Comparación de métodos**

Para poder determinar la eficiencia y menor costo del método propuesto, se procedió a comparar los rendimientos y los procedimientos de extracción de genipina de forma cualitativa.

Danielle de Almeida y col. obtuvieron rendimientos de hasta el 51% empleando *Genipa americana*, comparado con el rendimiento de cerca del 48% reportado por Yang y col. usando la hidrólisis enzimática.

En cuanto a la comparación del método propuesto con los métodos químicos reportados, se tiene un menor porcentaje de rendimiento con el primero. No obstante, los métodos químicos emplean generalmente extracción soxhlet, la cual acarrea mayor tiempo y mayor consumo energético y no se tienen reportes en la literatura de la calidad de la genipina extraída.

En la metodología propuesta (ver figura 9) en el presente trabajo se obtuvo un rendimiento del 45%, el cual es ligeramente menor que el obtenido por métodos enzimáticos. Sin embargo, el hecho de que el método implique una extracción directa (ver figura 8), es decir, ahorre el paso de extraer el genipósido y luego su hidrólisis, de esta manera no se requiere el empleo de enzimas ni de equipos costosos, lo convierte en un método eficiente, sencillo y económico. A pesar que la extracción se realiza con solvente orgánicos, los mismos pueden ser recuperados y ser utilizados nuevamente, de esta manera se logra disminuir costos y el posible impacto ambiental.

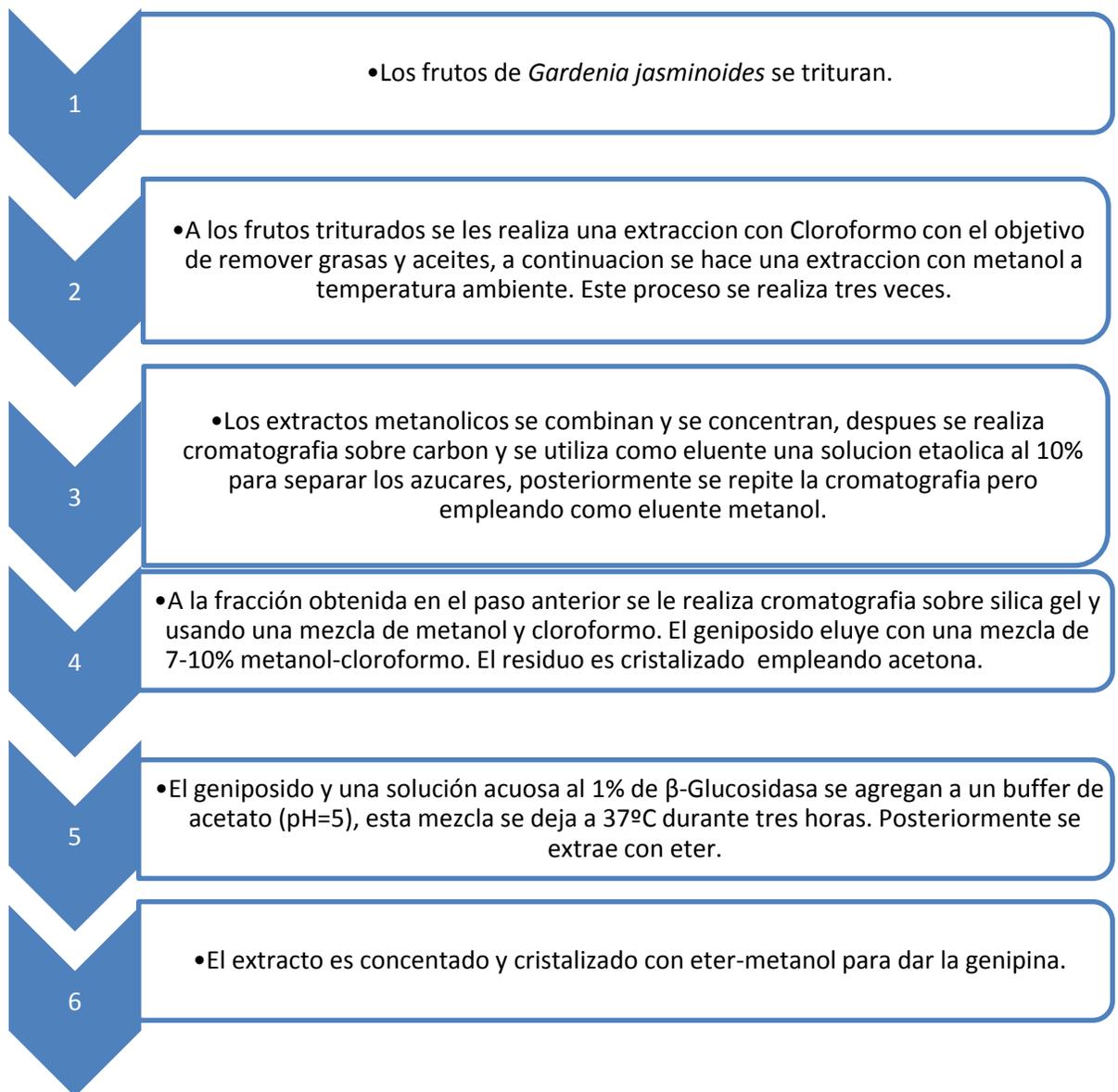


Figura 8 Procedimiento de extracción de genipina a partir de *Gardenia jasminoides*. (Vaandering, 2006)

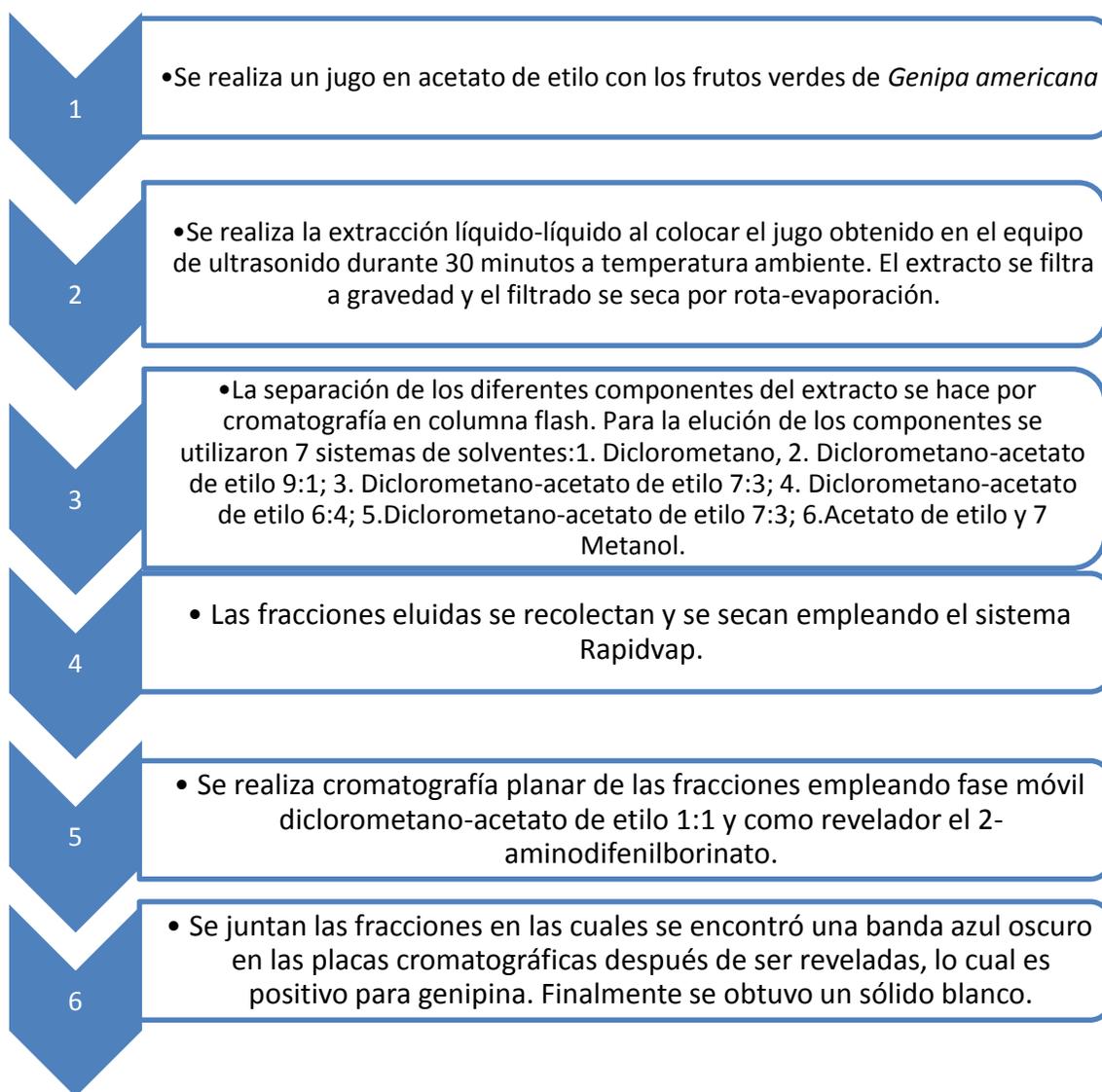


Figura 9 Procedimiento propuesto de extracción de genipina a partir de *Genipa americana*

#### 2.5.4 Caracterización de la genipina

Con el fin de verificar la pureza de la molécula extraída se realizó un análisis por UPLC. El método empleado y las condiciones de trabajo del equipo se muestran en la tabla 1.

