

**EXTRACCIÓN A ESCALA SEMIPILOTO DE GENIPINA A PARTIR DE FRUTOS
DE *Genipa americana* L.**

Lisa Yohanna Rodríguez Vargas

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
SANTIAGO DE CALI
2018**

**EXTRACCIÓN A ESCALA SEMIPILOTO DE GENIPINA A PARTIR DE FRUTOS
DE *Genipa americana* L.**

Lisa Yohanna Rodríguez Vargas

**PROYECTO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE PREGRADO EN
QUÍMICA FARMACÉUTICA**

Tutor

Guillermo León Montoya Peláez Ph.D

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
SANTIAGO DE CALI**

2018



APROBADO POR:


Alvaro Andrés Barrera Ocampo Ph.D
Evaluador


Guillermo León Montoya Peláez Ph.D
Director del Proyecto

Santiago de Cali, 31 de Mayo de 2018

AGRADECIMIENTOS

A Guillermo León Montoya director de proyecto de grado por brindarme su apoyo, conocimiento y acompañamiento durante todo este proceso.

A mi madre que desde el cielo me ha dado la fuerza necesaria para terminar con el primer peldaño de mi carrera profesional.

A mis abuelos, tíos y primos por apoyarme incondicionalmente durante toda esta etapa de mi vida.

A mi padre por guiarme y animarme a estudiar esta linda carrera.

Al Estadístico Norbey Marín Arredondo por contribuir con sus consejos y conocimientos en este proyecto.

A mis amigos y compañeros de la Universidad con quienes he compartido alegrías y tristezas dentro del ámbito personal como académico.

A la Universidad Icesi por ofrecerme una educación de alta calidad y profesores que brindaron sus conocimientos en mi formación profesional.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE GRÁFICOS	9
LISTA DE ANEXOS	10
RESUMEN.....	11
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	14
2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y SU JUSTIFICACIÓN.....	14
2.2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	15
2.2.1. <i>Genipa americana</i> Linnaeus.....	15
2.2.2. Genipina	16
2.2.3. Técnica de extracción.....	18
2.2.4. Planta de extracción semipiloto y especificaciones técnicas	19
2.2.5. Cromatografía de Adsorción en Columna.....	20
2.2.6. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y detector de arreglo de fotodiodos (PDA).....	21
2.3. OBJETIVOS	22
2.3.1. Objetivo General.....	22
2.3.2. Objetivos específicos.....	22
2.4. METODOLOGÍA PROPUESTA.....	23
2.4.1. Recolección y tratamiento del material vegetal	23
2.4.2. Extracción a escala de laboratorio.....	23
2.4.3. Extracción de genipina en planta semipiloto.....	26
2.4.4. Evaluación de la genipina extraída	26
2.4.5. Matriz de marco lógico	28
2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29

2.5.1.	Extracción a escala de laboratorio.....	29
2.5.2.	Extracción en planta semipiloto	36
2.5.3.	Evaluación de la genipina extraída por HPLC-PDA.....	40
2.6.	CONCLUSIONES.....	44
2.7.	RECOMENDACIONES	44
2.8.	REFERENCIAS.....	45
2.9.	ANEXOS.....	49
	Fé de erratas	

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones experimentales de relación másica-solvente, tiempo de extracción y velocidad de agitación, para la extracción de genipina a partir de Genipa americana L.	23
Tabla 2. Diseño factorial 2^3	24
Tabla 3. Concentración de genipina para cada extracción establecida por el diseño experimental, utilizando el fruto de Genipa americana L.	29
Tabla 4. Valores p para cada factor del diseño experimental.	35
Tabla 5. Valoración de genipina por HPLC-PDA.	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución del árbol Genipa americana L. a nivel mundial (GBIF Backbone Taxonomy, 2017).	15
Figura 2. Estructura química de la genipina, tomada y modificada de la versión oficial (Chemspider, n.d.).	16
Figura 3. Método de recuperación de genipina, tomada y modificada de la versión oficial (Endo & Taguchi , 1973).	17
Figura 4. Procesos de obtención de genipina y pigmentos (Neri-Numa, Pessoa, Paulino, & Pastore, 2017).	17
Figura 5. Extractor Soxhlet, tomada y modificada de la versión oficial (Marcilla Gomis, 1998).	18
Figura 6. Planta de extracción semipiloto del Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Icesi.	20
Figura 7. Extracción sólido- líquido a escala de laboratorio.	25
Figura 8. Rapidvap LABCONCO	25
Figura 9. Equipo HPLC Lachrom Ultra/ 2009-006	27
Figura 10. Curva de calibración del diseño experimental de genipina.	31
Figura 11. Fruto de Genipa americana L. triturado.	37
Figura 12. Extracto Concentrado.	37
Figura 13. Extracto con silica después de tres días en horno a 50°C.	37
Figura 14. Purificación de genipina por cromatografía de adsorción en columna.	38
Figura 15. Fracciones obtenidas por purificación en cromatografía de adsorción en columna.	38
Figura 16. Evaluación por TLC de fracciones obtenidas por purificación en cromatografía de adsorción en columna.	39
Figura 17. Muestras agrupadas en caja petri Izquierda: tubos 3-5, Derecha: tubos 2,6-9.	39
Figura 18. Genipina Obtenida.	40
Figura 19. Curva de calibración extracción semipiloto de genipina.	42
Figura 20. Cromatograma de la genipina extraída y purificada del tubo 3.	42
Figura 21. Cromatograma de la genipina extraída y purificada del tubo 4.	43
Figura 22. Cromatograma de la genipina extraída y purificada del tubo 5.	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Resultados de la prueba de normalidad de para los datos del diseño factorial 2^3	31
Gráfico 2. Gráfica de contorno Tiempo de extracción (min) vs Cantidad de solvente (mL), teniendo constante la velocidad de agitación en 95 rpm.	32
Gráfico 3. Gráfica de contorno Velocidad de agitación (rpm) vs Tiempo de extracción (min), teniendo constante la cantidad de solvente de 10 mL.....	32
Gráfico 4. Gráfica de contorno Velocidad de agitación (rpm) vs Cantidad de solvente (mL), teniendo constante el tiempo de extracción de 15 min.	33
Gráfico 5. Gráfica de superficie Cantidad de solvente (mL) vs Velocidad de agitación (rpm), teniendo constante el tiempo de extracción de 15 min.	33
Gráfico 6. Gráfica de superficie Tiempo de extracción (min) vs Velocidad de agitación (rpm), teniendo constante la cantidad de solvente de 10 mL.	34
Gráfico 7. Gráfica de superficie Cantidad de solvente (mL) vs Tiempo de agitación (min), teniendo constante la velocidad de agitación en 95 rpm.	34
Gráfico 8. Maximización de las condiciones evaluadas (Cantidad de solvente (mL), tiempo de extracción (min) y velocidad de agitación (rpm)) en respuesta a maximizar la cantidad de genipina extraída.	36

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Cromatograma de la genipina extraída en el diseño experimental, bajo las mejores condiciones de extracción: Relación másica (g): solvente (mL) 1:5, tiempo de extracción 15 min y velocidad de agitación 95 rpm.....	49
Anexo 2. Cromatograma de la genipina extraída y purificada del tubo 2.	49
Anexo 3. Cromatograma de la genipina extraída y purificada del tubo 6.	50
Anexo 4. Cromatograma de la genipina extraída y purificada del tubo 7.	50
Anexo 5. Cromatograma de la genipina extraída y purificada del tubo 8.	51
Anexo 6. Cromatograma de la genipina extraída y purificada del tubo 9.	51

RESUMEN

La Genipina es un secoiridoide, que puede obtenerse directamente de *Genipa americana* L. y *Gardenia jasminoides*, ha sido utilizado desde tiempos ancestrales como tinte en la piel. Actualmente, en el mercado nacional e internacional es altamente utilizado, debido a su baja toxicidad como agente entrecruzante, colorante en alimentos y cosméticos. Su obtención por métodos industriales, contempla pasos muy exigentes que minimizan la cantidad extraída e incrementan el costo en el mercado. Por esto, surge la necesidad de encontrar métodos novedosos, económicos y que reduzcan el tiempo de extracción.

Por lo tanto, esta investigación tiene como objetivo obtener un método estandarizado de extracción de genipina que sea económico, reproducible y eficiente. Para lograrlo, se propuso un diseño experimental 2³ a escala de laboratorio, encontrando que los valores de relación másica-solvente, velocidad de agitación y tiempo de extracción que maximizan la cantidad de genipina extraída fueron 1:5, 95 rpm y 2 horas, respectivamente.

Posteriormente, se realizó el escalamiento de las condiciones de extracción en la planta semipiloto sólido-líquido PSE Solutions. Se obtuvo un porcentaje de rendimiento de genipina de 0,65%, este resultado es alentador e indica que es un método de extracción satisfactorio y de bajo costo.

Finalmente, se determinó la concentración y pureza de la genipina extraída mediante cromatografía líquida de alta resolución con arreglo de fotodiodos (HPLC-PDA), donde, el tiempo de retención fue de 3,9 min, la concentración de genipina extraída oscila entre 3 -1516 ppm y el porcentaje de pureza entre 7-89%.

Palabras Claves: *Genipa americana* L., genipina, extracción sólido-líquido, purificación, HPLC-PDA.

ABSTRACT

Genipin is a secoiridoid, what can be obtained directly from *Genipa americana L.* and *Gardenia jasminoides*, it has been used since ancient times as a dye on the skin. Currently, in the national and international market is highly used, due to it is low toxicity as a crosslinking agent, coloring in food and cosmetics. Obtaining it by industrial methods contemplate very demanding steps that minimize the amount extracted and increase the cost in the market. For this, the need arises to find novel and economic methods that reduce the extraction time.

Therefore, this investigation has as purpose to get a standardized method of genipin extraction that is economic, reproducible and efficient. To achieve this it was proposed an experimental design 2³ at laboratory scale, finding that the values of mass-solvent ratio, agitation speed and extraction time that maximizes the amount of extracted genipin were 1:5, 95 rpm and 2 hours, respectively.

Subsequently, the staggering of the conditions was carried out by solid-liquid extraction in the semipilot plant PSE Solutions, a percentage yield of 0,65% genipin was obtained. This result is encouraging and indicates that it is a satisfactory and inexpensive method of extraction.

Finally, the concentration and purity of extracted genipin were determined by high performance liquid chromatography with photodiode array (HPLC-PDA), where, the retention time was of 3,9 min, the concentration of extracted genipin ranges from 3 -1516 ppm and the percentage of purity between 7-89%.

Keywords: *Genipa americana L.*, genipin, solid-liquid extraction, purification, HPLC-PDA.

1. INTRODUCCIÓN

Los productos forestales no maderables de origen vegetal en Colombia han incrementado el interés investigativo y su potencial como alternativa productiva, debido a su producción y consumo, las cuales satisfacen necesidades de alimentación y salud, además de generar ingresos, que para el 2011 ascendieron aproximadamente a 77.000 millones de USD (FAO, 2014).

En el Valle del Cauca, se encuentra en forma silvestre el árbol cuyo nombre científico es *Genipa americana L.*, 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 (Alvarez Ochoa , 2013).

Principalmente el fruto de *Genipa americana L.*, ha sido utilizado en la extracción de pigmentos naturales que son menos tóxicos, para ser aprovechados en la industria alimenticia y cosmética. Además, ha sido estudiada como agente entrecruzante en la formulación de hidrogeles, debido a que presenta una citotoxicidad reportada 5000-10000 veces menor que el glutaraldehído (Ramos-de-la-Peña, et al., 2014). De la misma manera, recientemente se ha comenzado a vislumbrar también su potencial aplicación en el tratamiento de enfermedades hepáticas, entre ellas la diabetes tipo II (Lárez Velásquez, Rivas, & Santos Ocanto, 2014).

Los métodos que comúnmente son utilizados para la recuperación de la genipina implican el uso de solventes orgánicos como el cloroformo y pasos muy específicos y complejos para su purificación (Endo & Taguchi , 1973), haciendo que el producto resultante sea muy costoso y difícil de obtener. Por lo tanto, es necesario encontrar nuevas alternativas para recuperar la genipina, utilizando nuevos métodos de los cuales se pueda tener una mayor eficiencia.

El objetivo del presente trabajo fue incrementar el porcentaje de rendimiento de genipina por medio de la metodología de extracción sólido-líquido con acetato de etilo. Inicialmente en diferentes experimentos establecidos por un diseño factorial, y su valoración por HPLC-PDA, se evaluaron tres factores de estudio (relación másica: solvente, velocidad de agitación y tiempo de extracción); logrando así, tener las mejores condiciones de extracción para ser acondicionadas en la planta semipiloto PSE Solutions. Finalmente, se cuantificó y valoró por HPLC-PDA la pureza de la genipina obtenida en la planta de extracción.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y SU JUSTIFICACIÓN

¿Es posible emplear un método de extracción de genipina eficiente y que minimice los costos de producción?

La genipina es un compuesto de origen natural que se obtiene a partir del genipósido procedente del fruto de *Gardenia jasminoides* y *Genipa americana L.* (Alvarez Ochoa , 2013). Utilizado por los indígenas en la antigüedad como pintura corporal (Ferreira, 2015), debido a la pigmentación azul que presenta el fruto en su degradación natural en presencia de oxígeno. Actualmente en Colombia, el colorante natural de extracto de jagua tiene permisos de emplearse como aditivo en comidas (INVIMA, 2014).

La genipina al presentar baja toxicidad, tiene un amplio campo de aplicación como colorante en la industria alimenticia y de entrecruzamiento en el campo farmacéutico y cosmético. Sin embargo, su extracción requiere condiciones de temperatura y pH controladas.

La extracción de genipina usualmente se realiza a partir del fruto de *Gardenia jasminoides*, por una serie de pasos en los cuales es necesario la enzima Beta-glucosidasa, haciendo que este proceso tenga un alto costo de producción para una mínima cantidad de genipina extraída. A causa de esto, surge la necesidad de contar con nuevos métodos estandarizados de extracción de genipina, con el objetivo de realizar un proceso de extracción más económico y eficiente.

