

**EXTRACCIÓN DE GENIPINA EN PLANTA SEMIPILOTO PARA SER
EMPLEADO COMO ENTRECruzANTE DE HIDROGELES**

JUAN CARLOS SANTA CULMA

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

PROGRAMA DE QUÍMICA FARMCEÚTICA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS

SANTIAGO DE CALI

2017

**EXTRACCIÓN DE GENIPINA EN PLANTA SEMIPILOTO PARA SER
EMPLEADO COMO ENTRECruzANTE DE HIDROGELES**

JUAN CARLOS SANTA CULMA

**Proyecto de grado para optar por el título de pregrado en Química
Farmacéutica**

Tutores

Guillermo León Montoya Peláez Ph.D

Nora Elena Valderruten Posso Ph.D

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

PROGRAMA DE QUÍMICA FARMCEÚTICA

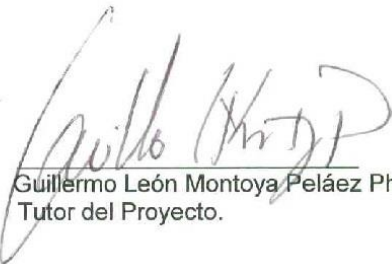
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS

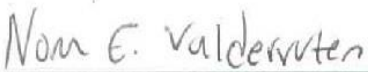
SANTIAGO DE CALI

2017

APROBADO POR:


Constain Hugo Salamanca Mejia Ph.D
Evaluador


Guillermo León Montoya Peláez Ph.D
Tutor del Proyecto.


Nora Elena Valderruten Posso Ph.D
Co-Tutor del Proyecto.

Santiago de Cali, 7 de noviembre de 2017

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todas las bendiciones recibidas, a mis padres y abuela, seguramente sin sus voces de aliento en los momentos más difíciles esto no hubiera sido posible, a mis amigos por las diversas situaciones que dejaron experiencias para toda la vida, a mis compañeros de laboratorio por su incondicional apoyo cuando fue necesario, finalmente a los profesores tutores por aportar su conocimiento en este trabajo.

Tabla de Contenido

1. Introducción	12
2. Descripción del proyecto.....	13
2.1. Planteamiento de la pregunta de investigación y justificación.	13
2.2. Marco teórico y estado del arte.....	14
2.2.1. Genipa americana	14
2.2.2. Genipina.....	14
2.2.3. Técnica de extracción.	17
2.2.4. Descripción del equipo y especificaciones técnicas.....	18
2.2.5. Potenciales usos de la genipina.	18
2.3. Objetivos.....	21
2.3.1. Objetivo general	21
2.3.2. Objetivos específicos	21
2.4. Metodología	22
2.4.1. Recolección y tratamiento del material vegetal	22
2.4.2. Extracción de genipina en planta semipiloto	22
2.4.3. Preparación de la muestra	23
2.4.4. Cromatografía Automatizada	23
2.4.7. Uso como entrecruzante de quitosano.....	24
2.5. Resultados y discusión	25
2.5.1. Extracción de la genipina y preparación de la muestra	25
2.5.2. Cromatografía Automatizada	26
2.5.3. Obtención del metabolito secundario	28
2.5.4. Caracterización de la genipina	30
2.5.5. Hidrogeles de quitosano.....	34
2.6. Conclusiones	36
2.7. Recomendaciones	37
2.8. Bibliografía.....	38
2.9. Anexos.....	42

Fé de erratas

Lista de Tablas

Tabla 1. Condiciones de operación de la planta de extracción.....	25
Tabla 2. Pesos del balón vacío y con el producto extraído.	29

Lista de Figuras

Figura 1. Estructura química de la genipina.	15
Figura 2. Mecanismo de reacción de genipina con metilamina propuesto por Touyama.	16
Figura 3. Planta de extracción sólido-líquido, construida por la firma de ingeniería PSE SOLUTIONS.	18
Figura 4. Estructura química del quitosano.	19
Figura 5. Mecanismo de entrecruzamiento entre el glutaraldehído y el quitosano.	19
Figura 6. Mecanismo de entrecruzamiento entre el quitosano y la genipina.	20
Figura 7. Frutos de Genipa americana.	25
Figura 8. Extracto Concentrado.	26
Figura 9. Genipina obtenida.	29
Figura 10. Tiempos de retención de genipina.	34
Figura 11. Espectro ultravioleta de genipina.	34
Figura 12. Molde hidrogel de quitosano entrecruzado con genipina.	35

Lista de Gráficas

Gráfica 1. Espectro Ultravioleta de la genipina.	31
Gráfica 2. Espectro de masas APCI de genipina.	32
Gráfica 3. Espectro de masas ESI de la genipina.	33
Gráfica 4. Tiempo de retención de la genipina.	34

Lista de Anexos

Anexo 1. Documento de Acceso a Recursos Genéticos.....	42
---	-----------

Resumen

Este trabajo se centró en la extracción de genipina a partir del fruto de la especie *Genipa americana*, empleando la planta de extracción fabricada por la firma de ingeniería PSE-Solutions, como un método económico para su purificación a nivel semipiloto y su respectiva caracterización mediante técnicas instrumentales. La alta ocurrencia del árbol de *Genipa americana* en la región pacífica Colombiana, representa un gran potencial de aprovechamiento de los frutos como principal fuente para la extracción de este compuesto.

Los frutos maduros de *Genipa americana* se recolectaron dentro del perímetro urbano de la Ciudad de Cali. La separación de la genipina se realizó por extracción sólido-líquido en una planta a escala semipiloto, donde se encuentran los procesos de extracción y concentración en un solo sistema, mejorando considerablemente la eficacia del proceso. La purificación del producto se complementó con un sistema de cromatografía convencional con el cual se terminó de separar la genipina de la matriz. Después, se realizó la caracterización y cuantificación de la genipina obtenida usando cromatografía líquida de alta eficiencia y espectrometría de masas. Finalmente, se entrecruzó una pequeña cantidad de genipina con quitosano para formar hidrogeles y así sustentar la funcionalidad del compuesto extraído.

Además, se logró recuperar 1,96g de genipina de alta pureza a partir de la cromatografía convencional, se determinaron las principales condiciones del método para su reproducibilidad a nivel piloto y se obtuvieron hidrogeles de quitosano entrecruzados con la genipina recuperada.

Palabras Clave: Genipina, extracción sólido líquido, cromatografía en columna.

Abstract

This project aim in the extraction of genipin from the fruit of the *Genipa americana* species using the extraction plant manufactured by the engineering firm PSE-Solutions as an economic method for its recovery at the semipilot level and its respective characterization by instrumental techniques. The high occurrence of the *Genipa americana* tree in the Colombian Pacific region represents a great potential for utilization of the fruits as the main source for the extraction of this compound.

The mature fruits of *Genipa americana* were collected within the urban perimeter of the City of Cali. The solid-liquid extraction was selected as an extraction method in a semipilot plant where the extraction and concentration processes are found in a single system, considerably improving the efficiency of the process. The purification of the product was complemented with a conventional chromatography system with which the genipin was separated from the matrix. Then, the characterization and quantification of the genipin obtained using high performance liquid chromatography and mass spectrometry was carried out. Finally, a small amount of genipin was crosslinked with chitosan to form hydrogels and thus sustain the functionality of the extracted compound.

From the results obtained, it was possible to recover 1.96g of high purity genipin from conventional chromatography, the main conditions of the method for its pilot level reproducibility were determined and chitosan hydrogels crosslinked with the recovered genipin were obtained.

Keywords: Genipin, liquid solid extraction, column chromatography.

1. Introducción

Colombia se encuentra ubicada en el noroccidente de Suramérica, dentro de la franja intertropical. Es atravesada de sur a norte por los Andes Colombianos, los cuales están conformados por tres cadenas montañosas separadas por los valles de los ríos Magdalena y Cauca. Esta ubicación lo convierte en uno de los 14 países con mayor índice de biodiversidad en la tierra; además, contiene en su geografía parte de la amazonia considerado como pulmón del mundo (Andrade-C., 2011).

El departamento del Valle del Cauca se encuentra ubicado en el occidente de Colombia, en esta región se encuentra en forma silvestre el árbol *Genipa americana*, el cual es nativo de América central y América del sur. En investigaciones recientes se ha potenciado el uso de *G. americana* como principal fuente de extracción de genipina, debido a la buena recuperación del compuesto desde su fruto, potenciando su uso como agente entrecruzante en sistemas de liberación modificada y como colorante en la industria.