Tabla 2 Condiciones de trabajo del UPLC

Método					
Tiempo	Flujo (µL/min)	%A (Ácido fórmico 0,2%)	%B (Acetonitrilo 0,2%)	Columna	Temperatura de la columna
0	0,6	90	10	ACQUITY UPLC® BEH C18 1.7 µm, 2,1 x 100mm	25°C
0,3	0,6	90	10		
3,0	0,6	10	90		
4,0	0,6	10	90		
4,1	0,6	90	10		
6,0	0,6	90	10		

En la figura 8 se muestra el gráfico de pureza óptica de la genipina obtenida en el último método de extracción se observa un pico estrecho y simétrico a un tiempo de retención de 1.899 minutos.

El detector ACQUITY UPLC® de matriz de fotodiodos (PDA) permite detectar y cuantificar concentraciones más bajas de analitos en las muestras, y comparar los espectros en el rango visible y ultravioleta en un amplio intervalo de concentraciones (WATERS, 2013). En la figura 9 se presenta el espectro ultravioleta de la genipina obtenido con el PDA, donde el máximo de absorción aparece a 241 nm, lo cual corresponde con lo reportado en la literatura para la genipina (Harris, Lecumberri, & Heras, 2010).

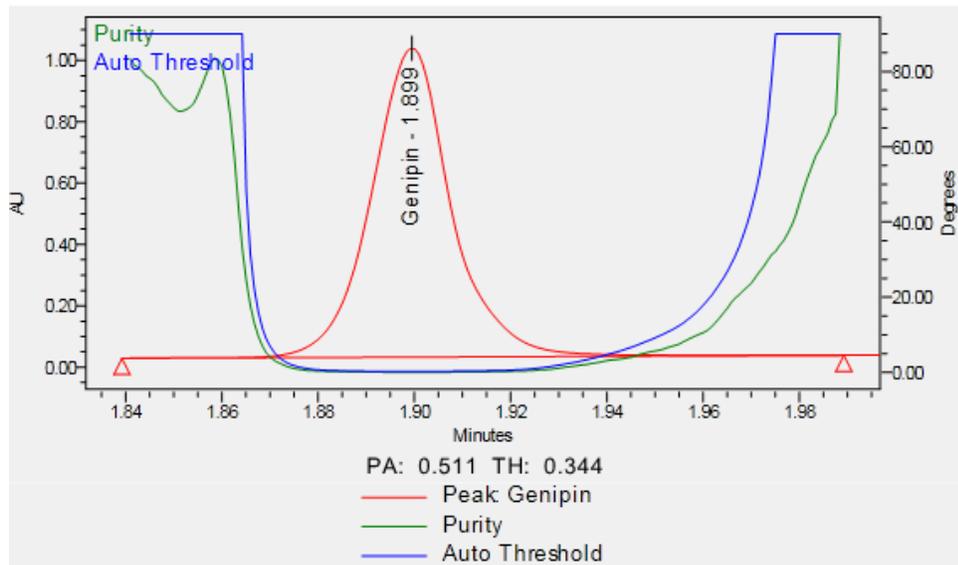


Figura 10 Cromatograma de la genipina. Pureza del pico

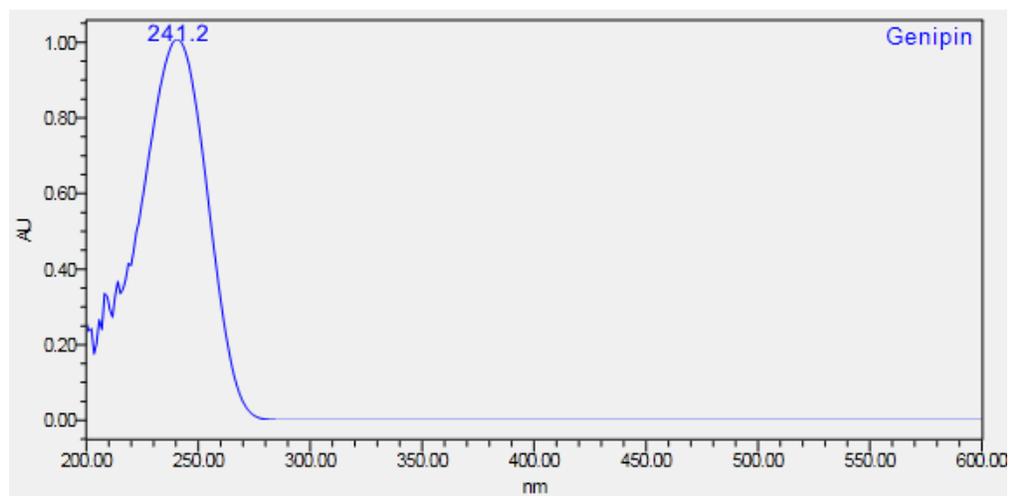


Figura 11 Espectro ultravioleta de la genipina

Como se obtuvo un pico estrecho y simétrico en el análisis cromatográfico y no se evidencio ningún otro pico, se consideró que la genipina presentaba un alto grado de pureza. La pureza y la identidad de un pico cromatográfico se evalúa, a menudo, basándose en las propiedades espectrales usando un detector de arreglo de diodos (PDA) (D'AMICO Sistemas S.A, 2012), mediante esta técnica se verifico la pureza de pico.

Se procedió a realizarle a la muestra un análisis por Espectrometría de Masas (ESI-EM) para conocer el peso molecular de la molécula extraída. En las figuras 10 y 11 se muestra los espectros de masas en modo positivo y negativo obtenidos. En el

modo positivo se observa un pico a 249 m/z, el cual corresponde a un aducto de la molécula con sodio. Teniendo en cuenta lo anterior se deduce que el peso molecular de la molécula extraída es de 226 g/mol, lo cual corresponde con el peso molecular de la genipina (Vaandering, 2006). En el modo negativo se observa un pico a 224,8 m/z, el cual se asume que puede deberse a la pérdida de un protón de la molécula.

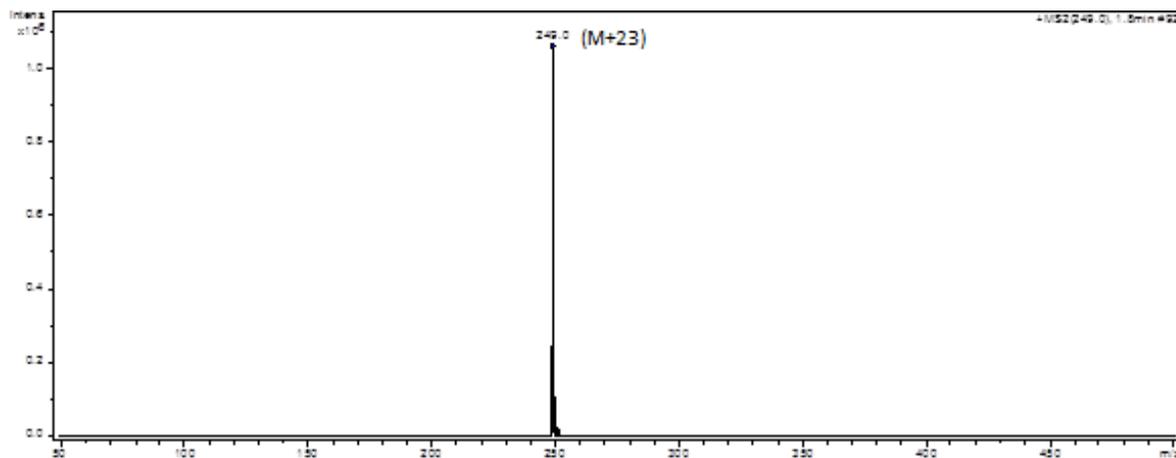


Figura 12 Espectro de masas de la genipina (modo positivo)

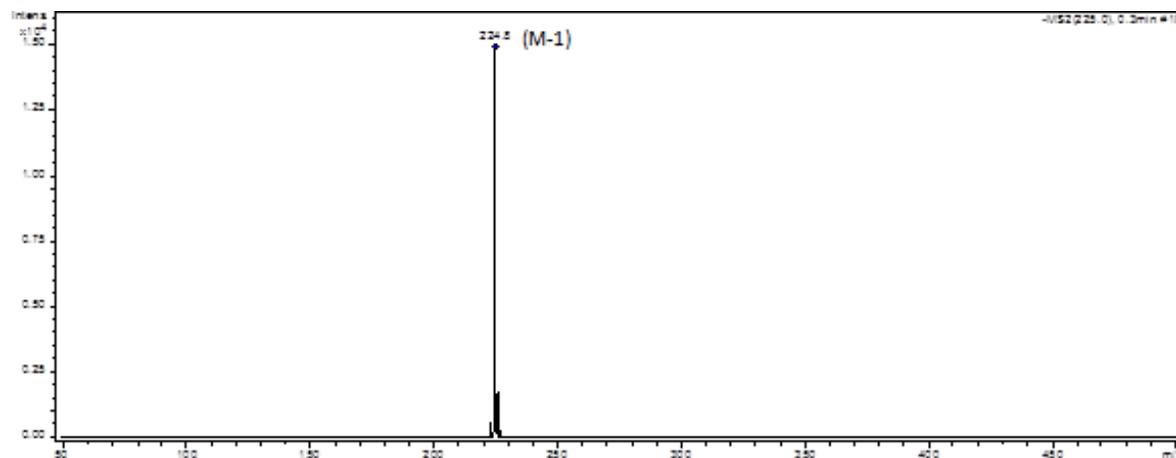


Figura 13 Espectro de masas de la genipina (modo negativo)

Una vez que el peso molecular de la muestra coincide con el de la genipina, se efectuó un análisis por Espectroscopia Infrarroja (FTIR) con el objetivo de observar los grupos funcionales presentes en la molécula extraída.