Por lo tanto, este proyecto se enfoca en aumentar la cantidad extraída de genipina, mediante el uso de una planta semipiloto de extracción sólido-líquido, reduciendo costos de producción; la cual permite controlar variables del proceso, como son velocidad de agitación y tiempo de extracción, así como, reducir el impacto ambiental, debido a que el proceso de extracción y recuperación del solvente se realiza en el mismo equipo.

2.2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

2.2.1. *Genipa americana* Linnaeus

La *Genipa americana* L. es un árbol distribuido ampliamente en el continente americano, mayoritariamente en Centroamérica y Sudamérica, como se evidencia en la Figura 1; es conocido como jagua, chipara, guayatil, maluco, caruto y huito, dependiendo de la región en la que se encuentre (Fernandes & Rodrigues, 2012). Se caracteriza por tener una corteza lisa y de color claro, un tronco recto, ramas en verticilos, hojas de color verde oscuro y fruta con una fragancia y sabor parecidos a los de la pera (*Pyrus communis* L.) (Francis, 1993).



Figura 1. Distribución del árbol *Genipa americana* L. a nivel mundial (GBIF Backbone Taxonomy, 2017).

Su fruto conocido como genipa fue una importante fuente alimenticia en tiempos históricos y prehistóricos; actualmente se consume de manera limitada en áreas rurales. Esta especie de árbol, produce frutos en abundancia, los árboles de 15 a 20 años a veces producen de 400 a 600 frutos por año (Francis, 1993). En la mayoría de la cuenca del Amazonas, los árboles florecen de mayo a septiembre y dan fruto entre septiembre y abril. Lleva hasta un año para que los frutos maduren (UNCTAD, 2005).

La genipa tiene un tamaño mediano (8-10cm de largo), utilizado principalmente como colorante en la industria alimenticia (Fernandes & Rodrigues, 2012); contiene cantidades considerables de compuestos fenólicos ($857.10 \text{ mg} \cdot 100^{-1} \text{g}$) y flavonoides ($728.00 \text{ mg} \cdot 100^{-1} \text{g}$), que contribuyen a su alta actividad antioxidante. Lo

cual destaca el potencial de esta fruta como una fuente importante de nutrientes y compuestos bioactivos disponibles (Costa Lima Porto, et al., 2014).

El fruto se compone de cáscara, mesocarpio, endocarpio y semillas, de acuerdo al estudio realizado por (Bentes, L. de Souza, maya-Farfan, Lopes, & G. de Faria, 2014) el endocarpio tiene un contenido de proteína (3.19%) cinco veces mayor que el mesocarpio (0.62%), lo que puede explicar en parte las mayores cantidades de pigmento azul formadas en el endocarpio en comparación con el mesocarpio. Además, el pH encontrado en mesocarpio (4.49) y endocarpio (5.21) está dentro del rango óptimo para la formación del pigmento azul.

2.2.2. Genipina

La molécula de interés en este proyecto es la genipina. Extraída en 1-3% a partir de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) y en menor proporción en *Gardenia jasminoides* Ellis (Rubiaceae) en un 0.17% (Djerassi, et al., 1960). Su estructura química se muestra en la Figura 2.

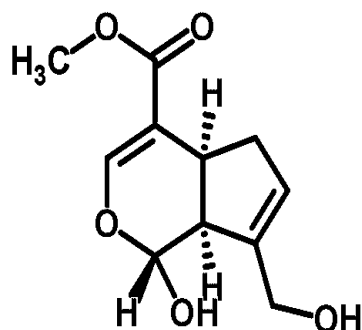


Figura 2. Estructura química de la genipina, tomada y modificada de la versión oficial (Chemspider, n.d.).

La genipina es una sustancia polar e incolora que reacciona espontáneamente con las aminas primarias de aminoácidos, péptidos o proteínas en presencia de oxígeno para formar pigmentos azules (Djerassi, et al., 1960); está presente en baja toxicidad y es soluble en agua, alcohol y propilenglicol. Características que la hacen propicia de utilizar en bebidas, alimentos y geles (Ramos de la peña, G. C. Renard, Montañez, Reyes-Vega, & Contreras-Esquivel, 2014).

En 1973 fue descubierto por Endo y Taguchi un método de recuperación de genipina a partir del fruto de *Gardenia*, el cual se muestra en la Figura 3.

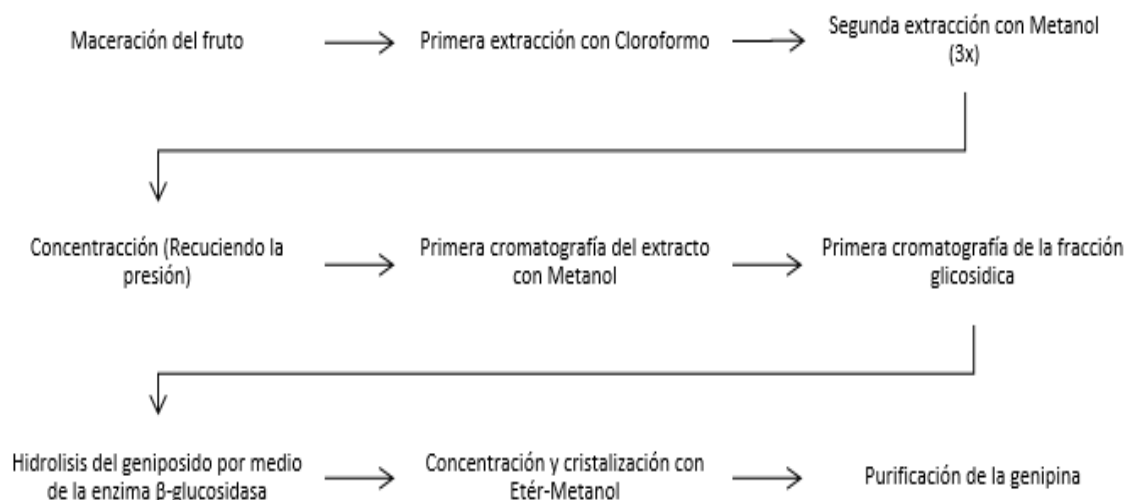


Figura 3. Método de recuperación de genipina, tomada y modificada de la versión oficial (*Endo & Taguchi , 1973*).

La pigmentación que se puede obtener de la genipina dependerá de diferentes condiciones de temperatura y pH. A valores de pH menores a 4, los grupos amino están protonados, por lo tanto, se da un ataque nucleofílico de la genipina, produciendo una coloración azul (Mi, Shyu, & Peng, , 2005), esto es relacionado al proceso normal de maduración del fruto (Bentes & Mercadante, 2014), el cual se muestra en la Figura 4. A un pH más alto (pH > 10), la reacción se inhibe debido a la hidrólisis del grupo éster de genipina, y en esta condición, se forma un pigmento rojo (Brauch, 2016).

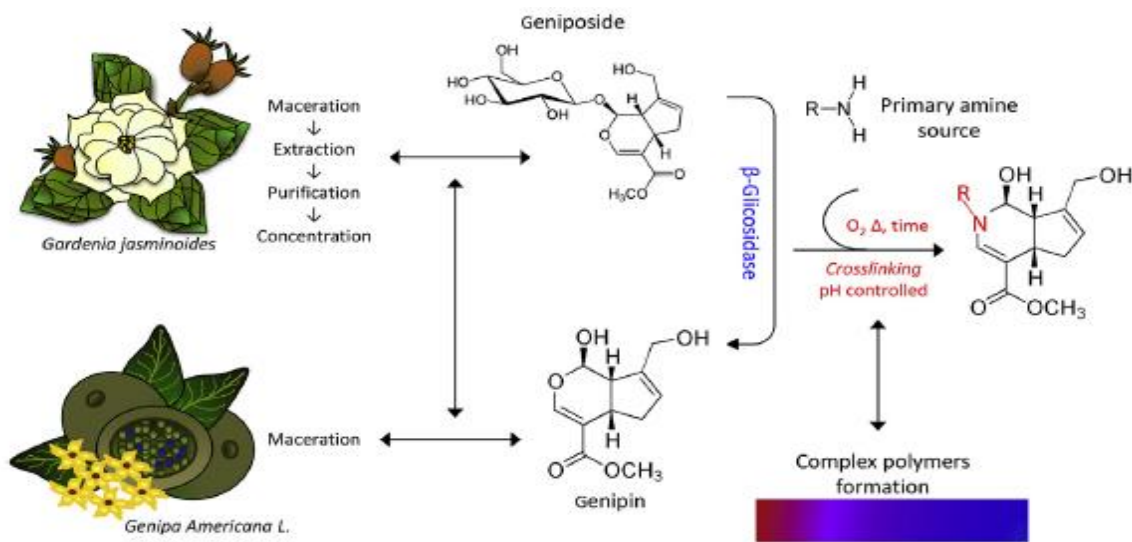


Figura 4. Procesos de obtención de genipina y pigmentos (*Neri-Numa, Pessoa, Paulino, & Pastore, 2017*).

De acuerdo con (Winotapun , Opanasopit , & Ngawhirunpat, 2013) la genipina ha demostrado que tiene numerosos efectos en el tratamiento de enfermedades como hepatoprotector, neuroprotector, antiinflamatorio y antibacterial. Estudios realizados por (Kim , Kim, Lee , Kwak , & Lee , 2010) demostraron que la genipina inhibe la apoptosis de los hepatocitos y protege las neuronas hipocampales.

2.2.3. Técnica de extracción

La extracción sólido-líquido es una operación unitaria de transferencia de materia basada en la disolución de uno o varios de los componentes de una mezcla (sólida) en un disolvente selectivo. Aprovecha, por tanto, la diferencia de solubilidades de los componentes de la mezcla en el disolvente añadido (Marcilla Gomis, 1998).

En la extracción sólido-líquido se acostumbra a trabajar por cargas o en semicontinuo por la dificultad de manipulación del sólido que hay que someter a extracción. Uno de los extractores sólido-líquido más usados a escala de laboratorio es el extractor Soxhlet (Figura 5). El disolvente extractor hierve en la caldera y, después de condensarse con agua fría, cae sobre el recipiente que contiene el sólido con el soluto a extraer. Se realiza la extracción y, a través de un sifón, sale del recipiente el disolvente con el soluto extraído. La mezcla se devuelve a la caldera, donde se va concentrando el soluto a medida que se repite el ciclo (Marcilla Gomis, 1998).

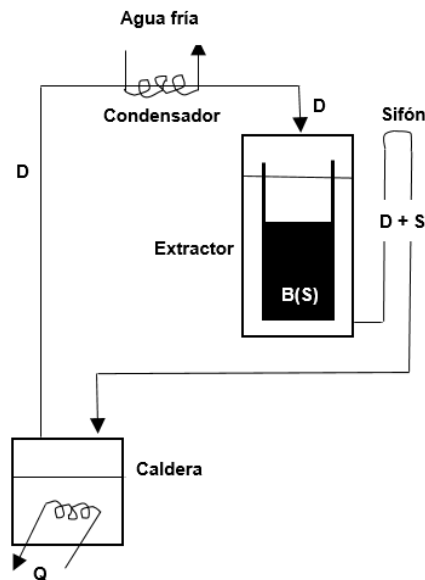


Figura 5. Extractor Soxhlet, tomada y modificada de la versión oficial (Marcilla Gomis, 1998).

En general, en la escala industrial se prefiere la extracción en condiciones normales por su menor costo y facilidad de implementación. En este caso se utiliza un equipo de contacto directo denominado percolador. En esta unidad la extracción se puede lograr poniendo en contacto un lecho estático de sólido con una corriente de líquido bajo flujo continuo. Esto también se puede lograr por agitación mecánica de los sólidos en la solución. En general, una vez finalizado el proceso de extracción, el líquido se separa por filtración y se concentra por evaporación. En el caso de tener solutos termolábiles, la concentración se realiza por evaporación a presión reducida para operar a bajas temperaturas. Con la evaporación del solvente se logra no solo la concentración del soluto, sino también la remoción y recuperación del solvente para procesos posteriores (PSE, 2016).

2.2.4. Planta de extracción semipiloto y especificaciones técnicas

La planta de extracción semipiloto referencia PESL, es una planta que realiza un proceso de extracción sólido-líquido como operación unitaria por medio de destilación por arrastre de vapor a escala reducida. El proceso de destilación, es la operación de separar, mediante vaporización y condensación, los diferentes componentes líquidos o sólidos disueltos en líquidos o gases de una mezcla, aprovechando los diferentes puntos de ebullición de cada una de las sustancias, ya que el punto de ebullición es una propiedad intensiva, es decir, que no varía en función de la masa o el volumen, pero sí en función de la presión (Ibarz, 2005).

En el proceso de extracción de distintos compuestos, la planta de extracción se hace un equipo ideal ya que permite que el material vegetal de interés sea sometido a unas variables de temperatura, vacío y agitación, con el uso de solventes para la obtención de extractos que son colectados en distintos periodos de tiempo. Sin embargo, el rendimiento y la eficiencia del proceso de extracción dependen de diversas variables como la naturaleza de la materia prima, tamaño y forma de las partículas sólidas, la concentración del soluto en el sólido, la compatibilidad entre el soluto y el solvente, la relación másica sólido-solvente, las propiedades del solvente, la temperatura, la presión, el pH, el régimen de mezclado y el tiempo de contacto (PSE, 2016).



Figura 6. Planta de extracción semipiloto del Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Icesi.

La figura 6, muestra que la planta de extracción sólido-líquido está compuesta por un tanque concentrador, condensador, tanque percolador, sistema de calentamiento y vacío, tanques colectores y tablero de control. El equipo permite realizar el proceso de extracción, la concentración del extracto y la recuperación del solvente, tanto en operación por lotes como en continuo (PSE, 2016).