Desafortunadamente, el costo internacional de la genipina es demasiado alto (no se ha encontrado un proveedor nacional) debido a que la mayoría de los procesos de extracción se realizan por medio del fruto de *Gardenia jasminoides*, el cual requiere como último paso la adición de la enzima Beta-glucosidasa para obtener un compuesto de alta pureza, lo que eleva su precio de comercialización. Sin embargo, este proceso sigue siendo muy limitado debido a la inestabilidad de la genipina en medio acuoso y su alto nivel de entrecruzamiento con los grupos amino presentes en proteínas y aminoácidos, lo que conlleva a un elevado costo de extracción.

Este trabajo tuvo el objetivo de incrementar la escala de obtención de genipina a partir de la planta de extracción a nivel semipiloto, empleando frutos de *Genipa americana*, aprovechando su alta distribución en el departamento de Valle del cauca. El compuesto obtenido fue caracterizado mediante técnicas instrumentales como espectrometría de masas acoplado a cromatografía líquida para determinar el nivel de pureza, finalmente se comprobó la utilidad de la genipina aislada mediante el entrecruzamiento con quitosano para la formación de hidrogeles siguiendo la metodología previamente reportada.

2. Descripción del proyecto

2.1. Planteamiento de la pregunta de investigación y justificación.

¿Es posible aumentar la obtención de genipina empleando una técnica de extracción sólido-líquido en la Planta de Extracción a nivel semipiloto, disminuyendo a su vez el costo de extracción?

Endo y Taguchi en 1973 aislaron geniposido a partir del fruto de *Gardenia jasminoides*. Paik y col. (2001) retomaron este trabajo transformando el geniposido en genipina al hacerlo reaccionar con la enzima β -glucosidasa para luego caracterizarlo mediante técnicas espectroscópicas. Mas tarde, en 2007, Guilherme realizó un método de extracción de genipina a partir de la pulpa de fruto de *Genipa americana* L, obteniendo un rendimiento del 0.52%, promoviendo el uso de esta especie de árbol como fuente de genipina (Velásquez, Rivas, & Ocanto, 2014).

Genipa americana es un árbol nativo de América Latina, actualmente se ha registrado su presencia en países como Paraguay, Venezuela, Bolivia y Brasil (Garden., 2017). Según el catálogo de plantas y líquenes de Colombia se encuentra distribuido en departamentos como Amazonas, Antioquia, Cundinamarca, Huila, Meta, Nariño y Valle del Cauca (Colombia, 2015). En el herbario de la Universidad Icesi se encuentran registros de colecciones demostrando la presencia del árbol en los municipios de Dagua (Vargas. W, 4587, Julio 31 de 1998), Jamundí (Vargas. W, 18180, abril 12 de 2007) y Buga (Vargas. W, 18285, mayo 8 de 2007) lo que representa un fuerte potencial de aprovechamiento de sus frutos para la extracción de este metabolito secundario en la región del Valle del Cauca (Icesi, 2017).

Dentro de los múltiples usos de la genipina, destacan sus propiedades farmacológicas como antiinflamatorio y diurético (Velásquez et al., 2014). Por otro lado, la principal característica de este compuesto es su capacidad para reaccionar con grupos amino, lo que permite su uso como agente entrecruzante de carácter natural con baja toxicidad en comparación con el glutaraldehído, el cual es un compuesto con una alta toxicidad. Al reaccionar la genipina con el quitosano es capaz de formar hidrogeles estables que son la base para la construcción de sistemas de liberación modificada, los cuales representan una fuerte estrategia en distintos campos de la industria farmacéutica.

La genipina se comercializa en cantidades limitadas, al día de hoy 25mg de este compuesto tienen un costo de 111,50 USD, mientras que 125mg alcanzan los 448,00 USD (Merck, 2017). Debido a su alto costo en el mercado, se necesita encontrar una técnica que incremente la escala de obtención de este compuesto sin la necesidad de usar métodos enzimáticos que obligatoriamente incrementan el costo de extracción cuando provienen de la fuente *G. Jasminoides*. Este trabajo propone una técnica de obtención de genipina sencilla, económica, a partir de los

frutos de *Genipa americana*, de fácil acceso debido a su alta distribución en la región, por lo que contribuye a la investigación de productos naturales y puede tener una potencial aplicación como sistema de entrecruzamiento para sistemas matriciales de quitosano, los cuales funcionan como sistemas de liberación controlada.

2.2. Marco teórico y estado del arte

2.2.1. *Genipa americana*

Genipa americana es una especie del género *Genipa*, nativa del norte de Sudamérica, Caribe y Sur de México (Genipa, n.d.). Es un pequeño árbol monoico, de 15 metros de altura y tronco cilíndrico, recto, de 60 cm de diámetro, sus flores son de color amarillo o rojo. El fruto es una baya comestible de cáscara gruesa, de 4-8 cm de largo y 4-6 cm de ancho (Genipa, n.d.).

Genipa americana posee diversos usos, la madera del árbol se usa para la fabricación de zapatos, mangos de herramienta, artículos torneados, material para muebles, ebanistería, entre otras (Chudnoff, 1984). La fruta del árbol representó una importante fuente alimenticia en tiempos históricos y prehistóricos, hoy en día de menor importancia se consume de manera limitada en áreas rurales (Nations, 1986).

2.2.2. Genipina

La genipina se encuentra en altas cantidades en el fruto de *Genipa americana*. La genipina es una aglicona derivada del geniposido, Djerassi *et. al*, descubrieron su estructura en los años 60 utilizando datos espectroscópicos de RMN y experimentos de degradación química. Su forma molecular es $C_{11}H_{14}O_5$ y su estructura química se representa en la Figura 1. Es incoloro, pero reacciona espontáneamente con los grupos amino presentes en los aminoácidos para formar pigmentos azules que son comestibles y se utilizan en la industria alimentaria. (Parque JE, 2002).

Entre los diversos usos que se le atribuyen a la genipina se destacan su actividad antiinflamatoria, la estimulación de la síntesis de colágeno en ratas envejecidas para estimular la proliferación de células endoteliales, debido a su baja citotoxicidad y biocompatibilidad (T. Zhou, et al., 2005). En investigaciones recientes se ha logrado demostrar el efecto inhibitorio de la genipina en la

apoptosis de células del hipocampo en el sistema nervioso para la prevención de enfermedades neurodegenerativas. (Liu et al., 2006).

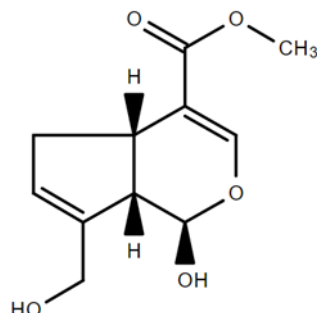


Figura 1. Estructura química de la genipina.

La genipina es una molécula biodegradable, de origen natural y de baja citotoxicidad. El agente reticulante de la mayoría de polímeros, usado como base en muchas investigaciones es el glutaraldehido, sin embargo, su grado de toxicidad ha disminuido su uso (Sung, 1999). Como se mencionó anteriormente el costo de comercialización de la genipina es bastante elevado debido al uso de una enzima para poder obtener el compuesto puro a partir de *Gardenia jasminoides* (Alvarez, 2013). Sin embargo, en múltiples investigaciones se ha logrado obtener genipina usando el fruto del árbol de *Genipa americana* mediante metodologías sencillas y sin la necesidad de incluir la etapa enzimática (Velásquez et al., 2014), por lo que esta especie vegetal nativa de las Américas se perfila como una fuente de extracción de este metabolito secundario.

En la actualidad se han realizado estudios con genipina en donde se ha usado como agente entrecruzante con polímeros de quitosano que presentan en su estructura grupos amino primario, para posteriormente ser usado en bioadhesivos, en el vendaje de heridas y como sustituto óseo, demostrando así su potencial como agente reticulante nuevo y seguro (Yao, Liu, & Chang, 2004).

El mecanismo de reticulación de la genipina con compuestos que contienen aminas primarias no está bien entendido y todavía se encuentra bajo investigación. Sin embargo, el grupo de Touyama (Ryousuke TOUYAMA, 1994) propuso un mecanismo para la reacción de genipina con una metilamina que ocurre a través de un ataque nucleofílico de la amina primaria sobre el carbono 3 de la genipina, como se muestra en la Figura 2. Ocasionando la apertura del anillo dihidropirano (Yao et al., 2004).