El espectro FTIR de la molécula extraída (Figura 12) muestra una banda debida al estiramiento  $\text{-OH}$  a  $3428\text{ cm}^{-1}$ ; a  $2951\text{ cm}^{-1}$  se evidencia el estiramiento  $\text{C-H}$ ; a  $1688\text{ cm}^{-1}$  aparece la vibración de tensión del  $\text{C=O}$ ; a  $1629\text{ cm}^{-1}$  se encuentra la vibración de tensión de  $\text{-C=C-}$ ; a  $1440\text{ cm}^{-1}$  la vibración de tensión del anillo; a  $1265\text{ cm}^{-1}$  la vibración de tensión asimétrica del  $\text{-C-O}$  del éter y a  $1107\text{ cm}^{-1}$  la vibración de tensión simétrica y asimétrica del  $\text{-C-O}$  del éster.

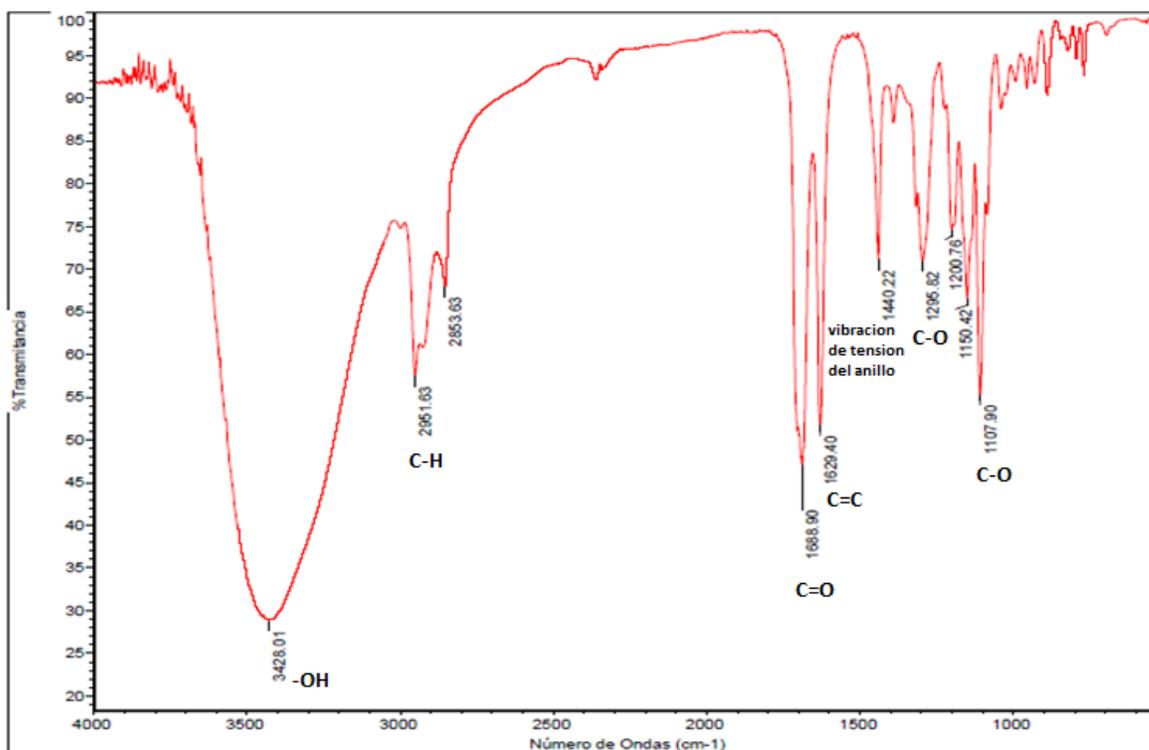


Figura 14 Espectro FTIR de la molécula extraída

Se encontró que los grupos funcionales presentes en la molécula objeto de estudio coinciden con los grupos funcionales encontrados en la genipina. A continuación se realizó un análisis por RMN unidimensional y bidimensional para dilucidar la estructura de la molécula extraída y verificar que corresponda con la estructura de la genipina.

El solvente utilizado para el análisis por RMN de la molécula fue metanol deuterado ( $\text{MeOH-D}_4$ ).

En la figura 14 se muestra el espectro DEPT-135, en el cual las resonancias de  $\text{CH}_3$  y  $\text{CH}$  aparecen como señales positivas, las resonancias de  $\text{CH}_2$  aparecen como señales negativas (señales por debajo de la línea base) y no se observan señales para los carbonos cuaternarios.

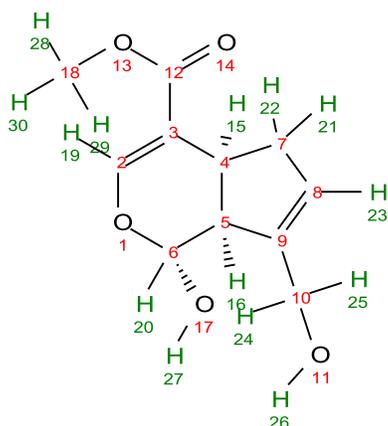


Figura 15 Estructura química de la genipina con numeración.

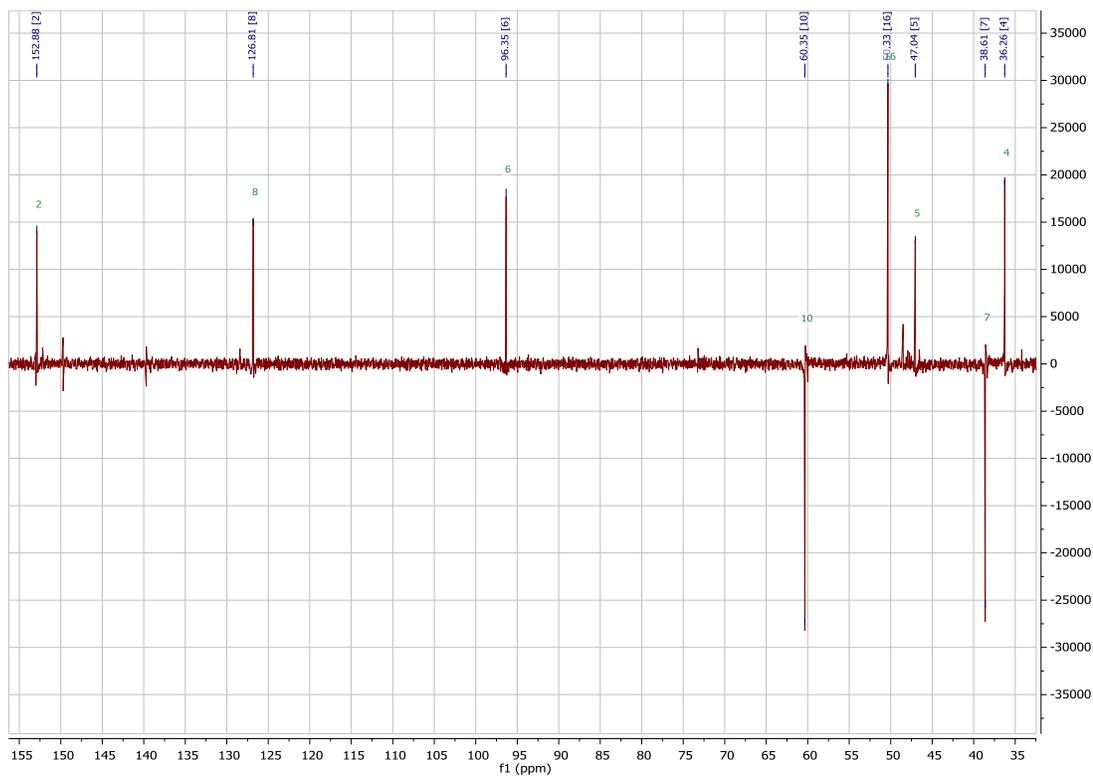


Figura 16 Espectro de RMN DEPT-135 de la genipina

Tabla 3 Desplazamiento químico de las señales de carbono. RMN DEPT-135

Numero del carbono	Desplazamiento químico (ppm)	Tipo
12	168.45	Cuaternario (no aparece la señal)
2	152.90	CH
9	144.22	Cuaternario (no aparece la señal)
8	126.57	CH
3	110.32	Cuaternario (no aparece la señal)
6	96.35	CH
10	60.34	CH <sub>2</sub>
18	50.33	CH <sub>3</sub>
5	47.65	CH
7	38.61	CH <sub>2</sub>
4	36.26	CH

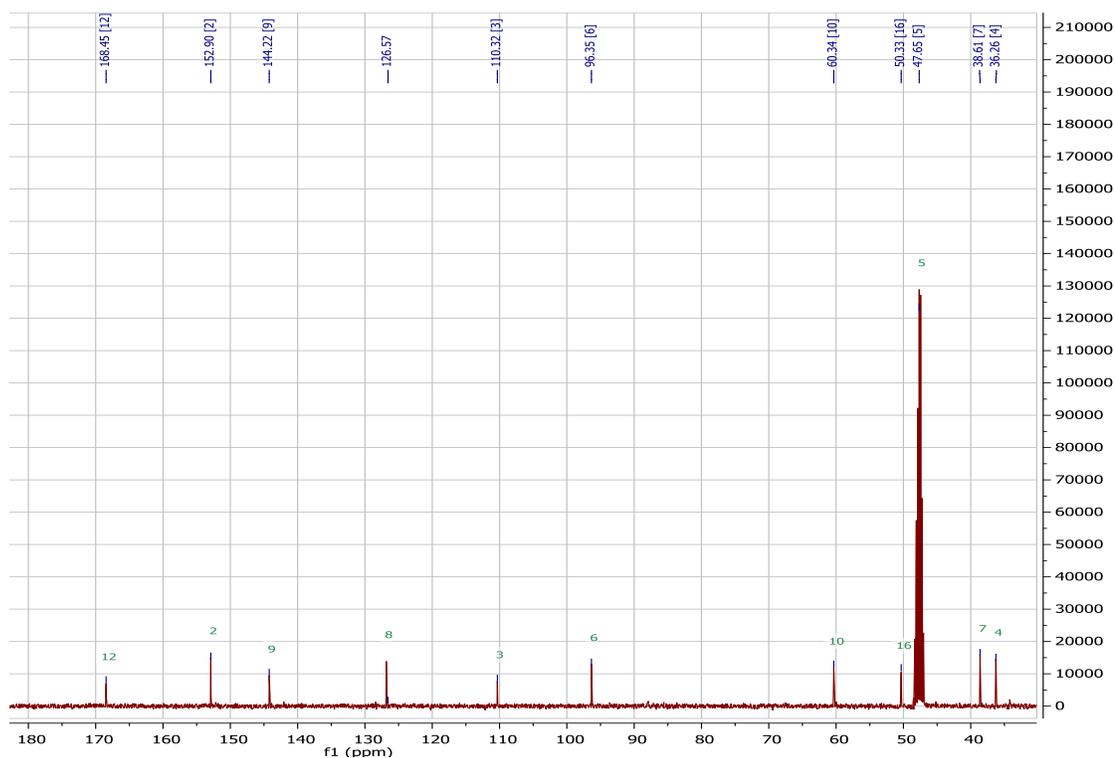


Figura 17 Espectro RMN 13C de la genipina. En color azul se muestra el desplazamiento químico de cada uno de las señales y en color verde la asignación de los carbonos a una señal