2.2.5. Cromatografía de Adsorción en Columna

Para realizar la purificación de la molécula, se hace uso de la técnica cromatográfica de adsorción en columna, en la cual se emplean columnas verticales de vidrio cerrada en su parte inferior con una llave que permita la regulación del flujo de la fase móvil. Las columnas se rellenan con un adsorbente, como alúmina o gel de sílice (fase estacionaria), mojado con el disolvente que se vaya a emplear en el proceso cromatográfico, en este caso acetato de etilo.

En la parte superior de la columna se pone la disolución de la mezcla a separar y a continuación un depósito que contenga el eluyente (fase móvil) que se va a utilizar en la separación. Se abre la llave inferior de manera que el eluyente comience a bajar por la columna. En este proceso, los componentes de la mezcla son adsorbidos por la fase estacionaria con diferente intensidad, de manera que el

proceso de adsorción-desorción hace que unos componentes avancen más rápidamente que otros. El líquido que sale por la parte inferior de la columna se recoge de manera fraccionada. Si los componentes de la mezcla avanzan a muy diferente velocidad se podrán obtener fracciones cromatográficas constituidas por un solo componente (I, 2011).

2.2.6. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y detector de arreglo de fotodiodos (PDA)

El principio de separación de la cromatografía por fase reversa es considerado un proceso de partición en donde los solutos están distribuidos entre una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar. Los solutos no polares tienden a adsorberse en la fase estacionaria y se mueven a través del sistema más lentamente que los solutos polares. La cromatografía de fase reversa también puede proporcionar información cuantitativa acerca de las especies separadas, lo cual le da un impacto de aplicación aún mayor a esta técnica (Esquivel Soto & Leal Guadarrama, 2004).

La columna Kinetex® 2.6 µm C18, es utilizada en cromatografía por fase reversa. Está presenta una fuerte retención hidrofóbica (Sigma Aldrich, n.d.), lo cual es de gran aplicabilidad en este trabajo, ya que contribuye a la cuantificación del analito en cuestión, siendo este de carácter medianamente polar.

Los detectores en cromatografía de líquidos como HPLC son de dos tipos básicos. Los detectores basados en una propiedad de la fase móvil que responden a cambios en el índice de refracción, la constante dieléctrica o la densidad, las cuales se modifican por la presencia de los analitos (Esquivel Soto & Leal Guadarrama, 2004).

El principio del detector PDA brinda información tridimensional que permite una evaluación precisa de la identidad, pureza y cuantificación del pico en una sola ejecución (Dionex Corporation, 2003). Este instrumento puede sintonizarse para operar en la máxima absorbancia del analito o en la longitud de onda donde se presenta mayor selectividad del mismo (Swartz, 2010).

2.3. OBJETIVOS

2.3.1. Objetivo General

Incrementar la extracción de genipina proveniente de frutos de *Genipa americana L.*, implementando parámetros a escala semipiloto a partir de condiciones reportadas a escala de laboratorio.

2.3.2. Objetivos específicos

- Establecer las mejores condiciones de extracción de genipina a partir *Genipa americana L.*, por medio de un diseño experimental factorial a escala de laboratorio.
- Implementar las condiciones de extracción de genipina en planta de extracción semipiloto.
- Evaluar la genipina extraída en planta semipiloto por método cromatográfico (HPLC-PDA).

2.4. METODOLOGÍA PROPUESTA

2.4.1. Recolección y tratamiento del material vegetal

Los frutos de *Genipa americana L.* se recolectarán de un árbol el cual se encuentra el perímetro urbano en la Ciudad de Cali. Se recolectarán 33 frutos no maduros, de los cuales 32 se utilizaron para realizar la extracción en planta semipiloto y uno para el análisis de laboratorio.

2.4.2. Extracción a escala de laboratorio

Se realizó un diseño factorial, el cual es un conjunto de técnicas avanzadas de diseño de experimentos (DoE), por medio de este se evaluaron los mejores parámetros de extracción de genipina a escala de laboratorio, para optimizar tiempo y recursos disponibles, y así realizar el proceso de escalonamiento en la planta de extracción semipiloto.

Los factores para valorar son: relación másica-solvente, tiempo de extracción y velocidad de agitación, ver tabla 1.

Tabla 1. Condiciones experimentales de relación másica-solvente, tiempo de extracción y velocidad de agitación, para la extracción de genipina a partir de *Genipa americana L.*

	Relación másica (g): solvente (mL)	Tiempo de Extracción (min)	Velocidad de Agitación (rpm)
Mínimo	1:1	15	0
Intermedio	1:3	30	47,5
Máximo	1:5	45	95

Por lo tanto, el diseño presenta 10 experimentos que serán ejecutados con el fruto recolectado del árbol de *Genipa americana L.* En la tabla 2, se muestra los experimentos obtenidos por el software Minitab 18.

Tabla 2. Diseño factorial 2³

No. Ensayo	Puntos Mínimos y Máximos		
	Relación Másica (g): Solvente (mL)	Tiempo de extracción (min)	Velocidad de agitación (rpm)
1	1:1	15	0
2	1:5	15	0
3	1:1	15	95
4	1:5	15	95
5	1:1	45	0
6	1:5	45	0
7	1:1	45	95
8	1:5	45	95
Puntos Intermedios			
9	1:3	30	47,5
10	1:3	30	47,5

Los intervalos evaluados, se tomaron de acuerdo con la capacidad máxima y las condiciones que soporta la planta de extracción semipiloto. Dentro de los parámetros a evaluar no es considerada la temperatura, ya que el experimento se realiza a temperatura ambiente (aprox. 25-30°C), este es un factor de control dentro del experimento, debido a que la genipina sufre degradación mediada por temperatura (Náthia-Neves, Gadioli Tarone, Martelli Tosi, Maróstica Júnior, & A. Meireles, 2017).

Teniendo las condiciones a evaluar, se procede a realizar la extracción a escala de laboratorio. Inicialmente, se adicionan 2 g de fruto de genipa, previamente triturados en beakers de 25 mL, a los cuales se añade la cantidad correspondiente de acetato de etilo para cada uno de los ensayos, teniendo en cuenta la relación descrita en la tabla 2, este solvente es de elección para extraer la mayor cantidad de genipina de acuerdo con (Alvarez Ochoa , 2013). Al ser necesario utilizar agitación, se hace uso de plancha de agitación y magneto en el ensayo que lo requiera, como se puede ver en la figura 8.

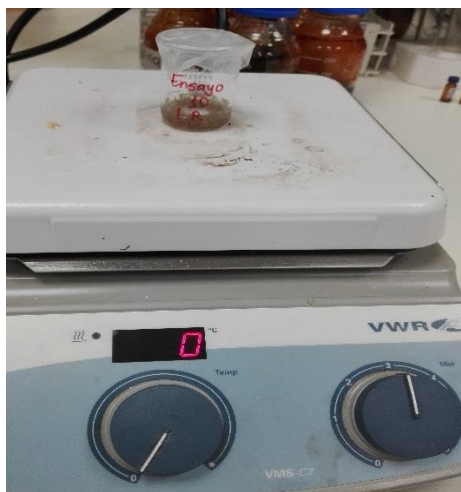


Figura 7. Extracción sólido- líquido a escala de laboratorio.

Luego, cada muestra es filtrada y depositada en tubos de ensayo, los cuales se llevan al rapidvap (figura 9), hasta sequedad. Los tubos de ensayo se reconstituyen cada uno con 1 mL de acetonitrilo, se filtran y se depositan en viales para su posterior análisis en HPLC por duplicado.



Figura 8. Rapidvap LABCONCO

Además, se realiza una curva de calibración de 50-380 ppm del estándar de genipina, como se muestra a continuación:

Preparación de estándares curva de calibración:

1. Pesar 0,038 g de estándar de genipina en un balón volumétrico de 10 mL
2. Completar el volumen del balón con acetonitrilo HPLC, tapar y agitar.
3. Rotular el balón como solución 300 ppm.
4. En 4 balones volumétricos de 5 mL, adicionar alícuotas de 4.16, 2.66, 1.33 y 0.16 mL de la solución de 300 ppm a cada balón.

5. Completar volumen de cada uno de los balones con acetonitrilo HPLC, tapar y agitar.
6. Rotular cada solución estándar como 250, 160, 80, 10 ppm respectivamente.
7. Tomar 1,5 mL de cada solución estándar.
8. Filtrar por membrana de 0,22 μm y llevar a un vial de inyección cada una de las soluciones estándar.

Teniendo todas las muestras previamente filtradas, se acondicionan el HPLC y se realiza las corridas, teniendo en cuenta las siguientes condiciones:

Columna C18: Kinetex® 2.6 μm 150 mm x 2.1 mm

Flujo: 0,4 mL/min

Temperatura: 35 °C

Fase Móvil: Agua Tipo I al 0,1% de ácido fórmico: acetonitrilo HPLC

Longitud de Onda: 240 nm

Tiempo de corrida: 8 min

Volumen de inyección: 2 μL

Tiempo de retención aproximado de la genipina: 3,6 minutos

2.4.3. Extracción de genipina en planta semipiloto

Encontradas las mejores condiciones de extracción de genipina mediante el diseño experimental 2³ a escala de laboratorio, se ajustan para realizar el escalamiento en la planta semipiloto y así realizar el proceso de extracción sólido-líquido. El extracto obtenido se lleva al concentrador, donde se retira la mayor cantidad de solvente de la solución con el metabolito de interés. Posterior a esto, el concentrado obtenido se lleva al equipo de rota evaporación, para obtener la muestra en su mayor pureza.

Al extracto obtenido se adicionó sobre 170g de silica y se llevó a secar en horno a 50°C hasta obtener un sólido totalmente seco y libre de agua. Luego, este polvillo se purificó por medio de cromatografía de adsorción en columna, utilizando acetato de etilo como fase móvil y silica como fase estacionaria. Con las muestras recolectadas se realiza una cromatografía de capa fina (TLC), para verificar la existencia y pureza de genipina en la muestra, comparándola con su respectivo estándar.

2.4.4. Evaluación de la genipina extraída

La cuantificación de genipina se realiza mediante HPLC-PDA en fase reversa.

El método cromatográfico HPLC-PDA de cuantificación de genipina, consistió en la preparación de una curva de calibración del estándar de genipina HPLC entre 10 y 300 ppm. Las muestras y estándares se inyectan en el equipo, previamente filtrados.

Preparación de estándares curva de calibración:

1. Pesar 0,030 g de estándar de genipina en un balón volumétrico de 10 mL
2. Completar el volumen del balón con acetonitrilo HPLC, tapar y agitar.
3. Rotular el balón como solución 300 ppm.
4. En 4 balones volumétricos de 5 mL, adicionar alícuotas de 4.16, 2.66, 1.33 y 0.16 mL de la solución de 300 ppm a cada balón.
5. Completar volumen de cada uno de los balones con acetonitrilo HPLC, tapar y agitar.
6. Rotular cada solución estándar como 250, 160, 80 y 10 ppm respectivamente.
7. Tomar 1,5 mL de cada solución estándar.
8. Filtrar por membrana de 0,22 μm y llevar a un vial de inyección cada una de las soluciones estándar.

Las condiciones para realizar las corridas de la curva de calibración y muestras en el equipo HPLC-PDA (figura 10), utilizando pre-columna fueron:

Columna C18: Kinetex® 2.6 μm 150 mm x 2.1 mm

Flujo: 0,4 mL/min

Temperatura: 35 °C

Fase Móvil: Agua Tipo I al 0,1% de ácido fórmico: acetonitrilo HPLC

Longitud de Onda: 240 nm

Tiempo de corrida: 8 min

Volumen de inyección: 2 μL

Tiempo de retención aproximado de la genipina: 3,9 minutos



Figura 9. Equipo HPLC Lachrom Ultra/ 2009-006

2.4.5. Matriz de marco lógico

Objetivo general: Incrementar la extracción de genipina proveniente de frutos de <i>Genipa americana L.</i> , implementando parámetros a escala semipiloto a partir de condiciones reportadas a escala de laboratorio.			
Objetivo específico	Actividades	Indicadores	Supuestos
Establecer las mejores condiciones de extracción de genipina a partir <i>Genipa americana L.</i> , por medio de un diseño experimental factorial a escala de laboratorio.	<ul style="list-style-type: none"> • Realizar búsqueda bibliográfica para determinar condiciones de extracción. • Realizar extracción sólido-líquida a escala de laboratorio. 	Relación entre biomasa y solvente de extracción (acetato de etilo) determinado. Condiciones (agitación y tiempo) determinadas.	<ul style="list-style-type: none"> • Disponibilidad de información bibliográfica. • Disponibilidad de solvente a utilizar en la extracción. • Disponibilidad del material vegetal.
Implementar las condiciones de extracción de genipina en planta de extracción semipiloto.	<ul style="list-style-type: none"> • Entrenamiento en el manejo de la planta de extracción. • Realizar extracción sólido-líquido a escala semi piloto. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cantidad de solvente (acetato de etilo) utilizado. • Tiempo de extracción determinado. • Velocidad de agitación determinado. • Cantidad de muestra utilizada. 	<ul style="list-style-type: none"> • Disponibilidad del fruto en el árbol de <i>Genipa americana L.</i> • Disponibilidad de la planta para llevar a cabo el proceso de extracción. • Disponibilidad del solvente necesario para realizar la extracción.
Evaluar la genipina extraída en planta semipiloto por método cromatográfico	<ul style="list-style-type: none"> • Realizar consulta bibliográfica para determinar el método cromatográfico a utilizar. • Realizar curva de calibración del estándar de 	<ul style="list-style-type: none"> • Curva patrón determinada. • Método cromatográfico determinado. • Concentración de genipina en extractos de 	<ul style="list-style-type: none"> • Disponibilidad de los equipos a utilizar. • Disponibilidad de información bibliográfica • Disponibilidad de solventes a utilizar

o (HPLC-PDA).	genipina en HPLC-PDA. • Realizar la cuantificación por el método escogido en HPLC-PDA.	<i>Genipa americana</i> L. determinada.	(acetato de etilo, acetonitrilo).
---------------	---	---	-----------------------------------

2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1. Extracción a escala de laboratorio

Para asegurar las mejores condiciones de extracción sólido-líquido de genipina, se evaluaron mediante un diseño experimental 2^3 en Minitab 18, los siguientes parámetros: relación másica-solvente, tiempo de extracción y velocidad de agitación, implementadas a escala de laboratorio; teniendo así 10 experimentos establecidos por el diseño, que posteriormente se cuantificaron en HPLC-PDA por duplicado, estos resultados se evidencian en la tabla 3.