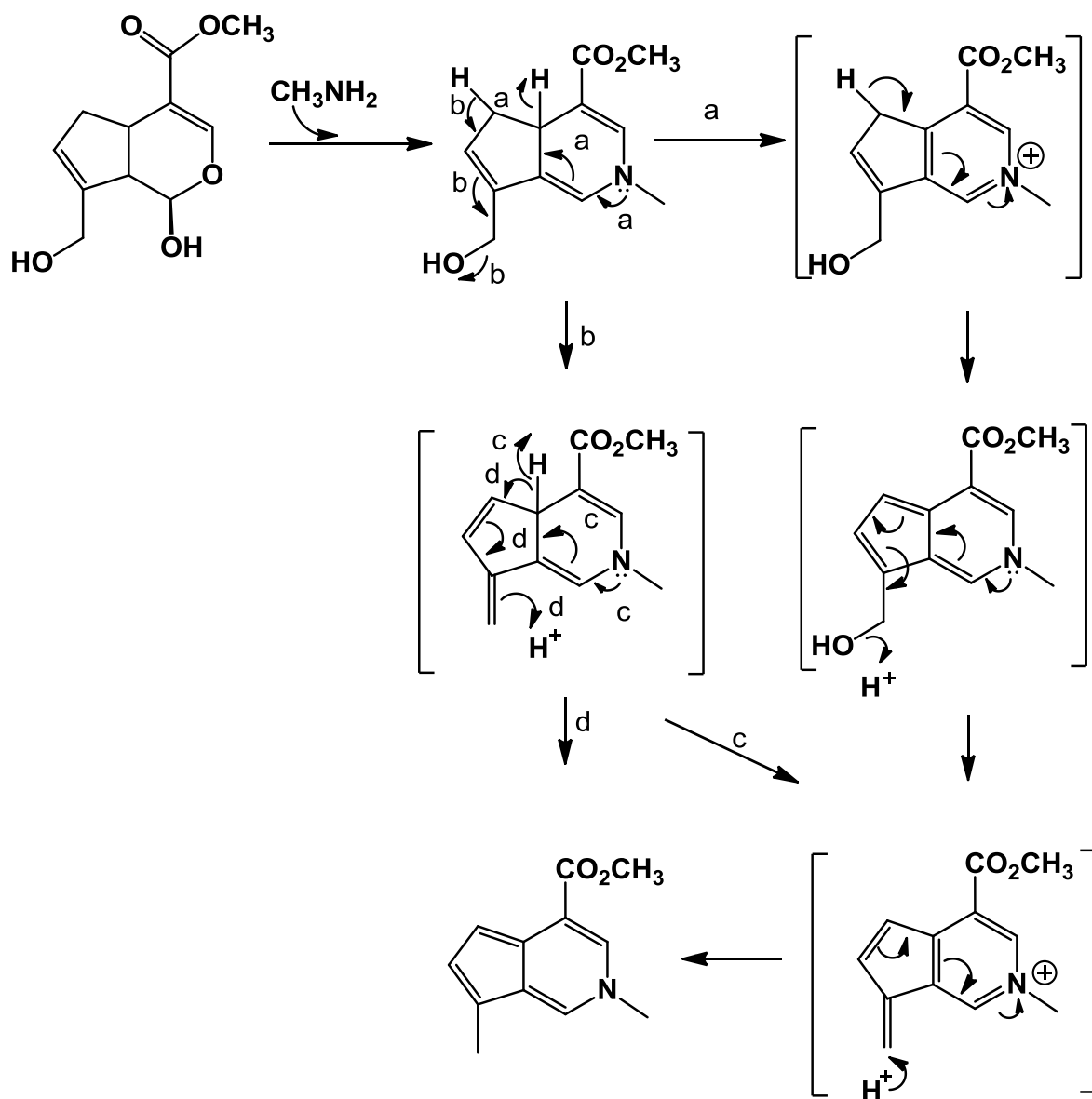


Figura 2. Mecanismo de reacción de genipina con metilamina propuesto por Touyama (Ryousuke TOUYAMA, Kenichiro INOUE, Yoshio TAKEDA, Masahiko YATSUZUKA, Takeshi IKUMOTO, Nobuharu MORITOME, Tetsuro SHINGU, Toshio YOKOI, 1993).

Se cree que el mecanismo de reacción propuesto por Touyama de genipina con metilamina es el mecanismo de reacción que ocurre con moléculas que contienen un grupo amino primario (Ryousuke TOUYAMA, 1994).

2.2.3. Técnica de extracción.

La extracción sólido líquido es una operación unitaria ampliamente utilizada en la industria. Por medio de esta operación se logra la transferencia de compuestos (solutos) desde la fase sólida hacia un solvente específico. Esto ocurre naturalmente por efecto de la diferencia de concentración del soluto (para mayor generalidad, diferencia de potencial químico) entre las fases sólida y líquida. Por efecto de la difusión, mezclado y la alta concentración de soluto en el sólido, las sustancias que contienen los metabolitos se ven favorecidas a migrar a través de la estructura porosa del sólido hacia el solvente (PSE SAS, 2016).

El rendimiento y la eficiencia del proceso de extracción depende de diversas variables, entre las que se pueden mencionar: naturaleza, tamaño y forma de las partículas sólidas, la concentración del soluto en el sólido, la compatibilidad entre soluto y solvente, la relación másica sólido-solvente, las propiedades del solvente, la temperatura, la presión, el pH del medio, el régimen de mezclado, el tiempo de contacto, etc. Por efecto de estas variables, el proceso se puede realizar en condiciones normales (percolación), a temperaturas y presiones elevadas bajo condiciones supercríticas del solvente (extracción supercrítica) o con asistencia de radiación de microondas (M. Zhou et al., 2012).

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 una cantidad del sólido de interés en contacto continuo con el líquido. Esto también se puede lograr por agitación mecánica de los sólidos en la solución (PSE SAS, 2016). 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 (Ramos-de-la-Peña, et al., 2015).

A pesar de que los tanques agitadores son más eficientes en la extracción sólido líquido, estos consumen energía y pueden generar ruptura, erosión y daño del material sólido. Esto a su vez puede promover la extracción de material indeseado, el taponamiento de filtros y tuberías y el ensuciamiento excesivo de las unidades de procesamiento. Por estas razones, el uso de otra configuración depende en gran parte del tipo de sólidos a procesar y del tipo de solutos a extraer (PSE SAS, 2016).

2.2.4. Descripción del equipo y especificaciones técnicas

La planta de extracción sólido líquido (PSE) se compone de un sistema de calentamiento, el sistema de extracción, el condensador, el sistema de concentración del extracto, los tanques colectores de solvente, el sistema de vacío y el tablero de control (Figura 3). 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. El equipo es robusto, durable, construido en acero inoxidable 204 con acabado brillante. Puede ser utilizado para una gran diversidad de aplicaciones de extracción con solventes y para actividades de docencia, investigación y extensión (PSE SAS, 2016).



Figura 3. Planta de extracción sólido-líquido, construida por la firma de ingeniería PSE SOLUTIONS.

2.2.5. Potenciales usos de la genipina.

Por otro lado, el quitosano es un polisacárido que contiene grupos amino en su estructura (Figura 4), estos grupos le confieren la capacidad de reaccionar con agentes entrecruzantes como lo son el glutaraldehído y la genipina para la construcción de hidrogeles.

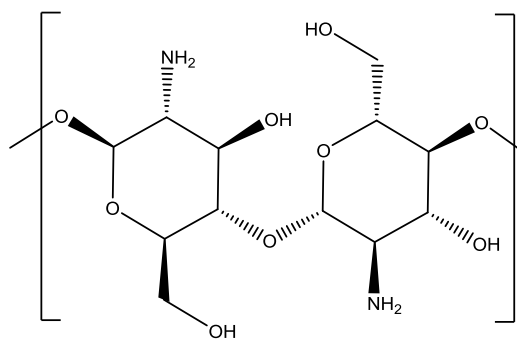


Figura 4. Estructura química del quitosano.