Tabla 4 Desplazamiento químico de los carbonos. RMN 13C

Número del carbono	Desplazamiento químico (ppm)
12	168.45
2	152.9
9	144.22
8	126.57
3	110.32
6	96.35
10	60.34
18	50.33
5	47.65
7	38.61
4	36.26

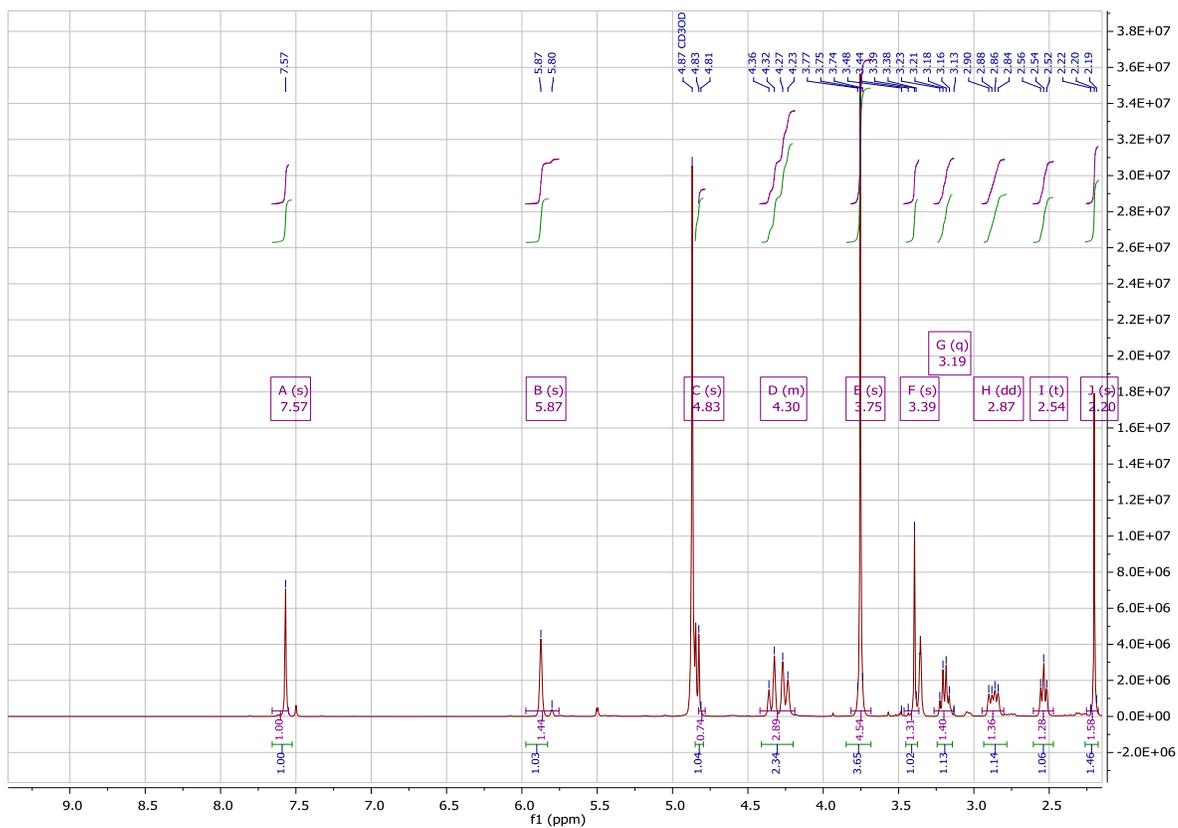


Figura 18 Espectro RMN 1H de la genipina. En color azul se muestra el desplazamiento químico de cada uno de las señales y en color magenta la multiplicidad de la señal

Tabla 5 Parámetros obtenidos a partir del análisis del espectro RMN 1H de la genipina

Número del hidrogeno	Desplazamiento químico (ppm)	Rango (ppm)	H's	Integral	Clase	J's
20	4.83	4.83 - 4.78	1	1.04	s	
19	7.57	7.66 - 7.55	1	1	s	
27	2.2	2.25- 2.18	1	1.46	s	
26	2.54	2.61- 2.47	1	1.06	t	8.27, 8.27
21,22	2.87	2.95- 2.80	2	1.14	dd	8.48, 16.59
15	3.19	3.26- 3.13	1	1.13	q	8.52, 8.52, 8.50
16	3.39	3.46- 3.36	1	1.02	s	
28,29,30	3.75	3.82- 3.68	3	3.65	s	
24,25	4.3	4.42- 4.19	2	2.34	m	
23	5.87	5.97- 5.75	1	1.03	s	

La espectrometría de correlación es uno de los diversos tipos de espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN) bidimensional. Este tipo de experimento RMN es mejor conocido por su acrónimo, COSY. Otros tipos de espectrometría RMN bidimensional son la espectrometría-J, la de intercambio (EXSY), la de efecto Overhauser nuclear (NOESY), la de correlación total (TOCSY), y experimentos de correlación heteronuclear como el HSQC, HMQC y HMBC. (Espectrometria.com, s.f.)

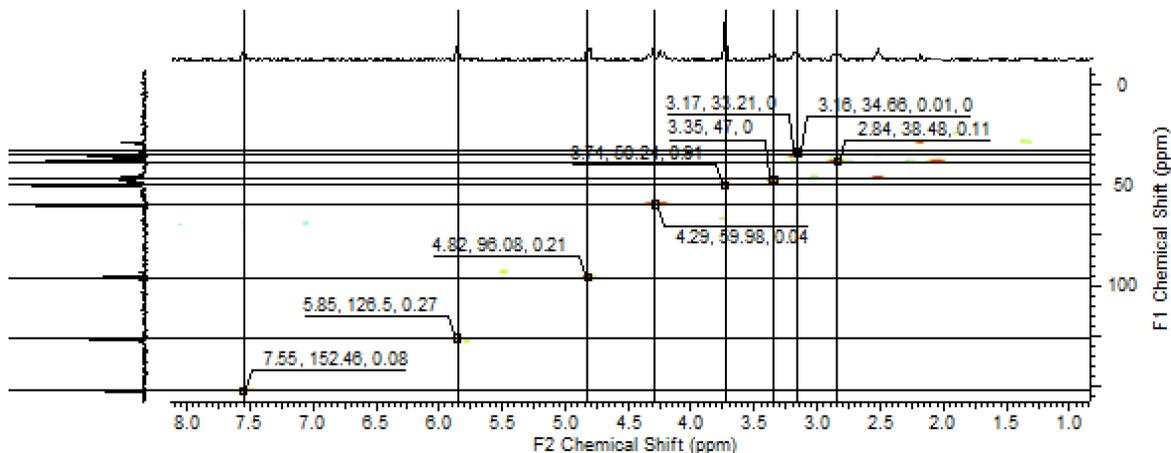


Figura 19 Espectro RMN 2D HSQC de la genipina

Tabla 6 Correlación entre los carbonos y los hidrógenos presentes en la estructura de la genipina.

Número del carbono	Desplazamiento químico (ppm)	Número del hidrogeno	Desplazamiento químico (ppm)	Multiplicidad	Correlación C-H
12	168.45	20	4.83	s	2-19
2	152.9	19	7.57	s	8-23
9	144.22	26	2.2	s	6-20
8	126.57	27	2.54	t	10-24,25
3	110.32	21,22	2.87	dd	4-15
6	96.35	15	3.19	q	7-21,22
10	60.34	16	3.39	s	5-16
18	50.33	28,29,30	3.75	s	18-28,29,30
5	47.65	24,25	4.3	m	-
7	38.61	23	5.87	s	-
4	36.26	20	4.83	s	-

El experimento de correlación heteronuclear a varios enlaces (HMBC, Heteronuclear Multiple Bond Correlation), desarrollado por Bax (1986) establece la correlación entre protones y un heteroátomo X separados por 2 o 3 enlaces.

Las correlaciones a un enlace dan lugar a señales de cruce dobles en la dimensión de  $^1\text{H}$ . (Duddeck, Dietrich, & Toth, 2000).