Tabla 3. Concentración de genipina para cada extracción establecida por el diseño experimental, utilizando el fruto de *Genipa americana* L.

OrdenCorrida	Bloques	Relación Másica (g)-Solvente (mL)	Tiempo de extracción (min)	Velocidad de agitación (rpm)	Cantidad de genipina (ppm)
1	1	1:1	15	0	1709,005
2	1	1:1	15	0	1712,441
3	1	1:5	15	0	1807,049
4	1	1:5	15	0	1811,044
5	1	1:1	15	95	1280,497
6	1	1:1	15	95	1271,713
7	1	1:5	15	95	1986,603
8	1	1:5	15	95	1989,590

9	1	1:1	45	0	1490,797
10	1	1:1	45	0	1495,618
11	1	1:5	45	0	1894,069
12	1	1:5	45	0	1905,915
13	1	1:1	45	95	1395,325
14	1	1:1	45	95	1394,648
15	1	1:5	45	95	1244,245
16	1	1:5	45	95	1220,115
17	0	1:3	30	47,5	1841,947
18	0	1:3	30	47,5	1830,986
19	0	1:3	30	47,5	1863,589
20	0	1:3	30	47,5	1866,859

Para evaluar la concentración en cada uno de los ensayos, se realizó una curva de la calibración con cinco diferentes concentraciones la cual puede observarse en la figura 11. Mediante una regresión lineal, se determina la relación entre la variable X (concentración de la muestra) y Y (área del pico), para interpolar los resultados obtenidos al inyectar cada una de las muestras de la tabla 3. El coeficiente de correlación fue de $R^2=0,9916$, dando un valor cercano a uno, por lo tanto, la cantidad de analito presente en cada muestra puede ser detectada mediante la curva de calibración realizada. El cromatograma obtenido para el ensayo realizado que demostró mayor cantidad de genipina extraída, será evidenciado en la sección de anexos.

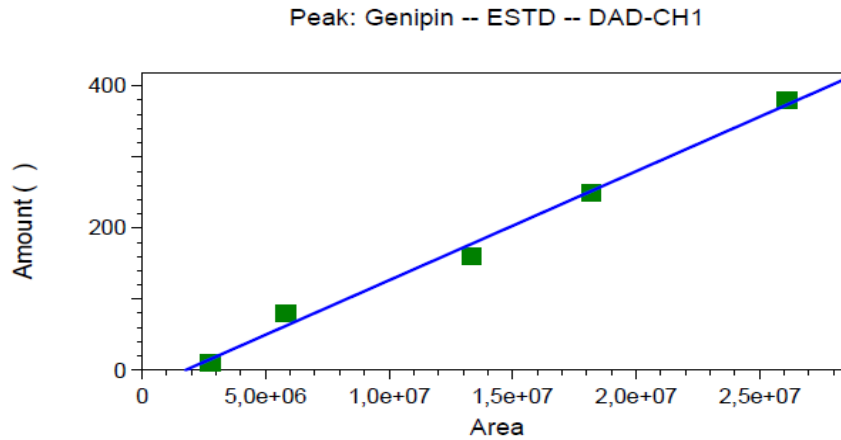


Figura 10. Curva de calibración del diseño experimental de genipina.

En estos resultados se evidencia la presencia de genipina en el fruto de *Genipa americana* L., a través de todos los experimentos propuestos por el diseño factorial. Primeramente, se realizó el DoE de todos los datos obtenidos mediante el diseño factorial. Luego, se ejecutó la prueba de normalidad, debido a que este resultado permite rechazar o no la hipótesis nula de que los datos provienen de una población distribuida normalmente. El valor p que arrojo la prueba de normalidad de Kolmogorov - Smirnov es de 0.578, el cual es mayor al nivel de significancia trabajado de 0,05. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula que indica que los datos cumplen con una distribución normal, como se puede ver en el gráfico 1.

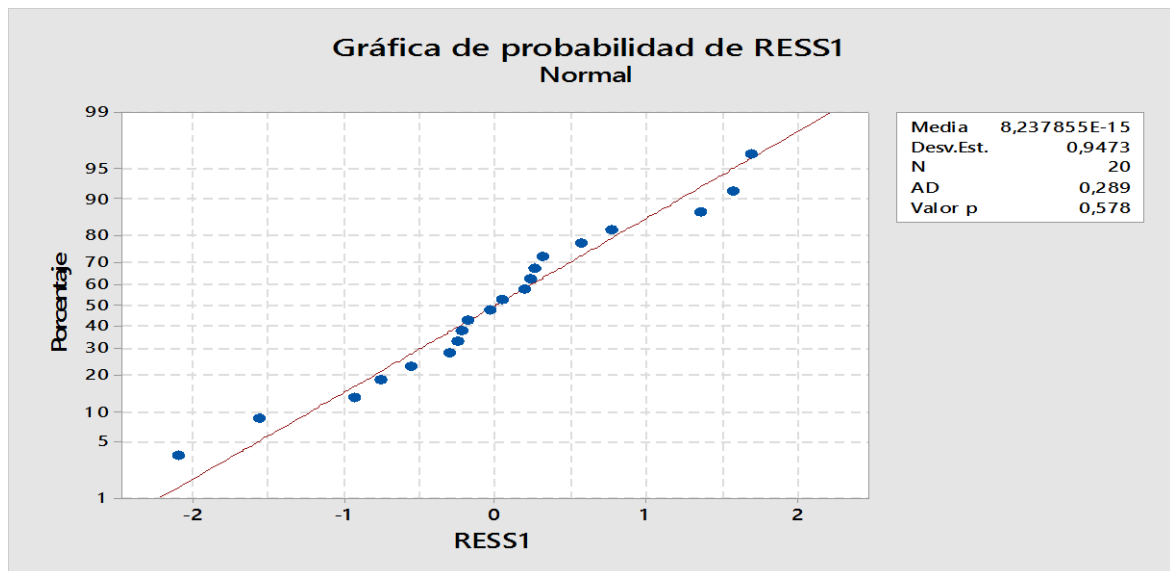


Gráfico 1. Resultados de la prueba de normalidad de para los datos del diseño factorial 2^3 .

Durante el análisis estadístico se realizaron las gráficas de contorno y superficie de respuesta en el software Minitab 18, en las cuales se observa la variación de 2 factores con base a la respuesta del método (cantidad de genipina extraída), donde se toma un tercer factor con un valor constante.

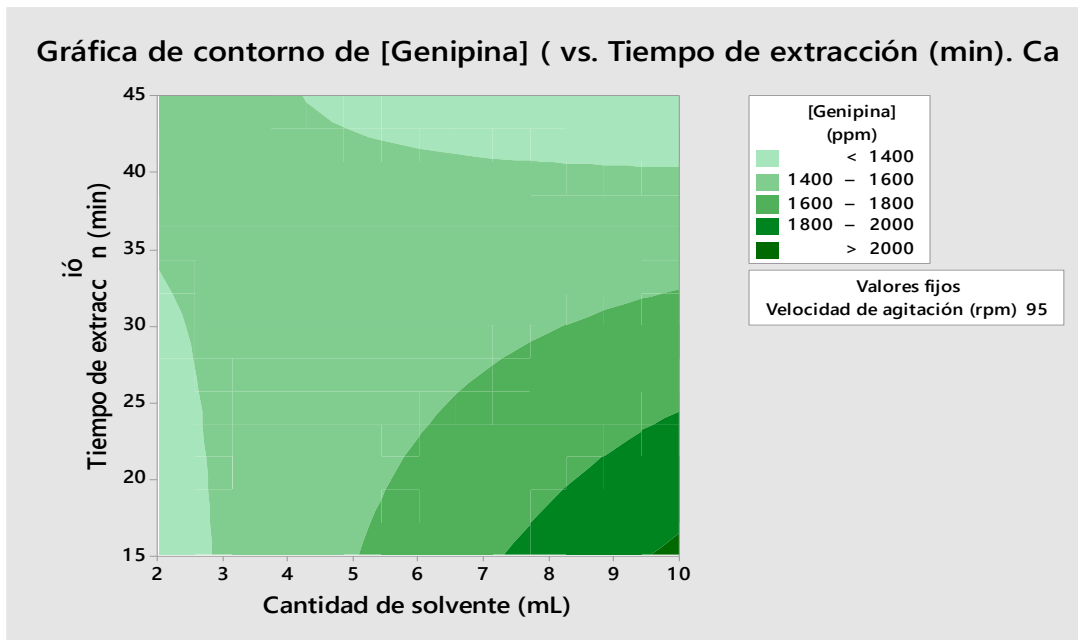


Gráfico 2. Gráfica de contorno Tiempo de extracción (min) vs Cantidad de solvente (mL), teniendo constante la velocidad de agitación en 95 rpm.

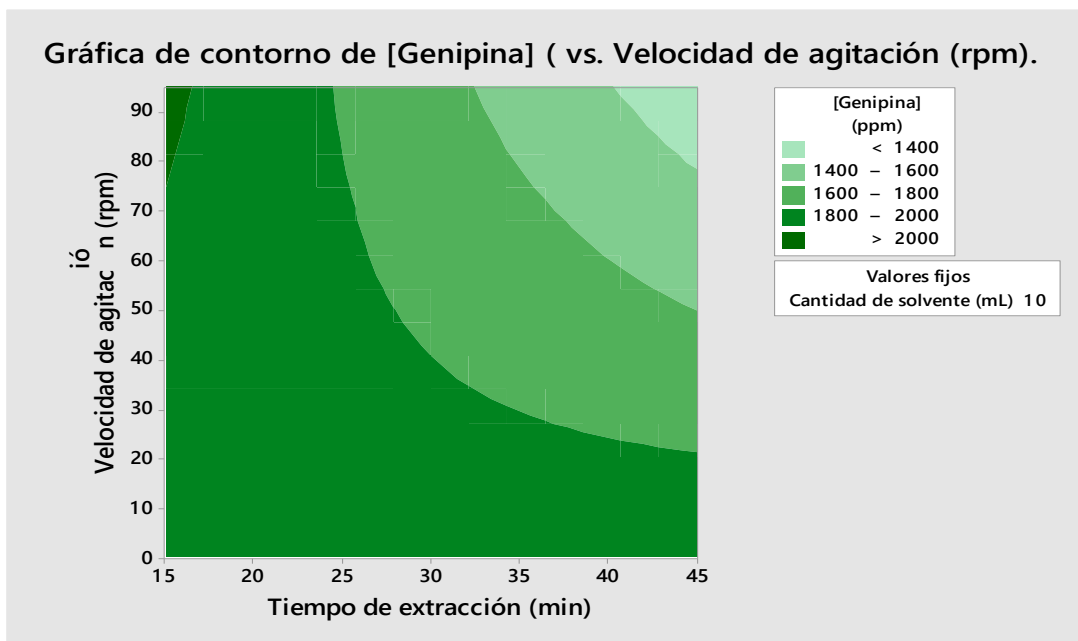


Gráfico 3. Gráfica de contorno Velocidad de agitación (rpm) vs Tiempo de extracción (min), teniendo constante la cantidad de solvente de 10 mL.

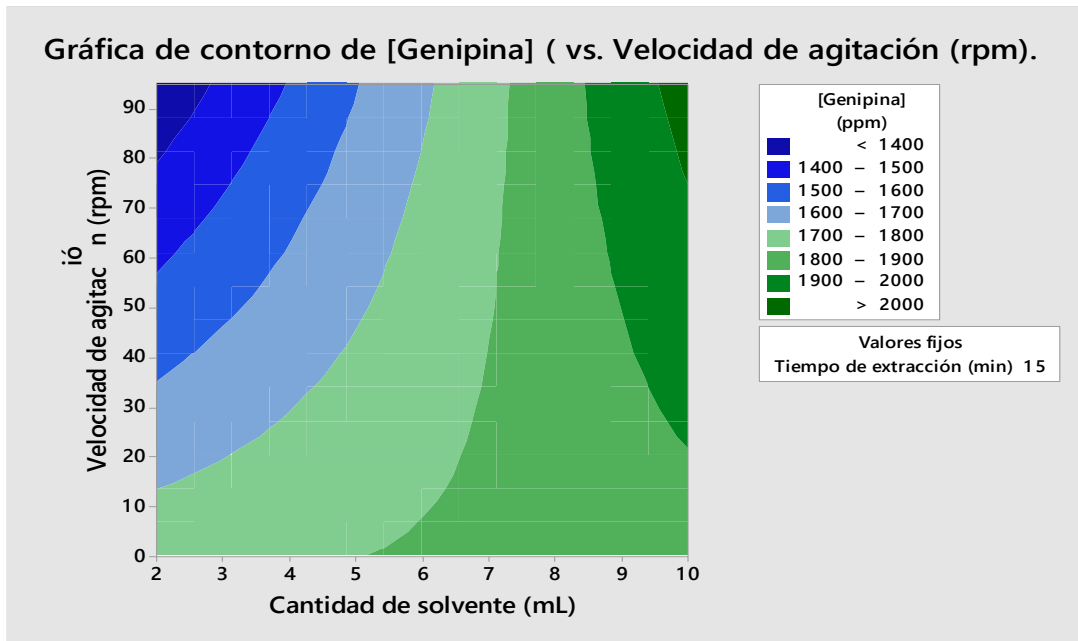


Gráfico 4. Gráfica de contorno Velocidad de agitación (rpm) vs Cantidad de solvente (mL), teniendo constante el tiempo de extracción de 15 min.