Los hidrogeles son un sistema formado por materiales poliméricos entrecruzados, de origen natural o sintético en forma de red tridimensional, tienen la capacidad de hincharse una vez que entran en contacto con el agua formando un material de tipo blando y elástico (Virnignia, 2015). Una forma de volver más rígidos a los polímeros es mediante la introducción de enlaces químicos entre las cadenas poliméricas, este tipo de formación de enlaces recibe el nombre de entrecruzamiento (Rivas, 2014).

En la Figura 5, se ilustra el mecanismo de entrecruzamiento del quitosano con el glutaraldehído, el cual se da la formación del enlace imina entre los grupos carbonilo del compuesto difuncional y los grupos amino libres de las cadenas del polímero. El mecanismo de reacción inicia con el ataque nucleofílico por parte de la amina al electrófilo del carbono del dialdehído, provocando la formación de un intermediario tetraédrico, seguido de un re arreglo interno para la formación del hemiaminal correspondiente. Por último, este intermediario pierde una molécula de agua, dando lugar a la formación del enlace imina (Romero, 2014).

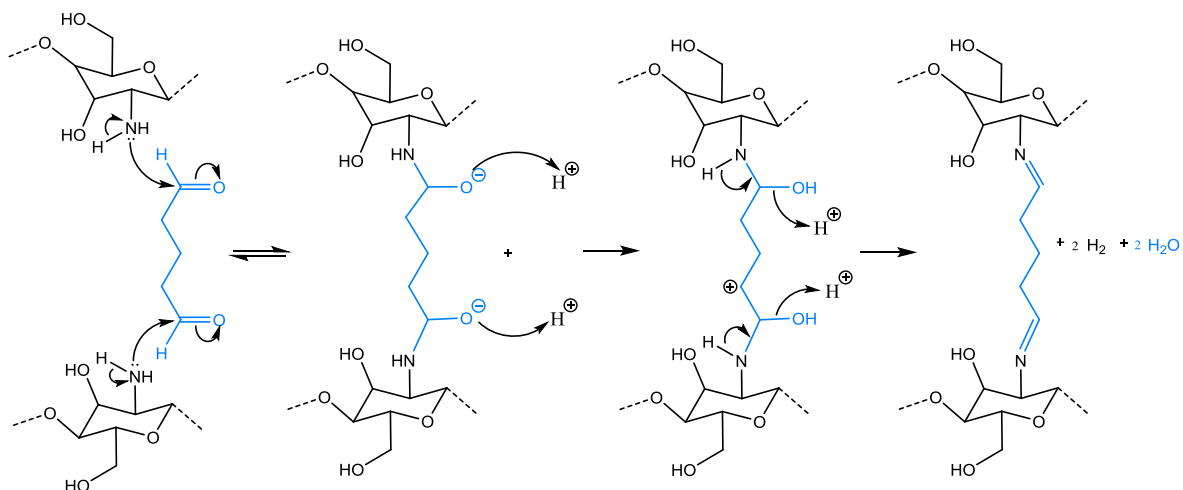


Figura 5. Mecanismo de entrecruzamiento entre el glutaraldehído y el quitosano.

En la Figura 6 se ilustra el mecanismo de entrecruzamiento de quitosano con genipina, en donde se da la formación de enlaces covalentes entre los grupos amino y el carbono del grupo carbonilo, provocando la formación de un intermediario tetraédrico, en donde el grupo metoxilo se convierte en el mejor grupo saliente debido a que es más básico que la amina que está reaccionando. Al mismo tiempo, sucede una adición de Michael, la cual se inicia con un ataque nucleofílico de los grupos amino en el carbono β del compuesto carbonilo de la genipina, el carbono del aldehído formado es atacado nucleofílicamente por la amina, esta reacción intramolecular permite que el ciclo se cierre nuevamente y se pierda agua como producto de la reacción.

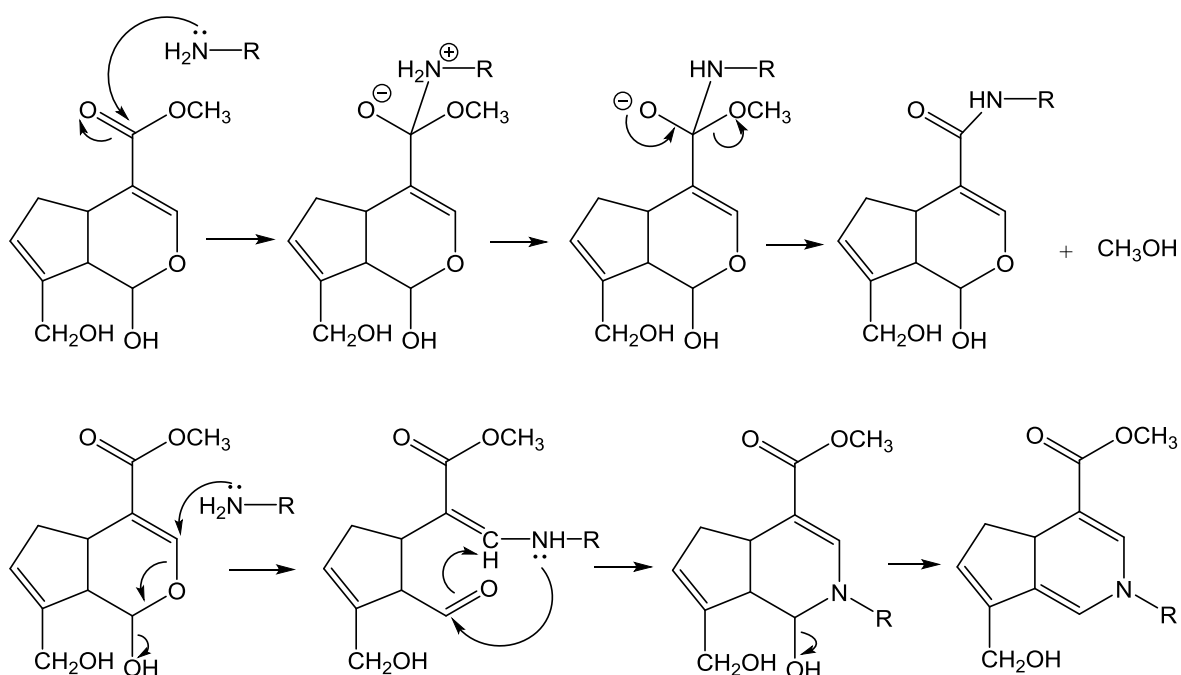


Figura 6. Mecanismo de entrecruzamiento entre el quitosano y la genipina.

2.3. Objetivos

2.3.1. Objetivo general

Incrementar la escala de obtención de genipina a partir de los frutos de *Genipa americana* por medio de extracción sólido-líquido.

2.3.2. Objetivos específicos

- Estandarizar la técnica de obtención de genipina por medio de extracción sólido-líquido en planta simipiloto PSE Solutions.
- Evaluar la cantidad de genipina extraída mediante la Planta de Extracción PSE Solutions y la Cromatografía en Columna.
- Identificar espectroscópicamente la estructura química de la genipina por Espectrometría de Masas ESI y APCI, y Espectroscopia Ultravioleta (UV/VIS) para determinar el grado de pureza.
- Comprobar la utilidad de la genipina extraída como agente entrecruzante de hidrogeles de quitosano.

2.4. Metodología

Este proyecto se llevó a cabo en las instalaciones de los laboratorios de investigación en Productos Naturales y Química orgánica ubicados en la Universidad Icesi.

2.4.1. Recolección y tratamiento del material vegetal

Se recolectaron 2,45kg de frutos maduros (equivalente a 23 frutos) de jagua provenientes del árbol *Genipa americana*, ubicado dentro del perímetro urbano de la Ciudad de Cali. Antes de su manipulación se refrigeraron durante dos semanas a una temperatura aproximada de 5 °C, con el fin de cuidar su integridad. Cada uno de los frutos fue descortezado y picado hasta reducir considerablemente su tamaño. (M. Zhou et al., 2012).

Posteriormente, se llevó el fruto cortado junto con una cantidad en litros de acetato de etilo a la trituradora para obtener un extracto de jugo de genipina el cual fue llevado a la planta de extracción.