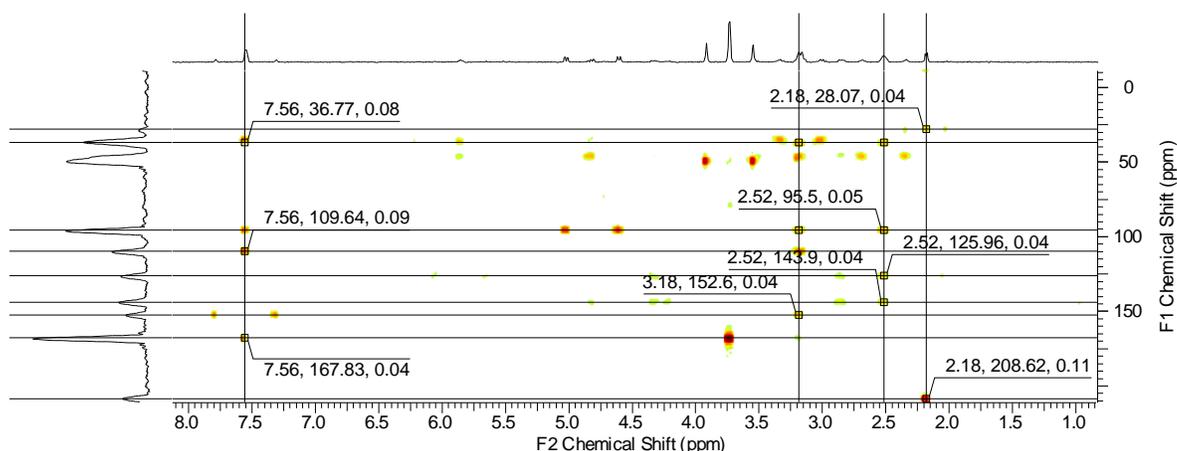


Figura 20 Espectro RMN 2D HMBC de la genipina

Una de las técnicas 2D más importantes es la técnica homonuclear ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) COSY (correlation spectroscopy), en cuyos espectros aparecen los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  en ambas dimensiones.

En los espectros COSY aparecen básicamente dos tipos diferentes de señales. Las de la diagonal (señales o picos diagonales) representan el espectro 1D. Las señales de fuera de la diagonal constituyen los denominados picos o señales de cruce, que indican la existencia de acoplamientos escalares (a través de los enlaces) entre los núcleos. Los correspondientes núcleos acoplados con ellos e pueden encontrar partiendo de las señales de cruce, trazando líneas horizontales y verticales hasta encontrar la diagonal y estas son las posiciones de las señales de los núcleos acoplados entre sí. Debido a la simetría del espectro, este procedimiento se puede llevar a cabo tanto en el triángulo superior izquierdo como en el inferior derecho (del hipotético cuadrado) (Duddeck, Dietrich, & Toth, 2000).

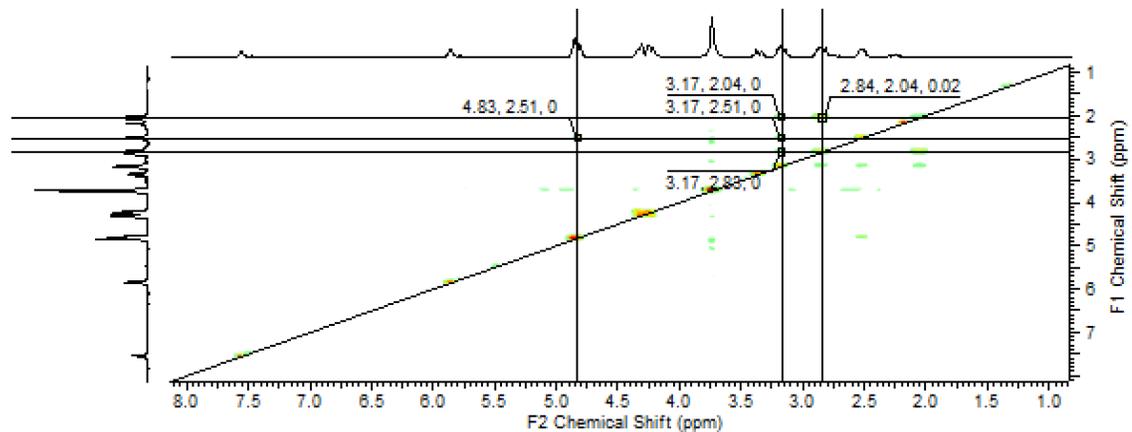


Figura 21 Espectro de RMN 2D COSY de la genipina

Los espectros NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) presentan una apariencia similar al COSY, con simetría respecto a la diagonal.

Como su propio nombre indica, esta técnica está basada en el efecto NOE, es decir, fundamenta se fundamenta en procesos de relajación a través de interacción dipolar directa de los espines nucleares. Juega un papel muy importante en la determinación de estructuras por RMN porque en este tipo de experimentos se obtiene información acerca de las distancias entre protones próximos en el espacio (RMN. Estructura de macromoléculas, s.f.).

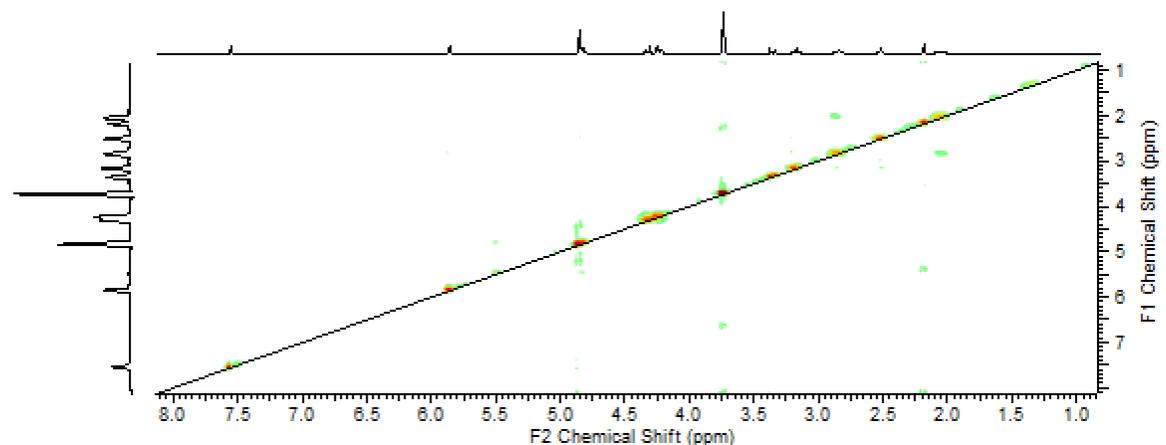


Figura 22 Espectro de RMN 2D NOESY de la genipina

Se observó que la asignación propuesta inicialmente es coherente con la correlación dada por los experimentos en 2D. Se concluye entonces que la estructura de la molécula extraída corresponde a la genipina.

## 2.5.5 Valoración de la genipina por UPLC

Las condiciones de trabajo del UPLC utilizadas para la valoración de la genipina se indican en la tabla 6.

Tabla 7 Condiciones de trabajo del UPLC para la realización de la valoración de la genipina.

Método					
Tiempo	Flujo (μL/min)	%A (Ácido fórmico 0,2%)	%B (Acetonitrilo 0,2%)	Columna	Temperatura de la columna
0	0,6	90	10	ACQUITY UPLC® BEH C18 1.7 μm, 2,1 x 100mm	25°C
0,3	0,6	90	10		
3,0	0,6	30	70		
3,1	0,6	90	10		
4,5	0,6	90	10		

La curva de calibración se hizo utilizando 6 concentraciones de genipina: 20 ppm, 60 ppm, 110 ppm, 150 ppm, 230 ppm y 300 ppm. Se obtuvo un coeficiente de correlación lineal ( $R^2$ ) igual a 0,993750.

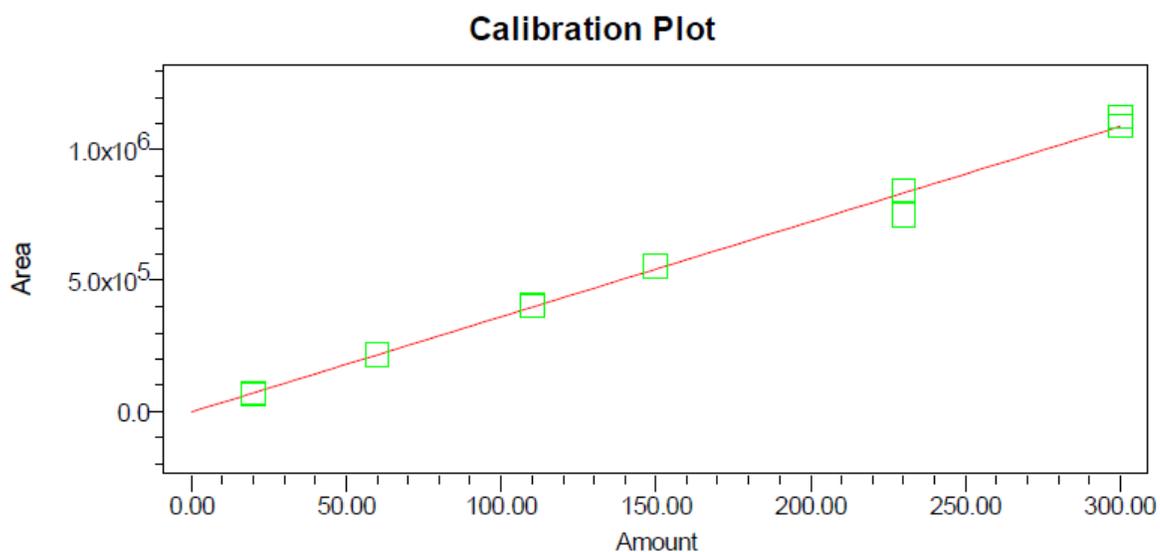


Figura 23 Curva de calibración de la genipina

Se realizaron los cromatogramas para las concentraciones a 20 ppm, 60 ppm, 110 ppm, 150 ppm, 230 ppm y 300 ppm de genipina (ver anexo). A continuación, se encuentran las tablas donde se resume la información extraída de los cromatogramas y en la figura 22 se ilustra uno de los cromatogramas obtenidos a una concentración de 300 ppm