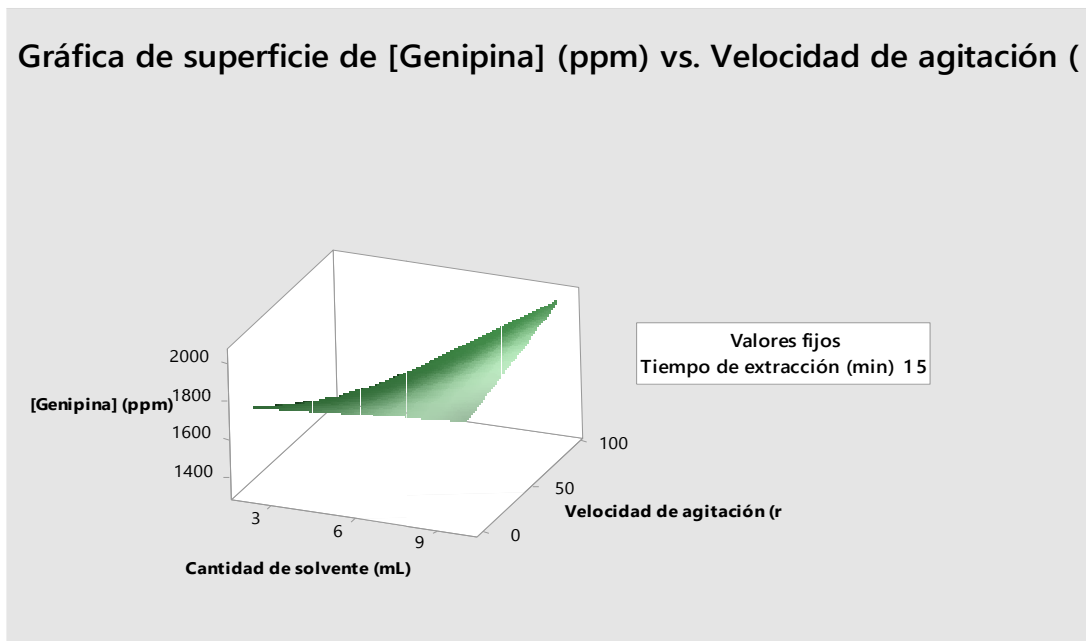


Gráfico 5. Gráfica de superficie Cantidad de solvente (mL) vs Velocidad de agitación (rpm), teniendo constante el tiempo de extracción de 15 min.

Gráfica de superficie [Genipina](ppm)vs.Velocidaddeagitación(min)

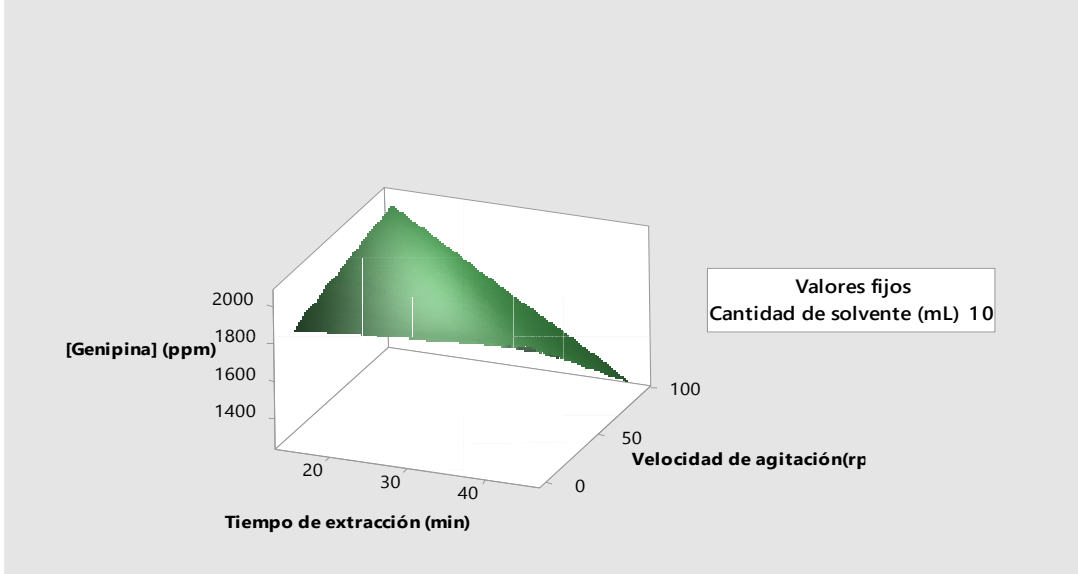


Gráfico 6. Gráfica de superficie Tiempo de extracción (min) vs Velocidad de agitación (rpm), teniendo constante la cantidad de solvente de 10 mL.

Gráfica de superficie de [Genipina](ppm) vs.Tiempo de extracción(min)

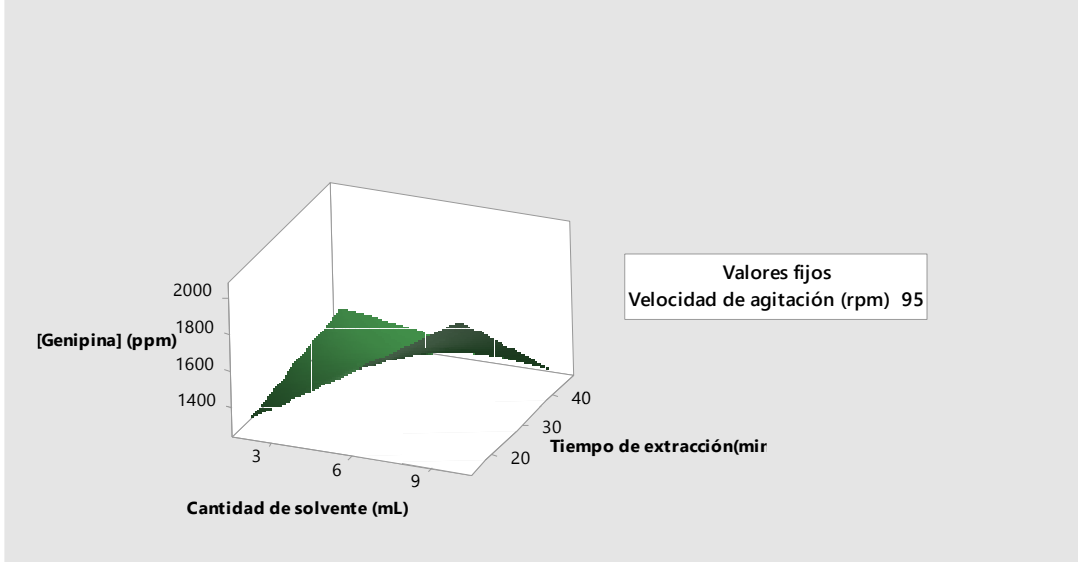


Gráfico 7. Gráfica de superficie Cantidad de solvente (mL) vs Tiempo de agitación (min), teniendo constante la velocidad de agitación en 95 rpm.

Para determinar si cada uno de las variables era estadísticamente significativa se realizó un ANOVA. Donde, se contrastaron los valores p respecto al nivel de significancia del estudio (0,05), para cada uno de los parámetros evaluados como se puede observar en la tabla 4. De acuerdo con los resultados, la cantidad de solvente y la velocidad de agitación son estadísticamente significativos debido a que el valor p es menor al nivel de significancia, mientras que se decide que el tiempo de extracción no es estadísticamente significativo para este trabajo, debido a que su valor p es mayor al nivel de significancia.

Tabla 4. Valores p para cada factor del diseño experimental.

Variable	Valor P
Cantidad de Solvente (mL)	0,011
Tiempo de extracción (min)	0,053
Velocidad de agitación (rpm)	0,013

Sin embargo al evaluar los puntos intermedios, el valor $p = 0.000$ indica que en la zona donde se realizó el experimento aún no se obtiene curvatura, es decir, no hay un punto óptimo. Esto indica que a pesar de haber encontrado una combinación de niveles de los factores donde se maximiza la extracción, aun no se ha llegado al punto de optimización.

Para encontrar dicha zona se debe aplicar el método de la pendiente ascendente, en el cual se pueda determinar el punto a partir de donde se puede desarrollar un diseño compuesto central, que permita determinar el punto exacto donde se optimiza la extracción de genipina.

De acuerdo a esto, en el diseño experimental 2^3 se determinaron las mejores condiciones de extracción que maximizan la cantidad extraída de genipina, por medio de la opción de Minitab de “maximización de respuesta”, el cual arrojo que la mejor relación másica-solvente es 1:5, tiempo de extracción de 15 min y velocidad de agitación de 95 rpm, como se muestra en el gráfico 8.

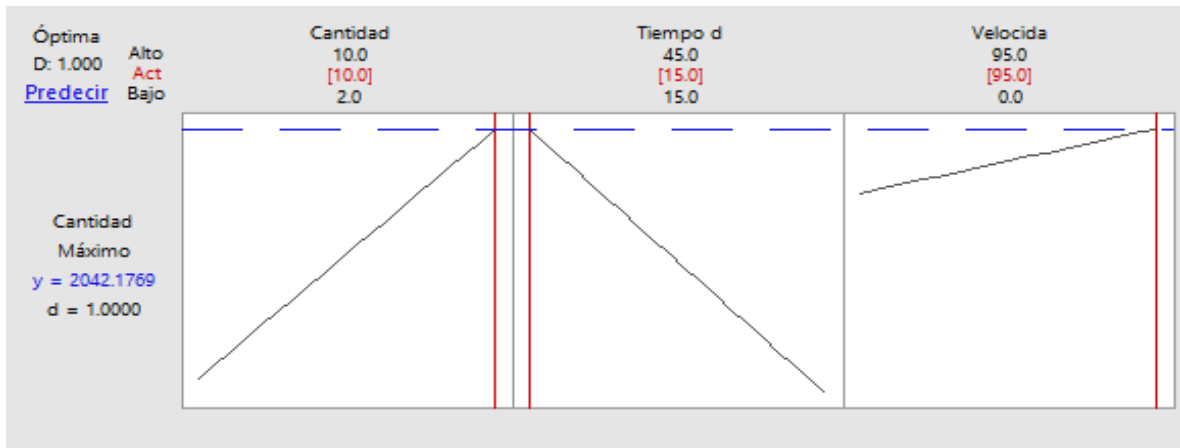


Gráfico 8. Maximización de las condiciones evaluadas (Cantidad de solvente (mL), tiempo de extracción (min) y velocidad de agitación (rpm)) en respuesta a maximizar la cantidad de genipina extraída.

Después de ajustar los parámetros para la extracción a escala de laboratorio, se procedió a realizar la extracción en la planta semipiloto.

2.5.2. Extracción en planta semipiloto

Para la extracción en la planta semipiloto fueron utilizados 32 frutos, lo necesario para completar 2 Kg, los cuales fueron triturados (figura 12) y depositados en el tanque percolador, posterior a esto se adicionaron 10 L de acetato de etilo, siguiendo con la mejor relación másica:solvente (1:5) encontrada en el diseño experimental; así mismo, se acondicionó la velocidad de agitación de 95 rpm en el tablero de control. Aunque la opción de maximizador de respuesta arrojada por Minitab, indicó que el valor de tiempo de extracción para la genipina era de 15 min, la condición elegida fue de 2 horas.

Este valor fue escogido basado en la mayor cantidad de fruto utilizada y el tiempo mínimo que por costos debe realizar la planta de extracción. Además, de acuerdo al análisis de los datos, el valor p para el tiempo de extracción es mayor al 0.05, lo cual hace que este factor no sea estadísticamente significativo para esta investigación.



Figura 11. Fruto de *Genipa americana* L. triturado.

Una vez terminada la extracción, se llevó el extracto a rotaevaporar para dejar la muestra libre de acetato de etilo (figura 13); sin embargo, por este medio no pudo eliminarse el agua proveniente del fruto.

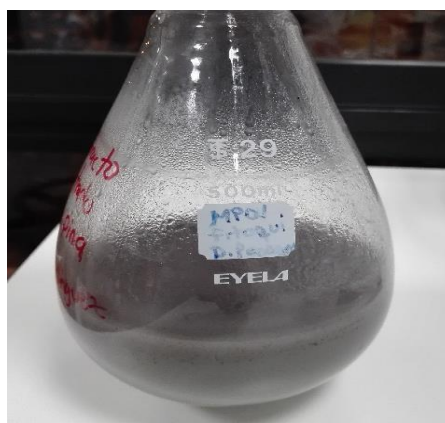


Figura 12. Extracto Concentrado.

Por lo tanto, el concentrado se depositó en un recipiente al cual se le añadió 170 g de silica y se mezcló; se introdujo en un horno Binder a 50°C por 3 días hasta sequedad, resultando así, un polvillo blanco como se puede ver en la figura 14.

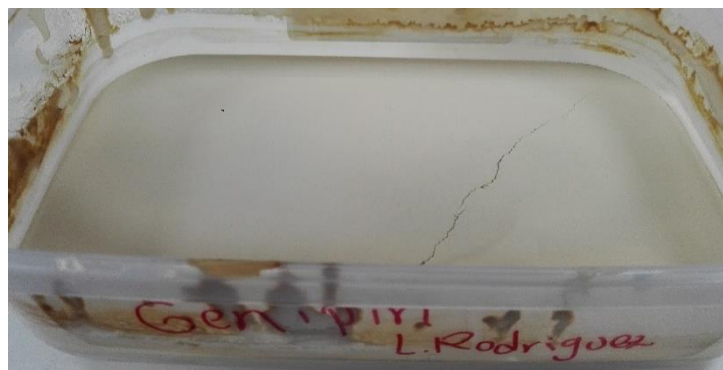


Figura 13. Extracto con silica después de tres días en horno a 50°C.

Para lograr purificar la muestra y obtener el metabolito de interés (genipina), se recurrió al método de cromatografía de adsorción en columna, utilizando aproximadamente 6 L de acetato de etilo como fase móvil y silica como fase estacionaria. Al adicionar el acetato de etilo, por efecto de la gravedad, la muestra se movió a través de la columna, como puede observarse en la figura 15, permitiendo así, la separación de los diferentes componentes de la muestra.