2.4.2. Extracción de genipina en planta semipiloto

El proceso de extracción sólido-líquido en la Planta de Extracción PSE Solutions se realizó al colocar el jugo obtenido en el proceso anterior en el percolador de la planta, se le adicionó 4L de acetato adicional para que toda la muestra estuviera cubierta por el solvente, se definieron las condiciones de operación las cuales fueron: temperatura de 25°C y 1 atmósfera de presión. Se puso en marcha la operación de la planta durante 7 horas para tener la mayor cantidad de extracto posible. Una vez terminado el proceso, el extracto fue recolectado en el concentrador de la planta, mientras que el solvente usado fue recuperado durante el procedimiento, el residuo del extracto del jugo sobrante en el percolador fue desechado.

El proceso de separación de la genipina de otros compuestos similares se hará por cromatografía en columna automatizada, el cual permite separar de manera rápida y eficiente el compuesto de interés, para luego poder realizar la cuantificación de la genipina extraída.

2.4.3. Preparación de la muestra

El extracto obtenido de la planta semipiloto se lleva a concentración al vacío para acabar de retirar el solvente del metabolito de interés, una vez terminado este proceso el extracto concentrado es liofilizado para sublimar principalmente la cantidad de agua presente en el extracto.

2.4.4. Cromatografía Automatizada

Para la cromatografía automatizada se utilizó el equipo Isolera One Flash Chromatography System, la columna usada fue de 340g y se empaquetó con Silica-gel. La muestra se disolvió en metanol para ser impregnada de la menor cantidad de Silica posible, posteriormente se procedió a definir las condiciones de operación del equipo.

2.4.5. Extracción a nivel de laboratorio

En primer lugar, se recolectaron 3 frutos del árbol, cuyo tratamiento fue similar al anteriormente descrito, con la diferencia en que se obtuvo un extracto de jugo en agua, una vez obtenido el extracto se le adicionó el acetato de etilo junto con 25,38 g de cloruro de sodio y se dejó en agitación sin calentamiento por 4 horas. Posteriormente, se decantó para separar la fase acuosa del solvente, este último se recogió en un beaker.

Para la cromatografía convencional, la columna en posición vertical es rellenada con material particulado de Silica gel de tamaño mediano (0,05mm), mientras que la muestra es adicionada en la parte superior de la estructura. El resto de la columna se llena con acetato de etilo como fase móvil y se dispone a realizar la corrida. Cada una de las fracciones eluidas se recogieron en tubos de ensayo las cuales fueron evaluadas mediante cromatografía en capa fina (TLC) para identificar las fracciones donde se evidenciaba la presencia de una banda con tonalidad oscura, la cual es positiva para genipina. Una vez identificadas estas fracciones, se juntaron y se llevaron a un sistema de concentración a presión reducida para eliminar la cantidad de solvente restante y concentrar la muestra. Después, se procedió a pesar y a determinar la cantidad de genipina obtenida en el proceso.

2.4.6. Caracterización

La identificación estructural de la genipina extraída se realizó mediante espectrometría de masas ESI (electrospray ionization) y APCI (atmospheric pressure chemical ionization) acoplado a Cromatografía líquida de alta resolución HPLC y Espectroscopia de Ultravioleta (UV).

2.4.7. Uso como entrecruzante de quitosano.

Para llevar a cabo la síntesis de hidrogeles de genipina se pesaron 3g quitosano a una solución de ácido acético al 2,0%. Después, se debe homogeneizar la solución para posteriormente eliminar las burbujas presentes a través del sonicador. En otro recipiente se disolvieron 16 mg de genipina en 4 gotas de metanol. para llevar a cabo el entrecruzamiento se tomaron 5,4 mL de la solución de quitosano preparada previamente y se depositaron en una caja Petri de plástico junto con la genipina diluida en metanol. Luego, se llevó a un horno Binder a 45°C durante 48 horas. Después, se cortó el hidrogel formado con un sacabocados de 12mm de diámetro el cual se expuso a condiciones ambientales por 48 horas para obtener el hidrogel de genipina (VALLEJO PINZÓN, 2014).

2.5. Resultados y discusión

2.5.1. Extracción de la genipina y preparación de la muestra

Los 23 frutos recolectados para realizar la extracción pesaron 2448 g, a la hora de recolectarlos se escogieron los frutos no maduros cuya característica principal es la dureza del pericarpio, ya que una cantidad considerable de genipina podría haber reaccionado produciendo un bajo rendimiento al extraer el compuesto. Al momento de descortezar el fruto maduro se observó una coloración azul, en comparación de la ausencia de color en frutos frescos como se evidencia en la Figura 7.



Figura 7. Frutos de *Genipa americana*.

La cantidad de acetato de etilo usado en el proceso de extracción en la planta fue de aproximadamente 7 litros. La muestra debió ser cubierta totalmente por el solvente para favorecer la transferencia del soluto en el sólido hacia el solvente. Las condiciones de operación empleadas en la planta fueron:

Tabla 1. Condiciones de operación de la planta de extracción.

Temperatura (°C)	Presión (mmHg)	Tiempo (horas)
25	670 (Puerto, s.f.)	7

Se decidió no aplicar calor puesto que este proceso es completamente dependiente de esta variable, además la molécula es lo bastante reactiva y la reacción de entrecruzamiento aumenta con la temperatura. Una vez concluido el tiempo de operación de la planta, se recolectó el concentrado, el cual se llevó al proceso de

concentración a presión reducida para terminar de separar el solvente restante de la muestra. El material vegetal dispuesto en el concentrador fue desechado.

El concentrado resultante tenía una consistencia poco viscosa y una coloración oscura (Figura 8), debido a la alta cantidad de agua proveniente del fruto, por lo que fue necesario buscar una técnica que permitiera evaporar el líquido. En primer lugar, se realizó una prueba en donde se utilizó el 10% del concentrado obtenido y se introdujo en un horno Binder a 90 °C durante dos días; sin embargo, el sólido obtenido presentaba una coloración muy oscura debido a la reacción de la genipina con los aminoácidos provenientes del fruto. Se recurrió a la liofilización del concentrado, proceso de deshidratación de productos a presión muy baja y moderada temperatura, cuyo resultado es la obtención de un producto seco con las características iniciales del mismo. Este proceso se llevó a cabo en la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, Valle del Cauca.



Figura 8. Extracto Concentrado.

El sólido obtenido por el proceso de liofilización tuvo un peso de 24,24g. Se evaluó la solubilidad de manera cualitativa en acetato de etilo y metanol asistido por ultrasonido, resultando parcialmente soluble en ambos con un mayor grado de solubilidad en metanol, lo cual determinó que la muestra fuera diluida en este último para el proceso cromatográfico.

2.5.2. Cromatografía Automatizada

El equipo usado fue un Isolera One Flash Chromatography System, el cual se fundamenta en un proceso de purificación avanzado automatizado, basado en valores que recomienda los cartuchos apropiados y calcula las mejores condiciones del solvente con sus respectivos gradientes para una mejor purificación del producto (Biotage, 2017). La cantidad de muestra pesada fue de 4,88g y fue diluida en metanol. La columna usada corresponde a un cartucho SNAP-Ultra de 340g con capacidad de volumen de 590 ml.

Las fracciones eluidas por el sistema se agruparon por presentar igual coloración. Las fracciones son separadas por el equipo debido a la longitud de onda de absorción, empleada como punto de partida para la separación e identificación de moléculas orgánicas. Una vez unidas las fracciones se realizó una cromatografía Planar (TLC), donde se observó una banda de color azul oscuro bajo lampara UV en las fracciones 12 a 17 de las 30 obtenidas, usando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo 1:1 y vainillina como revelador. Estas fracciones fueron reunidas y llevadas al sistema de rotaevaporación, donde finalmente se concentró la muestra obtenida (Alvarez, 2013). Es necesario anotar la presencia de cristales de identidad desconocida en las fracciones 29 y 30, los cuales fueron depositados en un recipiente para cuidar su integridad y posterior análisis en futuros trabajos de grado.

Para obtener la cantidad de compuesto extraído se restó el peso del balón con el concentrado con el peso del balón vacío, adicionalmente se calculó el porcentaje de rendimiento de la siguiente manera:

Peso Balon con muestra – Peso Balon vacio = Cantidad de producto extraido.

$$41217,2 \text{ mg} - 41169,2 \text{ mg} = 48 \text{ mg de genipina}$$

$$\% \text{ de Rendimiento} = \frac{48 \text{ mg}}{2448000 \text{ mg}} \times 100$$

$$= 0,0019\%$$

La cantidad de genipina extraída mediante la planta de extracción PSE Solution a nivel semi piloto fue de 48 mg, con un porcentaje de rendimiento del 0,0019%, un rendimiento demasiado bajo en comparación con las extracciones realizadas en trabajos previos a partir del fruto de *Genipa americana*. Por lo tanto, la cantidad obtenida del producto no es suficiente para proceder con su caracterización.