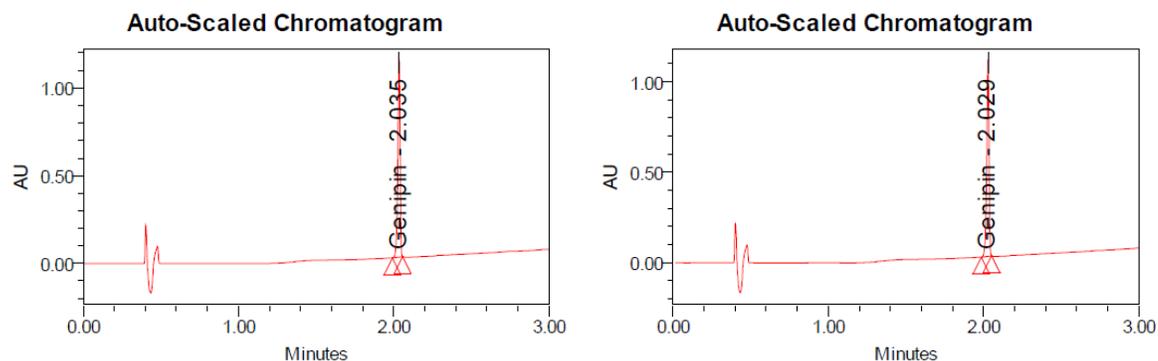


Figura 24 Cromatograma de la genipina a una concentración de 300 ppm

Tabla 8 Recopilación de los datos obtenidos a partir del cromatograma de la genipina a una concentración de 300 ppm.

	Nombre de la muestra	Canal	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración (mg/L)
1	Genipina 300ppm	PDA Ch1 240nm	2.035	1124544	1119759	300
2	Genipina 300ppm	PDA Ch1 240nm	2.029	1091718	1082576	300
<b>Promedio</b>				1108131	1101168	300
<b>Desviación estándar</b>				23211	26293	0
<b>%RSD</b>				2.1	2.4	0

Tabla 9 Recopilación de los datos obtenidos a partir del cromatograma de la genipina a una concentración de 230 ppm.

	Nombre de la muestra	Canal	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración (mg/L)
1	Genipina 230ppm	PDA Ch1 240nm	2.031	748477	745973	230
2	Genipina 230ppm	PDA Ch1 240nm	2.030	845292	844538	230
<b>Promedio</b>				796885	795256	230
<b>Desviación estándar</b>				68459	69696	0
<b>%RSD</b>				8.6	8.8	0

Tabla 10 Recopilación de los datos obtenidos a partir del cromatograma de la genipina a una concentración de 150 ppm.

	Nombre de la muestra	Canal	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración (mg/L)
1	Genipina 150ppm	PDA Ch1 240nm	2.029	555176	555335	150
2	Genipina 150ppm	PDA Ch1 240nm	2.029	556511	557324	150
<b>Promedio</b>				555843	556330	150
<b>Desviación estándar</b>				945	1406	0
<b>%RSD</b>				0.2	0.3	0

Tabla 11 Recopilación de los datos obtenidos a partir del cromatograma de la genipina a una concentración de 110 ppm.

	Nombre de la muestra	Canal	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración (mg/L)
1	Genipina 110ppm	PDA Ch1 240nm	2.029	402322	403102	110
2	Genipina 110ppm	PDA Ch1 240nm	2.028	406226	408375	110
<b>Promedio</b>				404274	405738	110
<b>Desviación estándar</b>				2761	3728	0
<b>%RSD</b>				0.7	0.9	0

Tabla 12 Recopilación de los datos obtenidos a partir del cromatograma de la genipina a una concentración de 60 ppm.

	Nombre de la muestra	Canal	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración (mg/L)
1	Genipina 60ppm	PDA Ch1 240nm	2.027	218384	219664	60
2	Genipina 60ppm	PDA Ch1 240nm	2.028	214725	215921	60
<b>Promedio</b>				216554	217792	60
<b>Desviación estándar</b>				2587	2647	0
<b>%RSD</b>				1.2	1.2	0

Tabla 13 Recopilación de los datos obtenidos a partir del cromatograma de la genipina a una concentración de 20 ppm.

	Nombre de la muestra	Canal	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración (mg/L)
1	Genipina 20ppm	PDA Ch1 240nm	2.027	64850	65208	20
2	Genipina 20ppm	PDA Ch1 240nm	2.027	70097	70522	20
<b>Promedio</b>				67473	67865	20
<b>Desviación estándar</b>				3710	3758	0
<b>%RSD</b>				5.5	5.5	0

En la figura 23 aparece el cromatograma de la genipina de la muestra 1 del fruto de *Genipa americana*. Los cromatogramas de las muestras 2-5 se encuentran en el anexo.

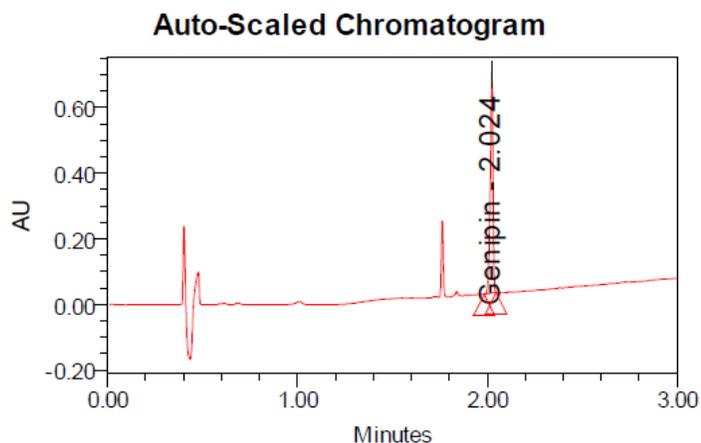


Figura 25 Cromatograma de la muestra 1

Para encontrar la concentración real de genipina en las muestras del fruto se multiplico la concentración obtenida a partir de la curva de calibración por el factor de dilución que es igual a 5. Se obtuvo que en 500mg de fruto la concentración de genipina promedio es de 774 ppm.

Tabla 14 Concentración de genipina en las muestras de fruto

Muestra de fruto	Concentración (ppm) obtenida a partir de la curva de calibración	Concentración real (ppm)
1	131.596	657.980
2	161.838	809.190
3	149.575	747.875
4	147.670	738.350
5	183.702	918.510
Promedio	154.876	774.381
Desviación estándar	19.374	96.870
%RSD	12.509	12.509

El valor RSD% se basa en la propagación de los resultados en comparación con la media. En general se obtuvieron porcentajes de desviación estándar relativa (%RSD) altos, lo cual indica que hay una gran dispersión en los datos obtenidos. Lo anterior es debido a que la extracción de la genipina aún no se encuentra estandarizada, además la extracción todavía puede ser optimizada.

## 2.6 CONCLUSIONES

Se encontró un método químico directo, sencillo y económico para la extracción de genipina a partir del fruto de *Genipa americana*, cuyo porcentaje de rendimiento es del 45%, el cual se encuentra cercano a los rendimientos obtenidos por otros métodos de extracción.

A partir de los resultados arrojados por las técnicas instrumentales empleadas, se puede concluir que el compuesto extraído por el método de extracción propuesto corresponde a la genipina, la cual presenta un alto grado de pureza, debido a que no aparece la señal de ningún otro compuesto en la extracción.

La valoración por UPLC de 5 muestras de fruto dio como resultado una concentración promedio de genipina de 1,55% (P/V) por cada 10g de fruto. Se trata de una concentración alta, por lo que es factible su uso a nivel industrial.

## 2.7 RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta que en este trabajo de investigación se encontró un método sencillo y económico para la extracción de genipina con alto grado de pureza a partir del fruto de la *Genipa americana* y dado el inmenso potencial industrial que tiene la genipina debido a sus aplicaciones y a que se extrae de una planta que se encuentra en todo el territorio colombiano, por lo cual permite el aprovechamiento de la biodiversidad; se recomienda llevar a escala piloto la extracción para la evaluación de los parámetros óptimos y posteriormente aplicarlo a gran escala, para implementar aplicaciones e innovaciones en procesos y productos de la genipina como cosmecéutico y farmacéutico en Colombia.

Se recomienda realizar la validación de la valoración de genipina, estandarizar el método de tratamiento de muestra para valorar por UPLC y así poder contar con una herramienta fiable al momento de realizar cuantificaciones de este metabolito.