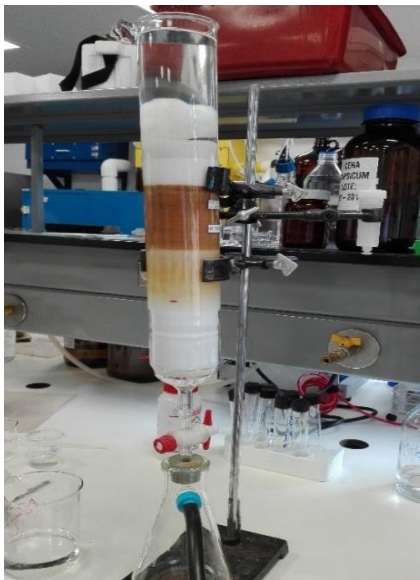


Figura 14. Purificación de genipina por cromatografía de adsorción en columna.

En este caso se obtuvieron 9 fracciones (figura 16), las cuales previamente fueron llevadas a rotaevaporar, para quitar cualquier residuo de solvente y así lograr obtener muestras de mayor pureza.

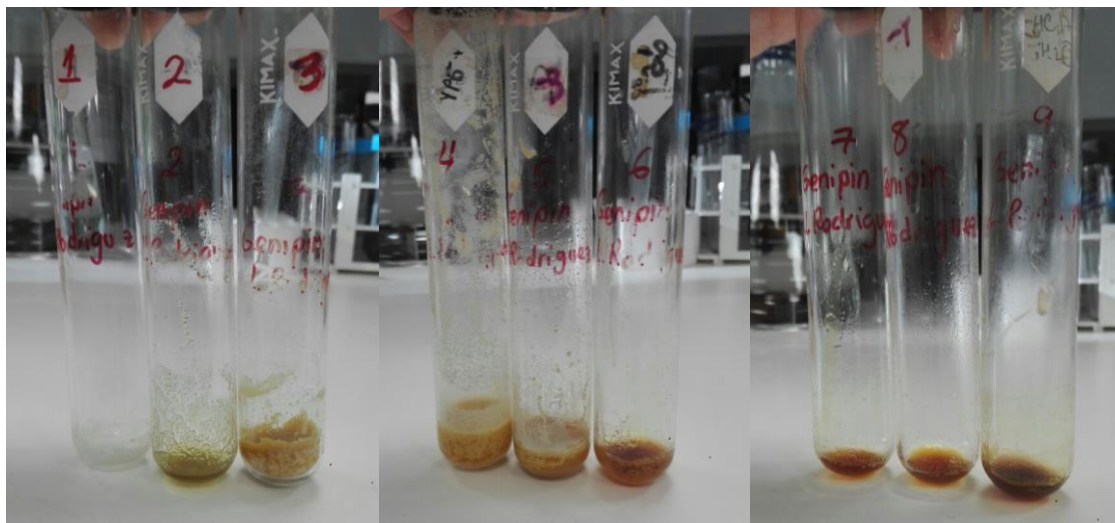


Figura 15. Fracciones obtenidas por purificación en cromatografía de adsorción en columna.

Para verificar en cada fracción obtenida la existencia de genipina, fueron evaluadas por TLC usando diclorometano:acetato de etilo en proporción 3:7, como fase móvil y derivatizadas con el reactivo vainillina- ácido sulfúrico. En la figura 17, se evidencia la fuerte presencia de una banda violeta, característica de la genipina con un factor de retención (Rf) igual al del estándar.

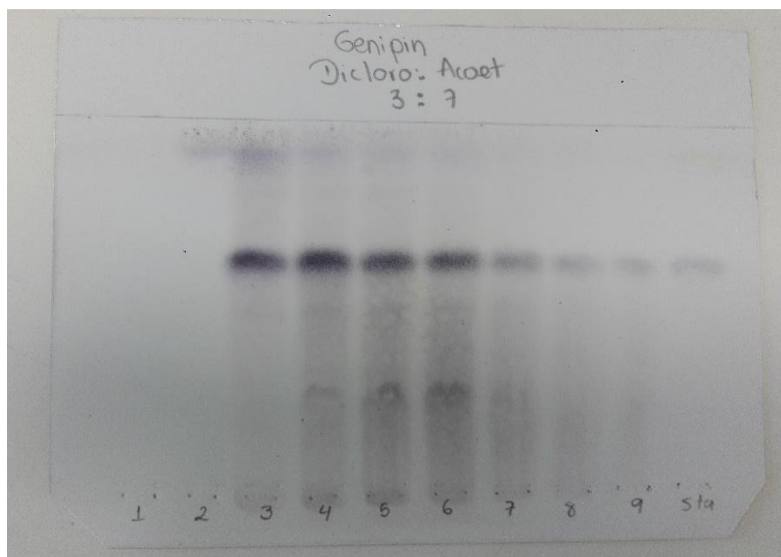


Figura 16. Evaluación por TLC de fracciones obtenidas por purificación en cromatografía de adsorción en columna.

Teniendo en cuenta, los resultados reportados en la tabla 5, se agruparon los tubos 3-5 y 2,6-9, las cuales se adicionaron en cajas petri de vidrio como se observa en la figura 18. Se evidenció que estas muestras aún no se encontraban totalmente secas, por esto, se introdujeron en un horno Binder a 50°C por 48 horas.



Figura 17. Muestras agrupadas en caja petri Izquierda: tubos 3-5, Derecha: tubos 2,6-9.

Por lo tanto, la cantidad de genipina extraída en la planta semipiloto y su posterior purificación por cromatografía de adsorción en columna fue de 12,94 g, repartido en la agrupación que se hizo previamente, donde las muestras 3-5 pesaron 9,06 g; mientras que las de 2,6-9 fue de 3,88 g. Las muestras fueron almacenadas en dos viales de vidrio como se puede ver en la figura 19.

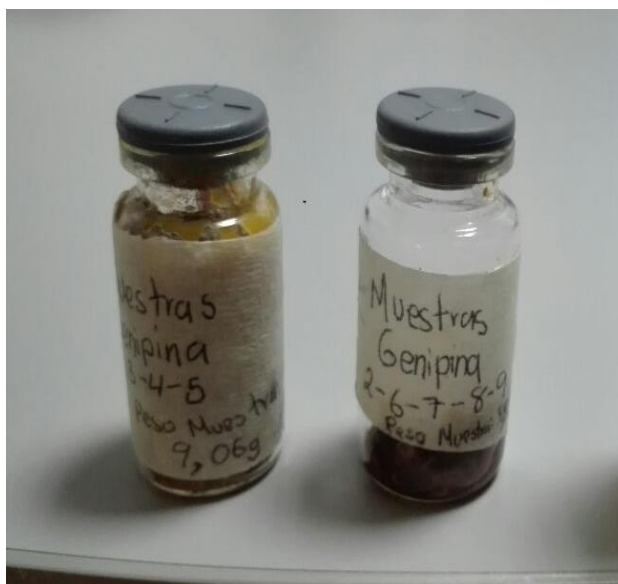


Figura 18. Genipina Obtenida.

Finalmente, el porcentaje de rendimiento de esta extracción fue de 0,65%, el cual es similar al obtenido por (Santa Culma, 2017) con un 0,61%, mientras que es inferior al obtenido por (Djerassi, et al., 1960), con un 1-3%.

Debido a que es un porcentaje de rendimiento de extracción satisfactorio, se propone un estudio económico que pueda ser utilizado para dar viabilidad de la extracción posterior a escala industrial.

2.5.3. Evaluación de la genipina extraída por HPLC-PDA

Con el fin de verificar la cantidad extraída y el porcentaje de pureza de genipina, se realizó un análisis en HPLC-PDA, cada muestra se inyectó por duplicado, obteniendo así los resultados presentados en la tabla 5.

Tabla 5. Valoración de genipina por HPLC-PDA.

	Concentración de genipina (ppm)	Pureza (%)
Tubo 1 Rep 1	-	-
Tubo 1 Rep 2	-	-
Tubo 2 Rep 1	3,267	7,35
Tubo 2 Rep 2	3,491	7,90
Tubo 3 Rep 1	1009,908	84,79
Tubo 3 Rep 2	999,466	83,85
Tubo 4 Rep 1	1516,210	88,88
Tubo 4 Rep 2	1499,399	89,67
Tubo 5 Rep 1	1017,902	83,35
Tubo 5 Rep 2	1007,627	83,49
Tubo 6 Rep 1	745,327	79,09
Tubo 6 Rep 2	740,015	79,09
Tubo 7 Rep 1	715,919	77,13
Tubo 7 Rep 2	714,666	77,13
Tubo 8 Rep 1	489,870	75,45
Tubo 8 Rep 2	496,998	75,53
Tubo 9 Rep 1	556,856	73,03
Tubo 9 Rep 2	551,407	72,68

Para poder evaluar la cantidad de genipina extraída se hizo una curva de calibración similar a la realizada en el diseño experimental (figura 20), en donde el coeficiente

de correlación fue de $R^2=0,9990$, el cual indica que la cantidad de analito presente en cada tubo, va a ser detectada.

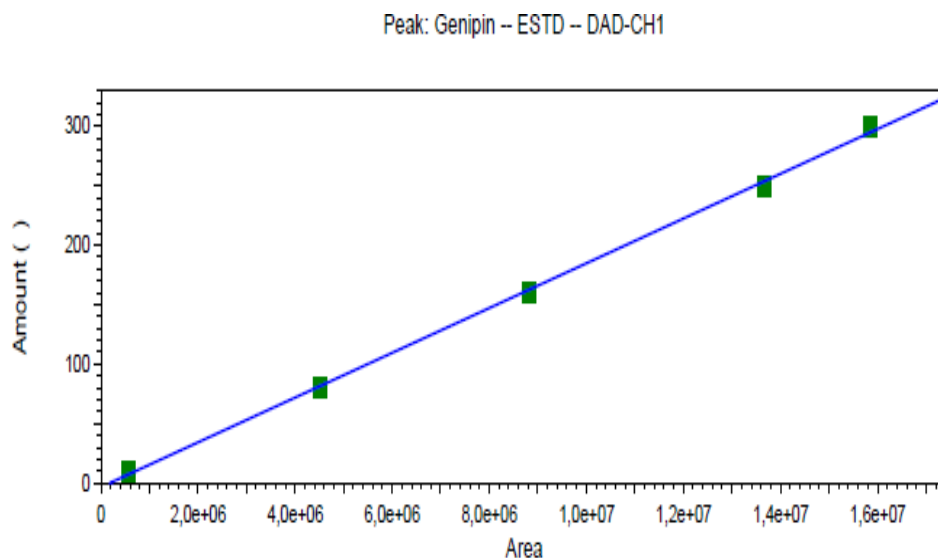


Figura 19. Curva de calibración extracción semipiloto de genipina.

Se presentan a continuación los cromatogramas obtenidos en los tubos de ensayo 3-5, los cuales presentaron mayor cantidad de genipina extraída a un tiempo de retención de 3,9 min. Los cromatogramas obtenidos en las muestras 2,6-9 se presentan en la sección de anexos, estos presentan igual tiempo de retención de la genipina.

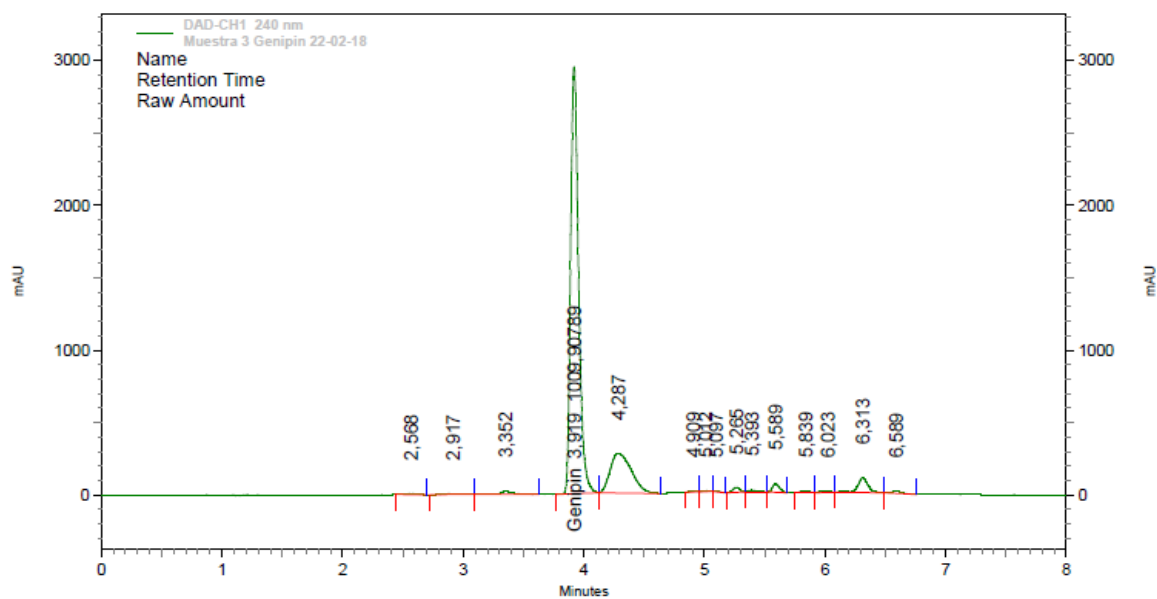


Figura 20. Cromatograma de la genipina extraída y purificada del tubo 3.