En la evaluación del proceso se identifican tres principales factores responsables de la baja cantidad de producto extraído. En primer lugar, tenemos el prolongado periodo de tiempo en el que se realizó la extracción, la genipina es un compuesto que reacciona rápidamente con los grupos amino presentes en los aminoácidos del fruto de genipa, por lo que tanto tiempo favoreció la reacción resultando en una pérdida considerable del producto, evidenciado por el aumento en la intensidad del color azul de la muestra. El segundo factor en consideración es el proceso de liofilización, el cual se realizó fuera de las instalaciones de la universidad y durante las tres semanas que duró este proceso no se garantizó un correcto cuidado de la muestra, junto con la cantidad de tiempo empleado. En tercer lugar, la temperatura jugó un papel importante ya que acelera el entrecruzamiento de la genipina con los grupos amino. Estos resultados conllevaron a realizar una nueva extracción, esta

vez a nivel de laboratorio mediante cromatografía en columna para poder dar cumplimiento a los demás objetivos establecidos al inicio de la investigación.

2.5.3. Obtención del metabolito secundario

La extracción a nivel de laboratorio se llevó a cabo por cromatografía en columna. Se recolectaron tres nuevos frutos con un peso de 316,5g, se mantuvieron en refrigeración para disminuir al máximo la reacción de entrecruzamiento con los aminoácidos del fruto, estos fueron descortezados y cortados para reducir considerablemente su tamaño de la misma forma que se realizó en la técnica anterior. En esta ocasión no se obtuvo un extracto de jugo directamente con acetato de etilo, sino que los frutos se trituraron de manera mecánica con agua, posteriormente se mezcló el extracto obtenido con acetato de etilo y se dispuso en un erlenmeyer con agitación constante a temperatura ambiente durante aproximadamente 4 horas.

Para separar la fase acuosa de la fase orgánica se llevó a cabo una decantación, donde el acetato de etilo se recogió en un nuevo Erlenmeyer debido a que el metabolito secundario se encontraba en él. Para realizar la cromatografía convencional, se dispuso de la columna de vidrio de manera vertical con ayuda de un soporte universal, la columna fue rellena con sílica gel (SiO_2) de tamaño mediano (0,05mm) como material absorbente, en cuanto a la muestra fue empaquetada en la parte superior, mientras que el resto de la columna se relleno con acetato de etilo como fase móvil.

Al adicionar la fase móvil, por efecto de la gravedad, la muestra se movió a través de la columna estableciendo un equilibrio entre el soluto absorbido en la fase estacionaria y el eluyente que fluye por la columna. Cada uno de los componentes de la muestra estableció interacción con la fase estacionaria y la fase móvil lo que permitió su correcta separación. Las 23 fracciones eluidas se recolectaron en tubos de ensayo, los cuales fueron debidamente enumerados para su respectivo análisis.

Por medio de TLC se evaluaron cada una de las fracciones obtenidas usando el mismo desarrollo cromatográfico del método anterior, entre las fracciones 5 a 13 se evidenció la fuerte presencia de una banda de color azul, característica de la genipina con un factor de retención (R_f) similar al patrón de referencia. Estas fracciones se juntaron en un balón y se dispuso al sistema de concentración de presión reducida, donde la muestra fue concentrada hasta evidenciarse la formación de sólidos en las paredes del balón y la presencia de un sólido amarillo al fondo de este mismo como se muestra en la Figura 9.



Figura 9. Genipina obtenida.

Para determinar la cantidad de genipina extraída se registraron los pesos del balón vacío y con el compuesto de interés por triplicado como se muestra a continuación:

Tabla 2. Pesos del balón vacío y con el producto extraído.

	Peso Balón Vacío (g).	Peso Balón con la muestra (g).
	145,9426	147,8982
	145,9463	147,8926
	145,9477	147,8849
Promedio (g)	145.9455	147,8919

Obtenidos los promedios de los pesos se procede a realizar una resta entre ellos dos y se determina la cantidad promedio de genipina extraída así:

$$\text{Peso promedio Balon con muestra} - \text{Peso promedio Balon vacio} = \text{Cantidad de producto extraido.}$$

$$147,8919g - 145,9455g = 1,9464g \text{ de genipina}$$

La cantidad de genipina extraída mediante la cromatografía en columna es de 1,9464 g, el porcentaje de rendimiento de esta extracción fue del 0,61% el cual es comparable a los obtenidos por Djerassi y Col , entre 0,9 y 1% y más reciente por Guilherme (2007) donde logró un rendimiento del 0,52% a partir del fruto de Genipa americana (Djerassi et al., 1960).

Teniendo en cuenta que se obtuvieron casi dos gramos de producto a partir de solo tres frutos, permite sustentar la pérdida de una gran cantidad de genipina en el proceso de extracción por medio de la planta semipiloto. El tiempo parece ser una variable crítica a la hora de realizar este proceso, ya que la cromatografía en columna se desarrolló en un periodo de tiempo menor en comparación al método anterior. De igual manera se cometió un error al aplicar temperatura en el proceso de rotaevaporación, como se había mencionado antes, puesto que la reacción de entrecruzamiento de la genipina se ve potenciada por la temperatura, contribuyendo a la pérdida del compuesto. Finalmente, las condiciones no controladas en el proceso de liofilización dispuesto en la Universidad Nacional terminaron por disminuir el rendimiento de la extracción.

2.5.4. Caracterización de la genipina

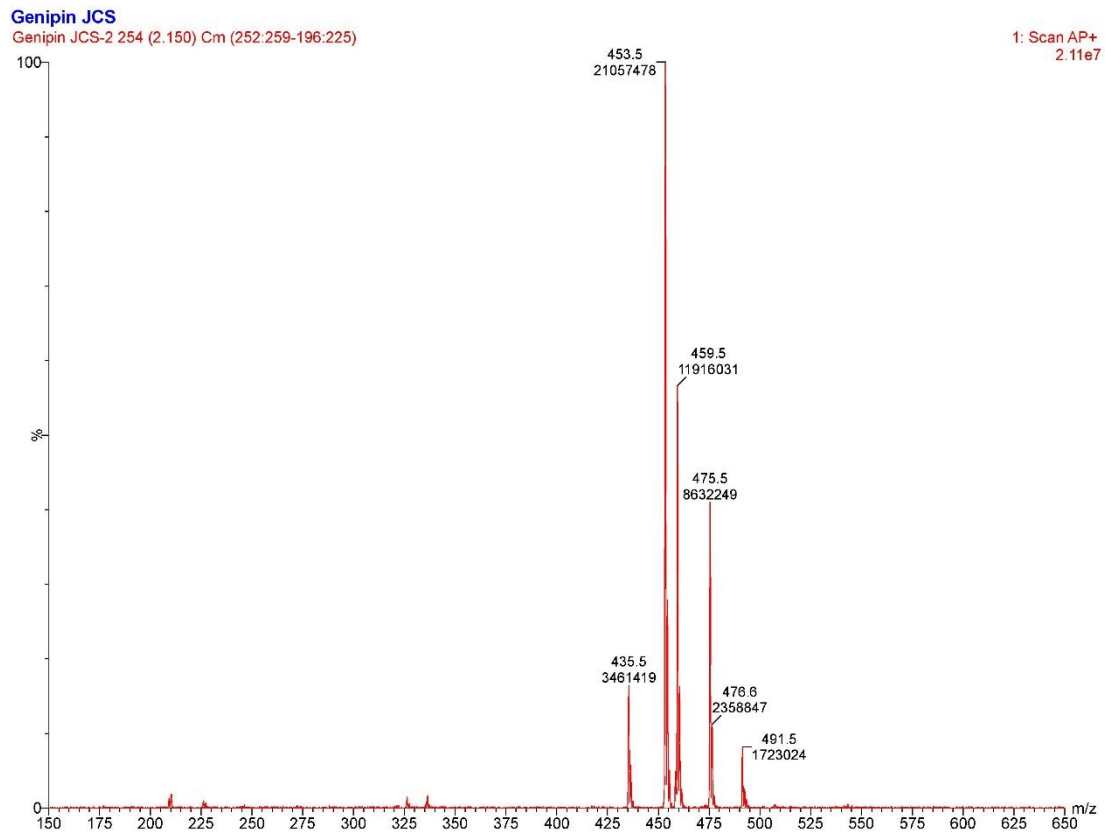
Con el fin de verificar la pureza de la genipina extraída se realizó un análisis por espectrofotometría ultravioleta y espectrometría de masas empleando fuentes de ionización de ESI y APCI. En la Gráfica 1, se presenta el espectro ultravioleta de la genipina, en él se encuentra un máximo de absorción a 241nm, lo cual es comparable con la longitud de onda reportada en la teoría (Tenesaca, 2012). No obstante, a manera experimental en varias investigaciones se ha encontrado un máximo de absorción a 241nm por lo que es posible afirmar que espectralmente se trata del mismo compuesto (Alvarez, 2013).