### 3. BIBLIOGRAFIA

- Almeida, D. d. (2008). Avaliação fitoquímica y farmacológica de *Genipa americana* L. (Rubiaceae). Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- Byung-chul, k., hong-gyum, k., sin-ae, l., seunghwan, l., eun-hee, p., seong-jin, k., & chang-jin, l. (2005). Genipin-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent activation of mitochondrial pathway. *Biochemical Pharmacology*, 9.
- C.Y. Zhang, L. P. (2006). Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced beta cell dysfunction in isolated pancreatic islets. *Cell Metabolism*, 417–427.
- Cao, H., Feng, Q., Xu, W., Li, X., Kang, Z., Ren, Y., & Du, L. (2010). Genipin induced apoptosis associated with activation of the c-Jun NH2-terminal kinase and p53 protein in HeLa cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 1343–1348.
- Chalá, W. P., Guerrero, J. E., Castro, A., Castro, A., Palacios, J., & Castro, A. (2003). Extracción artesanal de colorantes naturales, una alternativa de aprovechamiento de la diversidad biológica del Chocó, Colombia. *Acta Biologica Colombiana*.
- D'AMICO Sistemas S.A. (28 de 11 de 2012). Catlab. Obtenido de <http://catlab.com.ar/notas.php?idm=1410&accion1=notas&PHPSESSID=bafdbef8f000e9738b35f9ff3701eb4e>
- DJERASSI, C.; GRAY, J.D.; KINCL, F. Isolation and Characterization of Genipin. *Journal of Organic Chemistry*, v. 25, p. 2174 –2177, 1960.
- DJERASSI, C.; BUDZIKIEWICZ, H.; WILSON, J.M. Mass-spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes. *Journal of American Chemistry Society*, v. 85, p. 3688-3699, 1961.
- Duddeck, H., Dietrich, W., & Toth, G. (2000). Elucidación estructural por RMN. Barcelona: Springer.
- Echeverry, L. F., Zapata, S. P., & Torres, L. F. (2011). *Estados Unidos Patente n° 7927637*.
- Espectrometria.com*. (s.f.). Obtenido de [http://www.espectrometria.com/espectrometra\\_de\\_resonancia\\_magntica\\_nu\\_clear](http://www.espectrometria.com/espectrometra_de_resonancia_magntica_nu_clear)

- Francis, J. K. (1993). *Genipa americana* L. Jagua, genipa. *Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station*, 5.
- Fwu-Long Mi, H.-W. S.-S. (2001). Release of indomethacin from a novel chitosan microsphere prepared by a naturally occurring crosslinker: Examination of crosslinking and polycation–anionic drug interaction. *Journal of Applied Polymer Science*, 1700–1711.
- Hye-Jin Koo, K.-H. L.-J.-H. (2006). Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin. *Journal of Ethnopharmacology*, 496-500.
- Guang-fa, W., Shao-yu, W., Jin-jun, R., Lin, L., Wei, X., Jian-xin, P., & Zhong-qiu Liu, S.-g. W.-j. (2009). Genipin inhibits endothelial exocytosis via nitric oxide in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 589–596.
- Harris, R., Lecumberri, E., & Heras, A. (2010). Chitosan-Genipin Microspheres for the Controlled Release of Drugs: Clarithromycin, Tramadol and Heparin. *Marine Drugs*, 1750-1762.
- Hye-Jin Koo, K.-H. L.-J.-H. (2006). Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin. *Journal of Ethnopharmacology*, 496-500.
- Hye-Jin, K., Song, Y. S., Hee-Jeong, K., Yong-Ha, L., Sung-Min, H., Su-Jung, K., . . . Eun-Hee, P. (2004). Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia . *European Journal of Pharmacology*, 201-208.
- InfoAgro*. (s.f.). Recuperado el 12 de noviembre de 2012, de <http://www.infoagro.com/flores/flores/gardenia.htm>
- Jun-Sheng, T., Yuan-Lu, C., Li-Min, H., Shan, G., Wei, C., Tian-Jiao, D., & Lu-Ping, L. (2004). Antidepressant-like effect of genipin in mice. *Neuroscience Letters*, 236-239.
- Lee, J., Lee, D., & Jeong, C. (2009). Gardenia jasminoides Ellis ethanol extract and its constituents reduce the risks of gastritis and reverse gastric lesions in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 1127–1131.
- Lelono, R., Tachibana, S., & Itoh, K. (2009). Isolation of antifungal compounds from *Gardenia jasminoides*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 946–956.

- M. Yamazaki, K. C. (2009). Genipin suppresses A23187-induced cytotoxicity in Neuro2a cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 1043–1046.
- Melika, S., Fathollah, M., & Masoud, M. (2013). How can genipin assist gelatin/carbohydrate chitosan scaffolds to act as replacements of load-bearing soft tissues? *Carbohydrate Polymers*, 635–643.
- Mengmeng Xu, Q. S. (2008). Microbial transformation of geniposide in *Gardenia jasminoides* Ellis into genipin by *Penicillium nigricans*. *Enzyme and Microbial Technology*, 440-444.
- Muzzarelli, R. (2009). Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers*, 1-9.
- OMS. (02 de 011.). Nota descritiva N° 194.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/index.html>.
- RMN. *Estructura de macromoléculas*. (s.f.). Obtenido de  
[http://www.ugr.es/~olopez/estruct\\_macromol/RMN/RMN\\_10\\_ppt.pdf](http://www.ugr.es/~olopez/estruct_macromol/RMN/RMN_10_ppt.pdf)
- Rodrigues, I. (Abril de 2008). Extração e estabilidade do colorante azul de Jenipapo (*Genipa americana* L.). Viçosa, Minas Gerais, Brasil.
- Sang-Won, L., Jong-Min, L., Seong-Hee, B., Young-Sook, P., & Tae-Ryong, H. (2003). Colorimetric determination of amino acids using genipin from *Gardenia jasminoides*. *Analytica Chimica Acta*, 267–274.
- Seok-Joo, K., Joon-Ki, K., Dong-Ung, L., Jong-Hwan, K., & Sun-Mee, L. (2010). Genipin protects lipopolysaccharide-induced apoptotic liver damage in d-galactosamine-sensitized mice. *European Journal of Pharmacology*, 188–193.
- Shoda, J., Miura, T., Utsunomiya, H., Oda, K., Yamamoto, M., Kano, M., . . . Sugiyama, Y. (2004). Genipin enhances Mrp2 (Abcc2)-mediated bile formation and organic anion transport in rat liver. *Hepatology*, 167-178.
- Suzuki, Y., Kondo, K., Ikeda, Y., & Umemura, K. (2001). Antithrombotic effect of geniposide and genipin in the mouse thrombosis model. *Planta Medica*, 807–810.
- Vaandering, B. (2006). *Genipin*. obtenido de  
[http://www.wou.edu/las/physci/ch350/Projects\\_2006/Vaandering/Genipin.htm](http://www.wou.edu/las/physci/ch350/Projects_2006/Vaandering/Genipin.htm)

- WATERS. (2013). *ACQUITY UPLC PDA eλ Detector*. Obtenido de [http://www.waters.com/waters/es\\_ES/ACQUITY-UPLC-PDA-e%CE%BB-Detector/nav.htm?cid=10013843&locale=es\\_ES](http://www.waters.com/waters/es_ES/ACQUITY-UPLC-PDA-e%CE%BB-Detector/nav.htm?cid=10013843&locale=es_ES)
- Weerapath, W., Praneet, O., Tanasait, N., & Theerasak, R. (2013). One-enzyme catalyzed simultaneous plant cell disruption and conversion of released glycoside to aglycone combined with in situ product separation as green one-pot production of genipin from gardenia fruit. *Enzyme and Microbial Technology*.
- Yamamoto, M., Miura, N., Ohtake, N., Amagaya, S., Ishige, A., Sasaki, H., . . . Terasawa, K. (2000). Genipin, a Metabolite Derived From the Herbal Medicine Inchin-ko-to, and Suppression of Fas-Induced Lethal Liver Apoptosis in Mice. *Gastroenterology*, 380-389.
- Yi-Shun Yang, T. Z.-C.-Y. (2011). Transformation of Geniposide into Genipin by Immobilized beta-glucosidase in a Two-Phase Aqueous-Organic System. *Molecules*, 4295-4304.