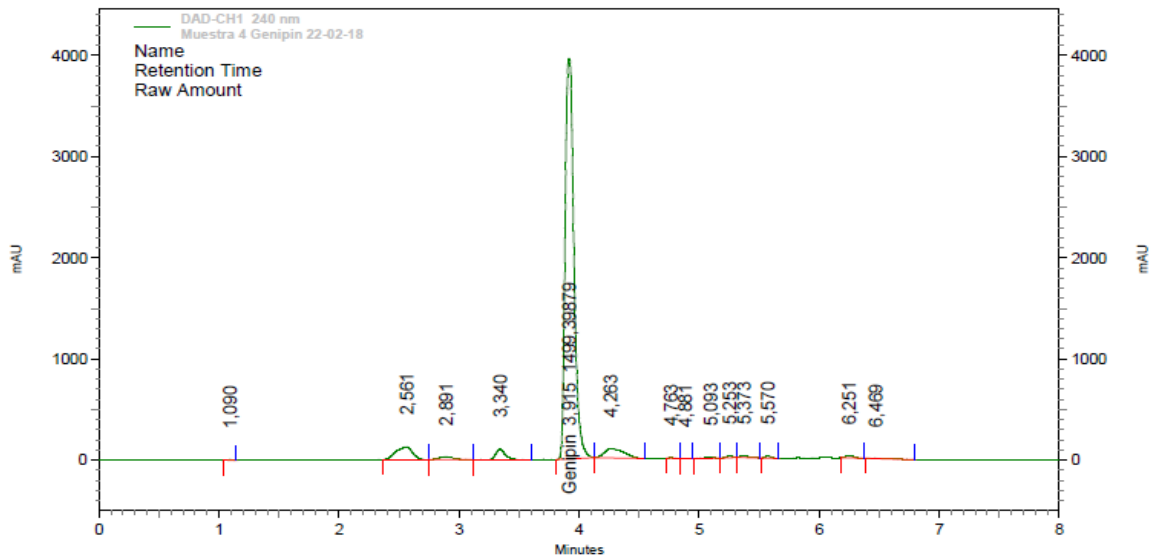


Figura 21. Cromatograma de la genipina extraída y purificada del tubo 4.

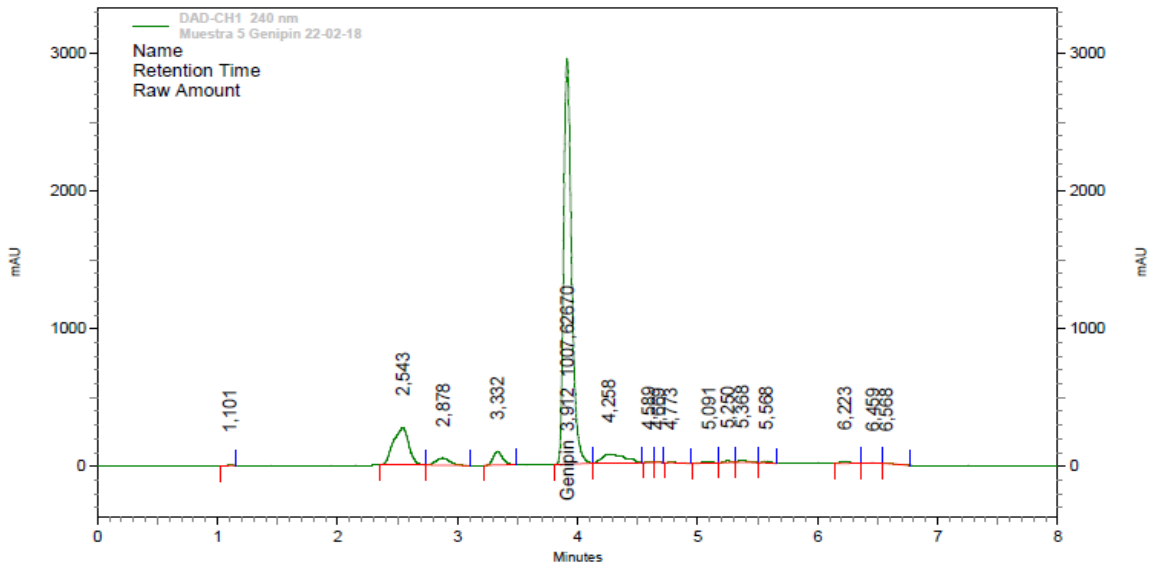


Figura 22. Cromatograma de la genipina extraída y purificada del tubo 5.

El cromatograma obtenido en el diseño experimental tuvo un tiempo de retención de 3,6 min a diferencia del realizado en la extracción en la planta semipiloto que fue de 3,9 min, el cual fue mínimo y no interfirió en la detección de la genipina. Esto es debido al uso de la pre-columna en el análisis de la genipina extraída en la planta semipiloto, la cual protege la columna atrapando contaminantes y removiendo partículas, por lo tanto, aumenta el tiempo de vida de la columna; sin embargo, puede alterar los tiempos de retención (Phenomenex Inc, 2008).

2.6. CONCLUSIONES

Se establecieron las condiciones de extracción para la genipina a partir del fruto de *Genipa americana L.*, obteniendo valores de 1:5, 95 rpm y 2 horas para los parámetros de relación másica (g): solvente (mL), velocidad de agitación y tiempo de extracción, respectivamente.

Se realizó la extracción sólido-líquido de genipina a partir del fruto de *Genipa americana L.*, implementando las condiciones obtenidas a escala de laboratorio en la planta de extracción semipiloto, obteniendo 12,94 g de genipina con un porcentaje de rendimiento satisfactorio de 0,65%.

Se evaluó el contenido y el porcentaje de pureza en HPLC-PDA de genipina en cada una de las muestras obtenidas después de la purificación por cromatografía de adsorción en columna, obteniendo un tiempo de retención en 3,9 minutos, valores de concentración entre 3 -1516 ppm y porcentajes de pureza entre 7-89%, con una columna Kinetex® 2.6 µm 150 mm x 2.1 mm.

2.7. RECOMENDACIONES

Evaluar la metodología en las mismas condiciones descritas en la investigación, con fruto de *Genipa americana L.*, en distintas épocas del año, debido a que es un fruto estacional y dependiendo de la madurez del fruto puede obtenerse una cantidad de genipina distinta.

Se recomienda realizar un diseño de superficie-respuesta mediante un diseño compuesto central, donde se pueda encontrar el punto óptimo de extracción de genipina.

Se recomienda realizar un procedimiento operativo estándar (POE) y la validación del método de extracción en la planta semipiloto en búsqueda de tener un proceso que sea rutinario, robusto y exacto en la obtención de genipina.

Por otro lado, es importante que la metodología para evaluar la genipina por HPLC-PDA sea validado, para así, darle mayor validez y confiabilidad a los resultados obtenidos.

2.8. REFERENCIAS

- Dionex Corporation. (2003). *PDA-100 PHOTODIODE ARRAY DETECTOR*. Obtenido de <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Man-031644-PDA-100-Photodiode-Array-Detector-Man031644-EN.pdf>
- Alvarez Ochoa , G. (2013). Extracción, caracterización y valoración de genipina a partir del fruto de la genipa americana.
- Bentes, A., & Mercadante, A. (2014). Influence of the stage of ripeness on the composition of iridoids and phenolic compounds in genipap. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(44), 10800-10808. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.1021/jf503378k>
- Bentes, A., L. de Souza, H., maya-Farfan, J., Lopes, A., & G. de Faria, L. (2014). Influence of the composition of unripe genipap (*Genipa americana L.*) fruit on the formation of blue pigment. *J Food Sci Technol*. doi:10.1007/s13197-014-1651-9
- Brauch, J. (2016). *Handbook on natural pigments in food and Beverages: Industrial applications for improving food color*. (I. Carle, & R. Schweiggert, Edits.) Cambridge: Woodhead Publishing.
- Chemspider*. (s.f.). Recuperado el 05 de Mayo de 2018, de Genipin: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.390864.html?rid=5453c682-22b2-43a1-9c35-992f0bb7f580>
- Costa Lima Porto, R., Sousa Cardoso, B., dos Anjos Barros, N., Ferreira Cunha, E., da Mota Araújo, M., & dos Reis Moreira-Araújo, R. (2014). Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Genipa Americana L.* (Jenipapo) of the Brazilian Cerrado. *Journal of Agriculture and Environmental Sciences*, 3, 51-61.
- Djerassi, C., Nakano, T., AN, J., Zalkow, L., Eisenbraun , E., & Shoolery, J. (1960). Terpenoids. XLVII. The structure of genipin. *J Org Chem*, 26, 1192–1206.
- Endo , T., & Taguchi , H. (1973). The constituents of *Gardenia jasminoides* geniposide and genipin-gentiobioside. *Chem Pharm Bull*, 21, 2684-2688.
- Esquivel Soto, E., & Leal Guadarrama, L. (2004). *CROMATOGRAFÍA DE FASE REVERSA*. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO- INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, CUERNAVACA, MORELOS. Obtenido de http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia_de_fase_reversa.pdf

- FAO, O. D. (2014). *En: El estado de los bosques del mundo. Potenciar los beneficios socioeconómicos de los bosques* (1 ed ed.). Roma (Italia).
- Fernandes, F., & Rodrigues, S. (2012). Ultrasound as pre-treatment for drying of genipap (*Genipa americana* L.). *Int J Food Eng*, 8, 1556-3758.
- Ferreira, M. (2015). Introduction mapping time, space and the body: Indigenous knowledge and mathematical thinking in Brazil. *Rotterdam: SensePublishers*, 1-28.
- Francis, J. (1993). *Genipa americana* L. Jagua, genipa. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, 1-5.
- GBIF Backbone Taxonomy. (2017). *Genipa americana* L. en la Secretaría de GBIF. *Catálogo de la vida*. Recuperado el 14 de Noviembre de 2017, de <https://www.gbif.org/species/2895593>
- Genipa, L. (1759). *Genipa americana*. *Systema Naturae*, 931, 1-11.
- I, G. d. (2011). *MÉTODOS FÍSICOS DE SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN*. Obtenido de <http://www.sinorg.uji.es/Docencia/FUNDQO/TEMA11FQO.pdf>
- Ibarz, A. (2005). *Operaciones unitarias en la ingeniería de alimentos*. Madrid: Mundi prensa libros.
- INVIMA. (2014). *Colorante Natural Extracto de Jagua*. Bogotá: Comisión Revisora-Sala especializada de alimentos y bebidas alcohólicas .
- Kim , S., Kim, J., Lee , D., Kwak , J., & Lee , S. (2010). Genipin protects lipopolysaccharide-induced apoptotic liver damage in D-galactosamine-sensitized mice. *Eur J Pharmacol*, 635, 188-193.
- Lárez Velásquez, C., Rivas, A., & Santos Ocanto, I. (2014). Obtención de Genipina a partir de frutos de caruto (*Genipa americana* L.) del llano venezolano. *Avances en Química*, 9(2), 75-86.
- Marcilla Gomis, A. (1998). *Introducción a las operaciones de separación cálculo por etapas de equilibrio* .
- Mi, F., Shyu, S., & Peng, , C.-K. (2005). Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin. *Journal of Polymer Science A: Polymer Chemistry*, 10.
- Náthia-Neves, G., Gadioli Tarone, A., Martelli Tosi, M., Maróstica Júnior, M., & A. Meireles, M. (2017). Extraction of bioactive compounds from genipap (*Genipa americana* L.) by pressurized ethanol: Iridoids, phenolic content and

antioxidant activity. *Food Research International*.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.041>

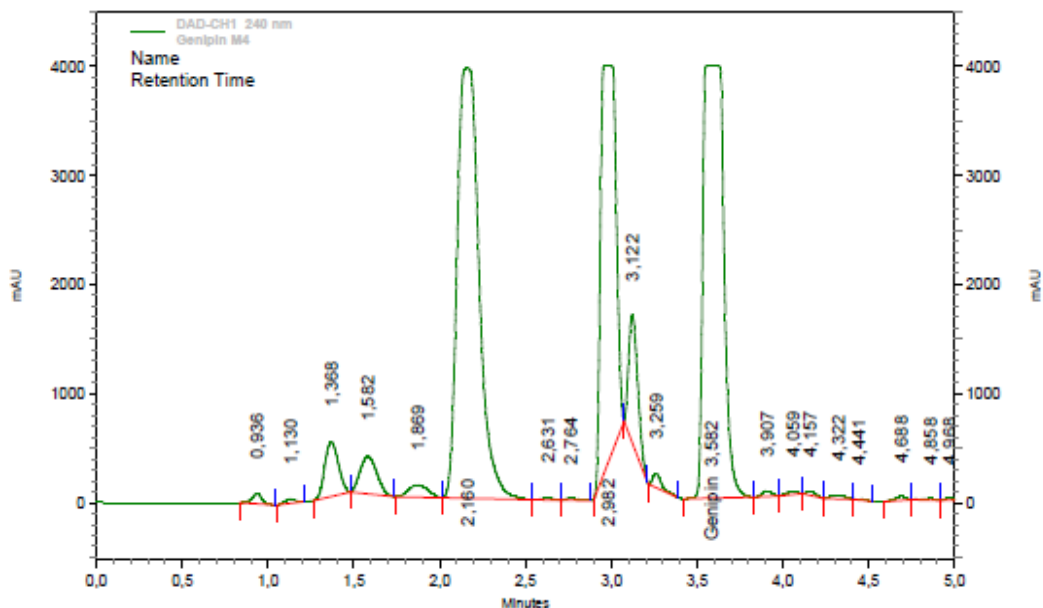
- Neri-Numa, I., Pessoa, M., Paulino, B., & Pastore, G. (2017). Genipin: A natural blue pigment for food and health purposes. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 271-279.
- Perera, J. (Mayo de 2009). *Concentracion y Combustion de Vinaza*. Obtenido de Yumpu: <https://www.yumpu.com/es/document/view/4813853/concentracion-y-combustion-de-vinazas-tucuman>
- Phenomenex Inc. (2008). *Phenomenex*. Obtenido de Guard HPLC Columns: <http://www.phenomenex.com/guard-hplc-column>
- PSE, S. (2016). MANUAL DE OPERACIÓN PROCESS SOLUTIONS AND EQUIPMENT. 37, 1-41.
- Ramos de la peña , A., G. C. Renard, C., Montañez, J., Reyes-Vega, M., & Contreras-Esquivel, J. (2014). A review through recovery, purification and identification of genipin. *Springer Science+Business Media*. doi:10.1007/s11101-014-9383-z
- Ramos-de-la-Peña, A., Renard, C., Wicker, L., Montañez, J., García-Cerda, L., & Contreras-Esquivel, J. (2014). Environmental friendly cold-mechanical/sonic enzymatic assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana*). *Ultrasonics Sonochemistry*, 21, 43-49.
- Robinson, J., Skelly Frame, E., & Frame II, G. (s.f.). *Undergraduate instrumental analysis*. 6ta Edtion.
- Santa Culma, J. C. (2017). *EXTRACCIÓN DE GENIPINA EN PLANTA SEMIPILOTO PARA SER EMPLEADO COMO ENTRECruzante DE HIDROGELES*.
- Sigma Aldrich*. (s.f.). Obtenido de Columnas HPLC Ascentis C18: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/hplc/columns/ascentis-hplc-columns/c18.html>
- Skoog, D., Holler, F., & Nieman, T. (s.f.). *Principios de análisis instrumental*. 5ta Edition.
- Swartz, M. (2010). Hplc Detectors: a Brief Review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 33(9-12), 1130–1150. Obtenido de http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-11132007-235550/unrestricted/Gil_Zapata_dis.pdf

UNCTAD, T. U. (2005). *Genipa americana* jagua, huito. *Market Brief in the European Union for selected natural ingredients derived from native species*.