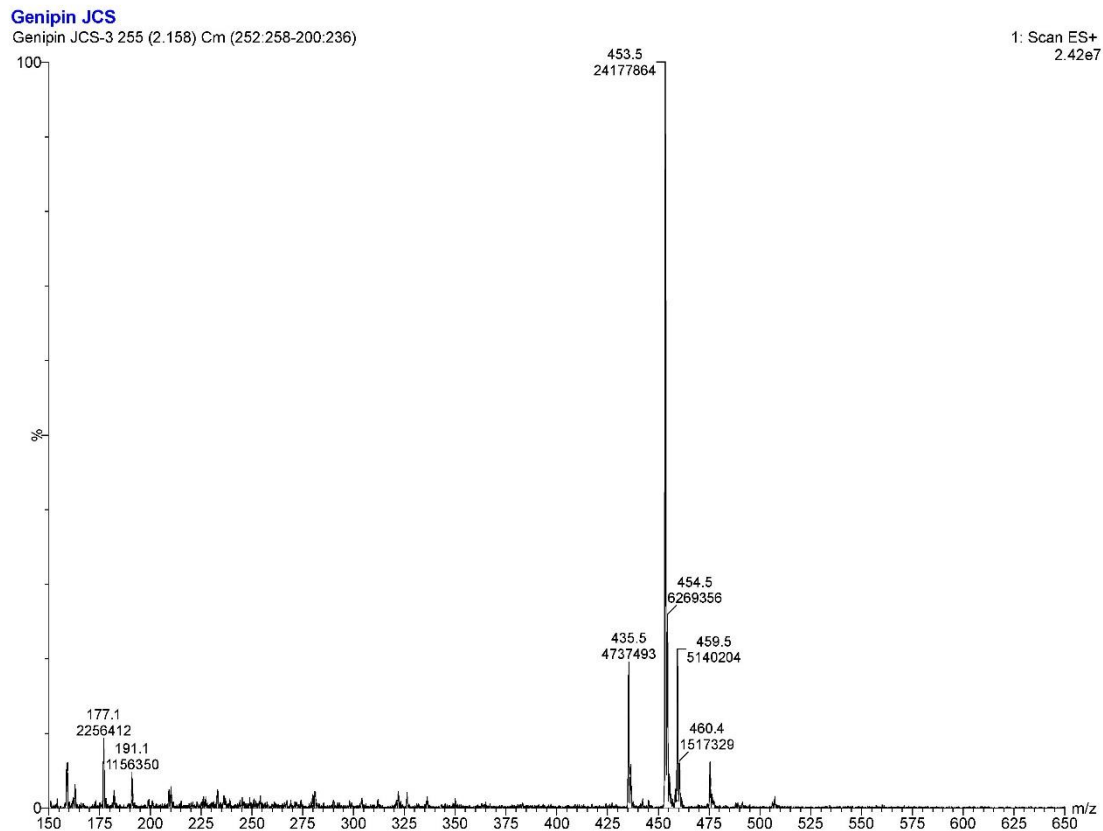
Gráfica 1. Espectro Ultravioleta de la genipina obtenida de un análisis cromatográfico con la molécula purificada.

Se procedió a realizarle a la muestra un análisis por espectrometría de masas por ionización química a presión atmosférica (APCI) y electrospray (ESI). En la Gráficas 2 y 3, se muestran los espectros de masas obtenidos en modo positivo, respectivamente. Es posible observar un pico a $453.5\ m/z$, el cual es asignado a la especie dimérica protonada $[2M+H]^+$ para ambos espectros. Este es un fenómeno que puede ocurrir en las fuentes de iones a presión atmosférica (Pan, 2008), por lo que al dividir la relación masa carga entre dos, se obtiene un valor de $226,75\ m/z$ que corresponde al peso molecular del compuesto extraído, la genipina ($226\ g/mol$) (Tenesaca, 2012).

En el espectro de masas APCI se encuentran diferentes m/z , la primera de ellas es a $435.5\ m/z$ y corresponde a la especie protonada $[2M+H]^+$, una señal a $476.6\ m/z$ correspondiente a un aducto de sodio $[2M+Na]^+$ y a $491.5\ m/z$ equivalente a un aducto de potasio $[2M+K]^+$. Para el espectro de masas ESI, se encontró de manera similar la especie protonada $[2M+H]^+$ a $435.5\ m/z$ (Alvarez, 2013).

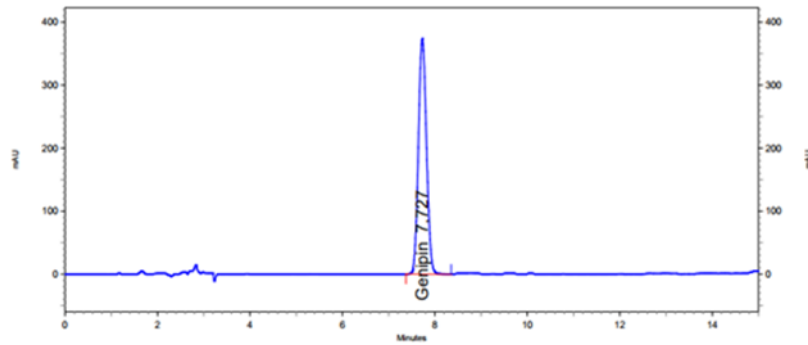


Gráfica 2. Espectro de masas APCI de genipina.



Gráfica 3. Espectro de masas ESI de la genipina.

La espectrometría de masas utilizada estaba acoplada a cromatografía líquida de alta resolución (UPLC) En la Gráfica 4, se muestra el tiempo de retención obtenido para la genipina, 7,72 minutos. En la Figura 11, se muestra el espectro UV obtenido mediante esta técnica, donde se evidencia la banda a 242nm, la cual es comparable con la obtenida experimentalmente en el espectro UV presentado anteriormente. Además, al obtenerse una señal bien simétrica junto con la ausencia de otras señales, se consideró que la genipina extraída presentaba un alto grado de pureza, esto puede determinarse gracias a que el detector es un arreglo de diodos que puede leer todas las longitudes de onda entre 250 y 300nm (Alvarez, 2013).



Gráfica 4. Tiempo de retención de la genipina.

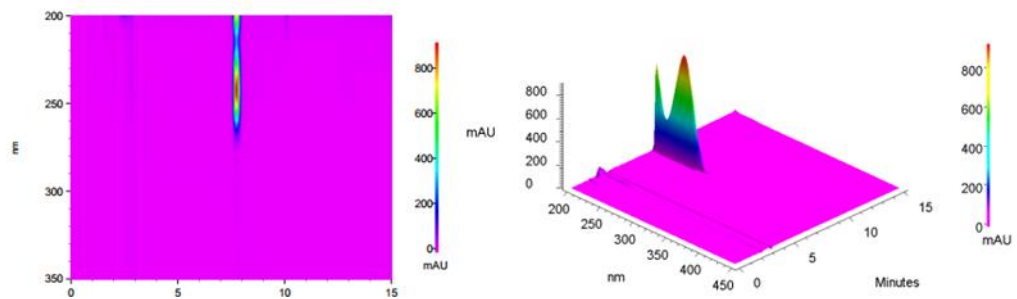


Figura 10. Tiempos de retención de genipina.