## ANEXO

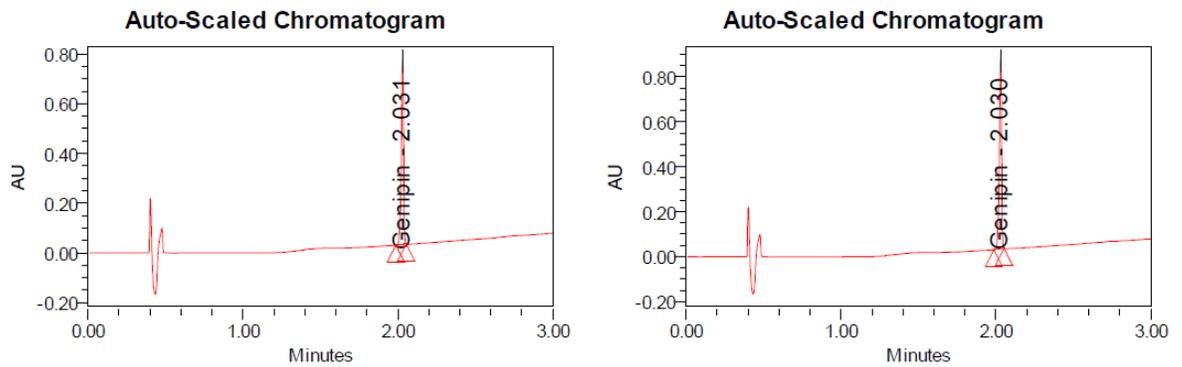


Figura 1. Cromatograma de la genipina a una concentración de 230 ppm

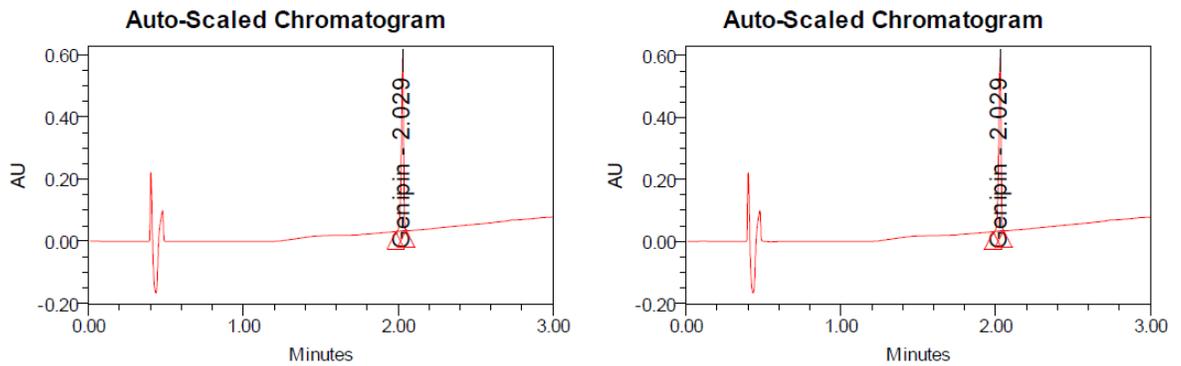


Figura 2 Cromatograma de la genipina a una concentración de 150 ppm

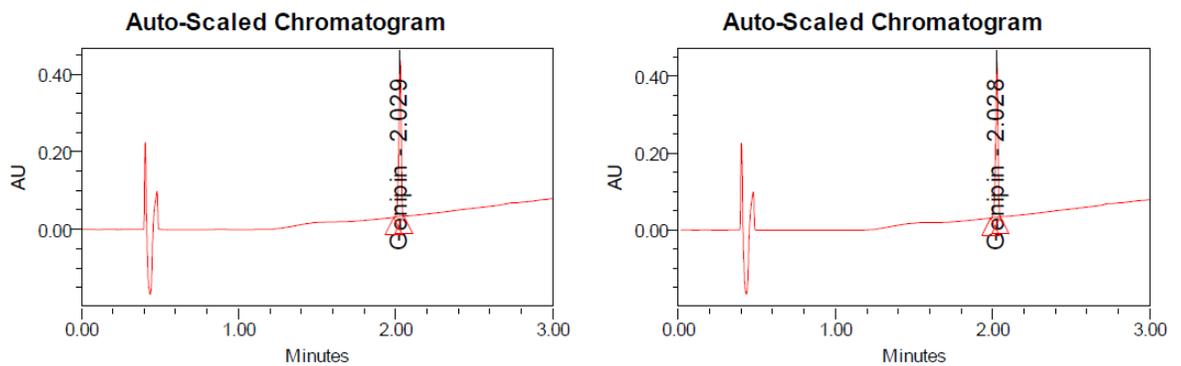


Figura 3 Cromatograma de la genipina a una concentración de 110 ppm

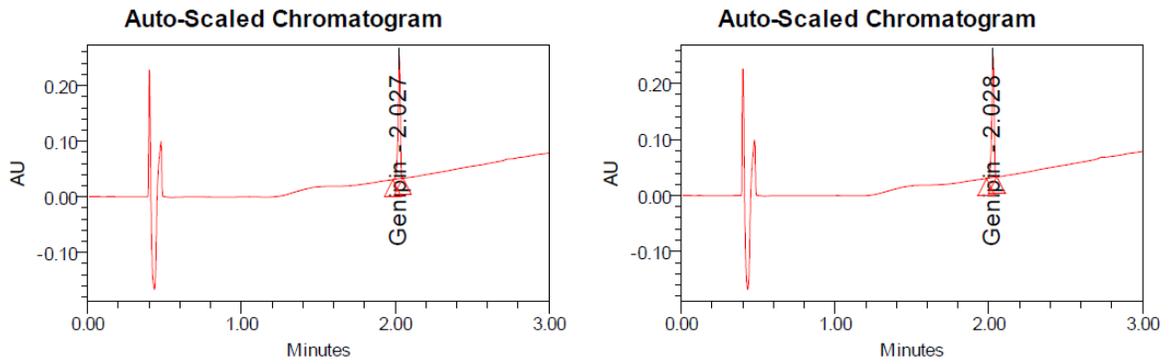


Figura 4 Cromatograma de la genipina a una concentración de 60 ppm

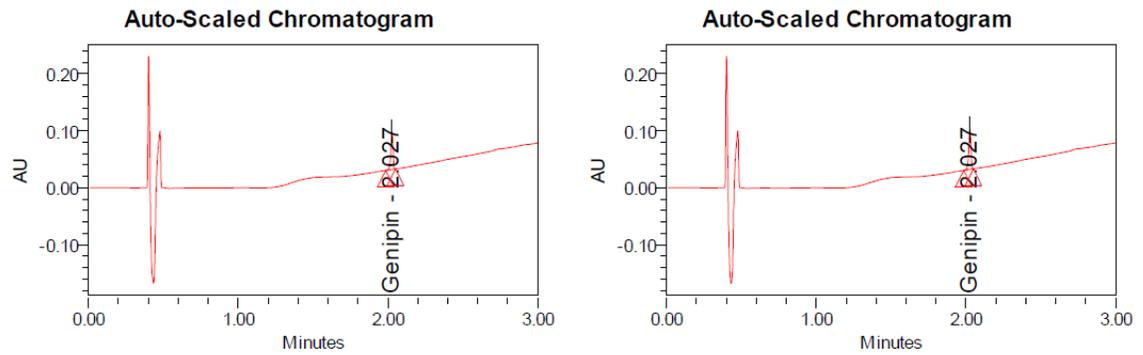


Figura 5 Cromatograma de la genipina a una concentración de 20 ppm

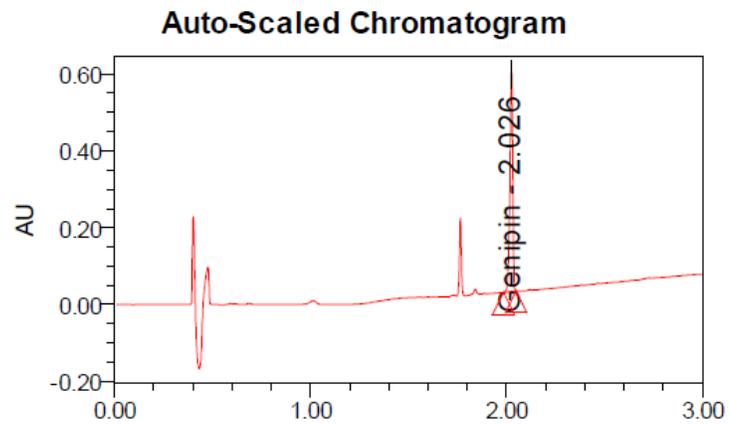


Figura 6 Cromatograma de la muestra 2

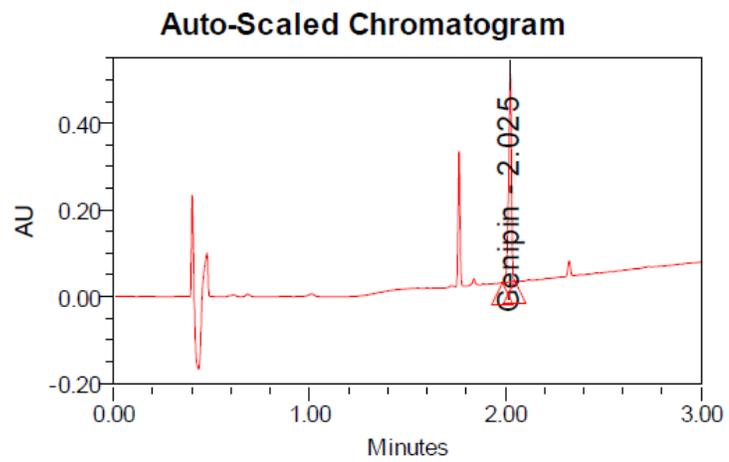


Figura 7 Cromatograma de la muestra 3

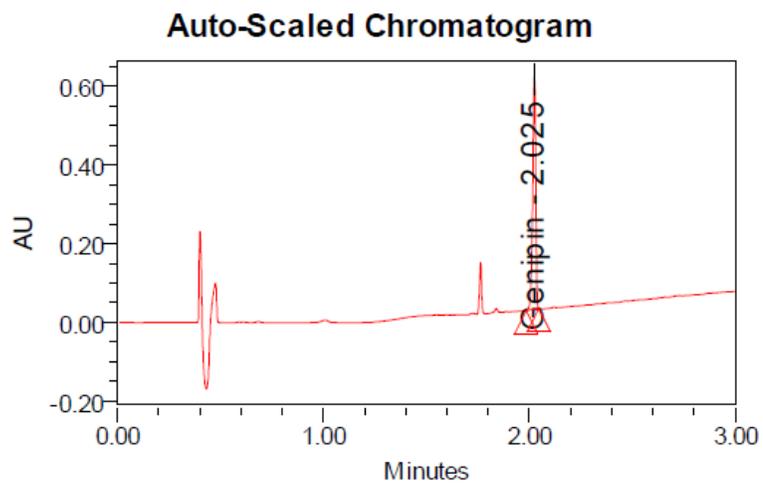


Figura 8 Cromatograma de la muestra 4

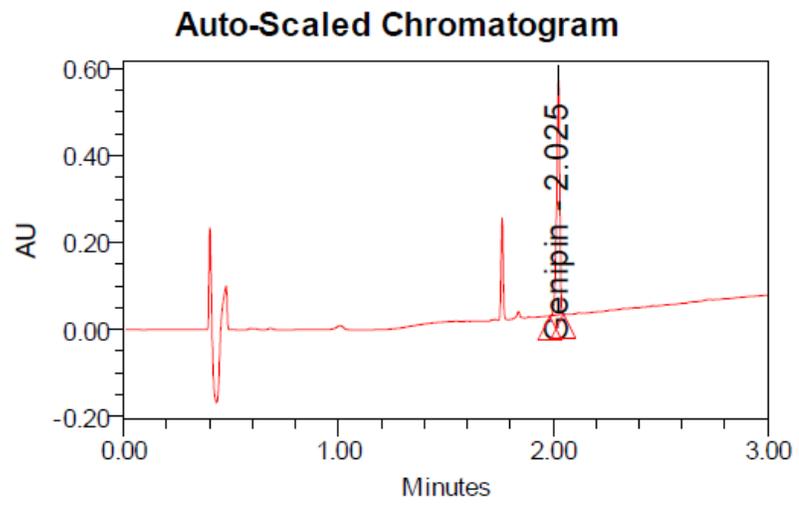


Figura 9 Cromatograma de la muestra 5