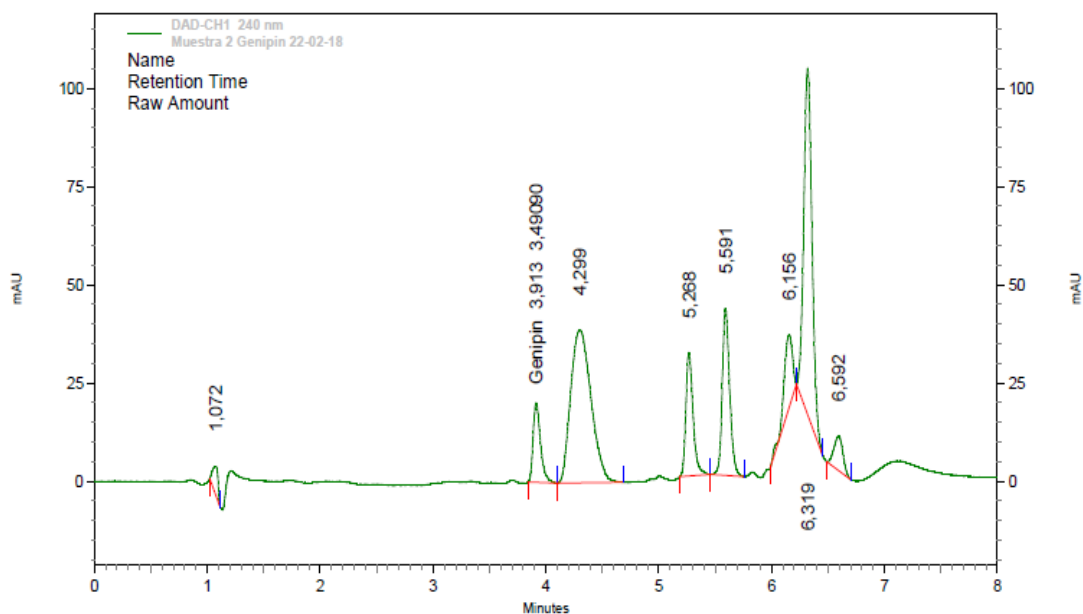
Winotapun , W., Opanasopit , P., & Ngawhirunpat, T. (2013). One enzyme catalyzed simultaneous plant cell disruption and conversion of released glycoside to aglycone combined with in situ product separation as green one-pot production of genipin from *Gardenia* fruit. *Enzym Microbial Technol*, 53, 92-96.

2.9. ANEXOS

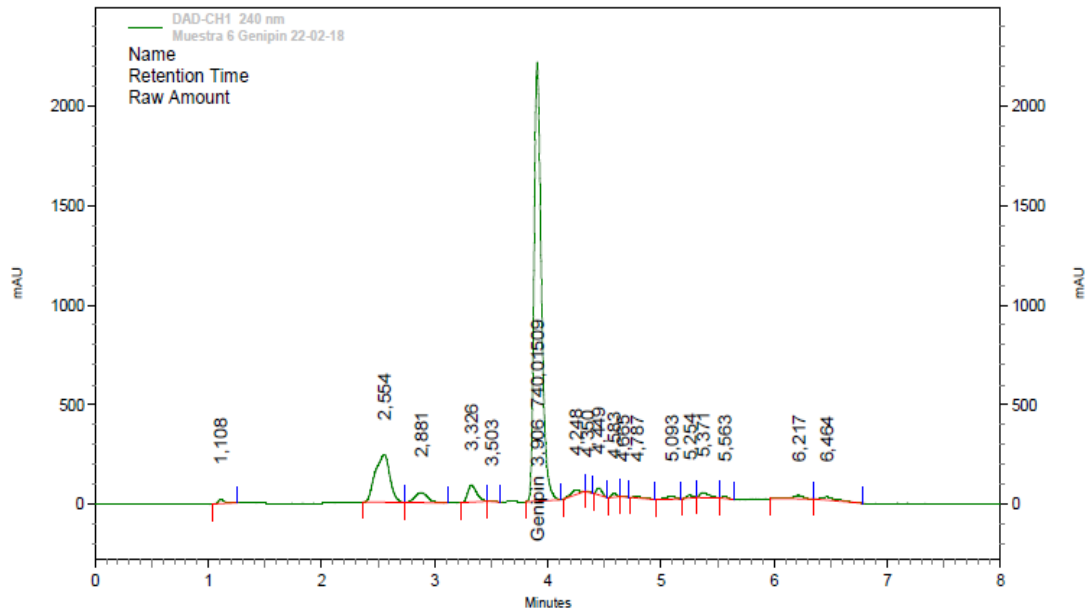
Anexo 1. Cromatograma de la genipina extraída en el diseño experimental, bajo las mejores condiciones de extracción: Relación másica (g): solvente (mL) 1:5, tiempo de extracción 15 min y velocidad de agitación 95 rpm.



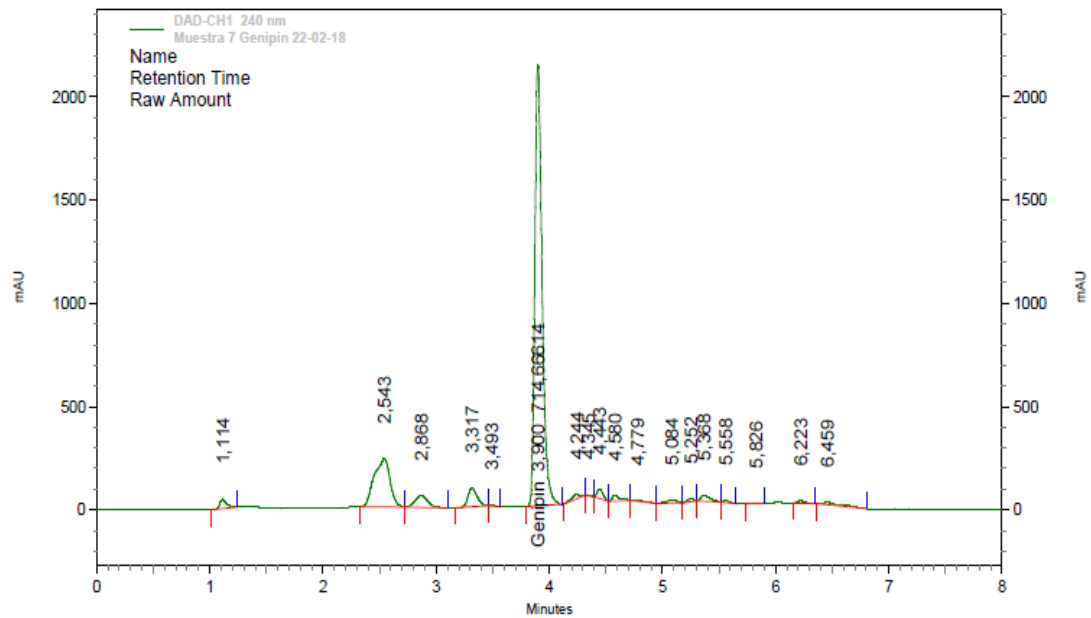
Anexo 2. Cromatograma de la genipina extraída y purificada del tubo 2.



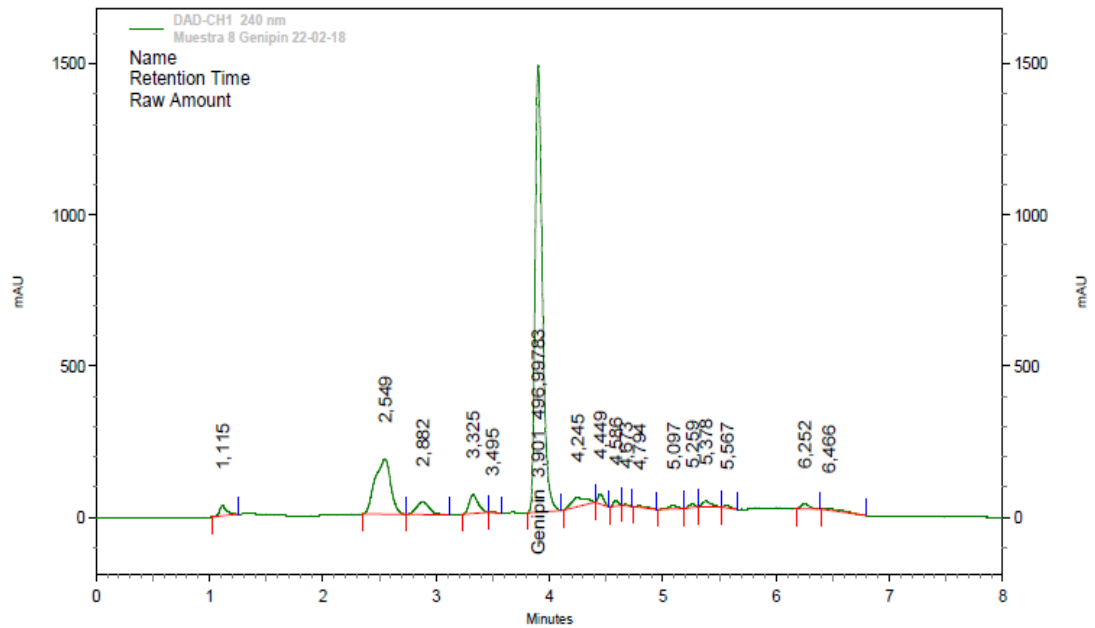
Anexo 3. Cromatograma de la genipina extraída y purificada del tubo 6.



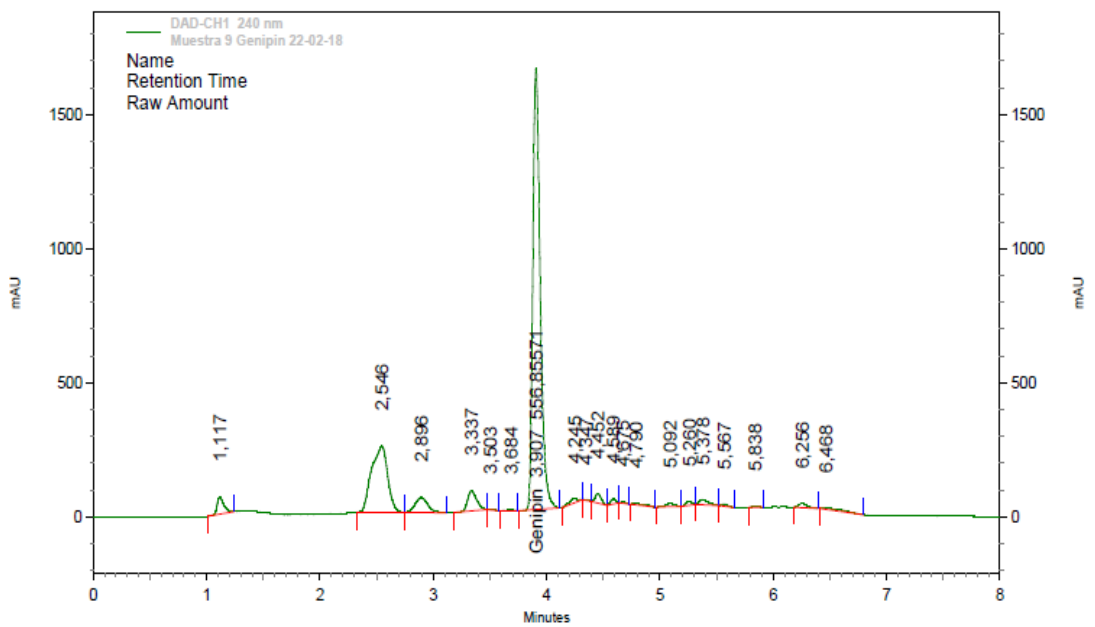
Anexo 4. Cromatograma de la genipina extraída y purificada del tubo 7.



Anexo 5. Cromatograma de la genipina extraída y purificada del tubo 8.



Anexo 6. Cromatograma de la genipina extraída y purificada del tubo 9.



FÉ DE ERRATAS

La Universidad Icesi aclara que este proyecto de grado se ejecutó bajo el Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos y Productos Derivados N° 108 del 07 de mayo de 2018 y del Otrosí No. 1 del 17 de agosto del mismo año, en el marco del control que adelanta el Grupo de Recursos Genéticos de la Dirección de Bosques, Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Así como de la Resolución 0526 del 20 de mayo de 2016 de la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA). Las muestras vegetales fueron recolectadas en la ciudad de Cali, Valle del Cauca, Colombia en las coordenadas geodésicas 3°23'09.1"N 76°32'39.6"W y 3°21'01.0"N 76°32'14.1"W.

11 de marzo de 2020