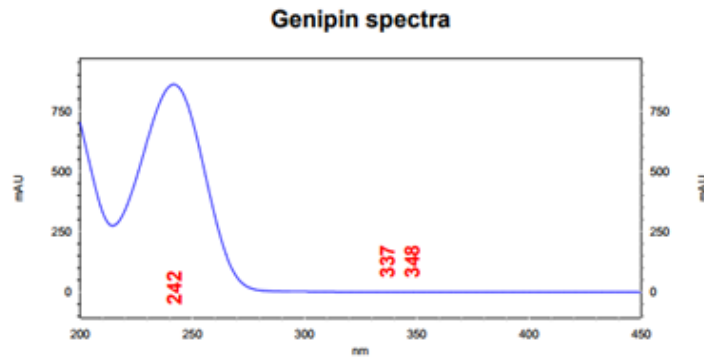


Figura 11. Espectro ultravioleta de genipina.

2.5.5. Hidrogeles de quitosano

Para comprobar la funcionalidad de la genipina extraída se procedió a la elaboración de hidrogeles de quitosano entrecruzados con genipina, para esto se preparó una solución de quitosano al 3% p/v, disolviendo 3 gramos de quitosano en 200mL en una solución al 2% de ácido acético v/v. Esta última se prepara al adicionar 2mL de

ácido acético en un balón de 100mL y aforando con agua destilada. En la preparación de esta solución se recomienda adicionar lentamente el quitosano con agitación a la solución de ácido acético para evitar la formación de grumos y favorecer las interacciones soluto solvente para aumentar la solubilidad del quitosano.

Una vez homogeneizada la solución de quitosano se procede al entrecruzamiento con genipina, el recipiente utilizado es una caja Petri de plástico pequeña con un volumen de 9mL, las cantidades de quitosano y genipina habían sido calculadas para una caja Petri con un volumen de 66mL por lo que fue necesario ajustar las cantidades, como se muestra a continuación (VALLEJO PINZÓN, 2014):

$$\begin{aligned} \text{mL de solución de quitosano} &= \frac{40\text{mL de sln quitosano} \times 9 \text{ mL Caja petri pequeña}}{66\text{mL Caja petri grande}} \\ &= 5,45\text{mL Solución de quitosano} \end{aligned}$$

Con una operación matemática similar se calcula la cantidad de genipina a usar:

$$\begin{aligned} \text{mg de genipina} &= \frac{5,45\text{mL Sln de quitosano caja petri peq} \times 120\text{mg de genipina}}{40\text{mL Sln de quitosano caja petri grande}} \\ &= 16 \text{ mg de genipina} \end{aligned}$$

Con las nuevas cantidades obtenidas se realiza el entrecruzamiento de quitosano y genipina, la caja Petri es sellada con papel parafilm y se introduce en el horno Binder a 45°C por 48 horas. Como se muestra en la Figura 12 se obtuvo un hidrogel estable con coloración azul, el cual fue cortado con un sacabocados de 12mm de diámetro, finalmente se dejó a temperatura ambiente durante 48 horas para obtener el hidrogel entrecruzado con genipina. La formación del hidrogel está basada en la formación de enlaces covalentes (Rivas, 2014), por lo cual se obtienen hidrogeles de quitosano con pigmentación azul.



Figura 12. Molde hidrogel de quitosano entrecruzado con genipina.

2.6. Conclusiones

Se definieron las condiciones en la planta de extracción PSE Solutions para llevar a cabo la extracción sólido - líquido de la genipina a partir del fruto de *Genipa americana*, a partir de esta técnica se extrajeron 48mg de genipina con un porcentaje de rendimiento de 0,0019%.

Mediante la cromatografía en columna se extrajeron 1,96 g de genipina con un rendimiento del 0,61%, el cual se encuentra cercano a los rendimientos obtenidos en extracciones de investigaciones anteriores.

A partir de los resultados obtenidos por las técnicas instrumentales empleadas, se logró la identificación de la genipina como compuesto extraído en este trabajo con un alto grado de pureza, debido a la ausencia de señales correspondientes a compuestos distintos a la genipina.

Se comprobó la funcionalidad de la genipina extraída con la elaboración de un hidrogel estable de quitosano entrecruzado con genipina de coloración azul.

2.7. Recomendaciones

Se recomienda realizar nuevamente la extracción a nivel semipiloto sin emplear la técnica de liofilización y sin aplicar calentamiento. De igual manera es aconsejable realizar todo el proceso en el menor tiempo posible para poder extraer la mayor cantidad de genipina antes de su entrecruzamiento.

Es necesaria la completa estandarización de la técnica para llevar el proceso a escala piloto y maximizar la producción de este compuesto aprovechando la alta distribución del fruto en la región.

Debido a las múltiples aplicaciones de la genipina en el sector industrial e investigativo, se recomienda el desarrollo de proyectos en donde se incluya la genipina en la formulación de productos farmacéuticos para conocer su comportamiento en sistemas de liberación modificada o controlada, así como la identificación de los cristales obtenidos en este trabajo.

2.8. Bibliografía.

- Alvarez, G. (2013). *Extracción, caracterización y valoración de genipina a partir del fruto de la genipa americana*.
- Djerassi, C., Nakano, T., James, a N., Zalkow, L. H., Eisenbraun, E. J., & Shoolery, J. N. (1960). Structure of Genipin. *The Journal of Organic Chemistry*, 26(5), 1192–1206. <https://doi.org/10.1021/jo01063a052>
- Genipa, L. (n.d.). *Genipa americana*, (1759), 1–11.
- Pan, H. (2008). A non- covalent dimer formed in electrospray ionisation mass spectrometry behaving as a precursor for fragmentations. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 24(24), 3556–3560. <https://doi.org/10.1002/rcm>
- PSE SAS. (2016). MANUAL DE OPERACIÓN PROCESS SOLUTIONS AND EQUIPMENT, (37), 1–41.
- Rivas, A. (2014). Obtención de Genipina a partir de frutos de caruto (Genipa americana L.) del llano venezolano. *Avances En Química*, 9(2), 75–86. <https://doi.org/10.13140/2.1.1160.3204>
- Romero, E. (2014). Obtención de hidrogeles de quitosano a partir del micelio de *Aspergillus niger* y su estudio en la liberación controlada de cefalexina., (1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Ryousuke TOUYAMA, Kenichiro INOUE, Yoshio TAKEDA, Masahiko YATSUZUKA, Takeshi IKUMOTO, Nobuharu MORITOME, Tetsuro SHINGU, Toshio YOKOI, H. I. (1993). Studies on the Blue Pigments Produced from Genipin and Methylamine. II .On the Formation Mechanisms of Brownish-Red Intermediates Leading to the Blue Pigment Formation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 42, 1571–1578.
- Tenesaca, S. M. (2012). ELABORACIÓN DE COSMÉTICOS DECORATIVOS A PARTIR DE FRUTOS VERDES DE *Genipa americana* L, 103.
- VALLEJO PINZÓN, J. C. (2014). Síntesis Y Caracterización De Redes De Polímeros Interpenetrados De Quitosano Y Npipa-Co-Ácido Itacónico. *Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015*, 1. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Velásquez, C. L., Rivas, A., & Ocanto, I. S. (2014). Obtención de Genipina a partir de frutos de caruto (Genipa americana L.) del llano venezolano. *Avances En Química*, 9(2), 75–86. <https://doi.org/10.13140/2.1.1160.3204>

- Virnignia, S. (2015). Liberación controlada de fármacos hidrogeles. *PhD Proposal*, 1, 21–91. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Alvarez, G. (2013). Extracción, caracterización y valoración de genipina a partir del fruto de la genipa americana.
- Genipa, L. (n.d.). Genipa americana, (1759), 1–11.
- Katime, I. A. (2004). *Materiales Inteligentes: Hidrogenes Macromoleculares. Algunas Aplicaciones Biomedicas.*
- Liu, H., Gao, L., Liu, M., Li, Q., Jiang, Y., & Zhang, S. (2006). Characterization and determination of genipin-1- β -gentiobioside in gardenia fruit by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection following electrospray ionization mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 84(1–2), 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2006.04.009>.
- Pse, S. A. S. (2016). *MANUAL DE OPERACIÓN PROCESS SOLUTIONS AND EQUIPMENT*, (37), 1–41.
- Ramos-de-la-Peña, A. M., Montañez, J. C., Reyes-Vega, M. de la L., Hendrickx, M. E., & Contreras-Esquivel, J. C. (2015). Recovery of genipin from genipap fruit by high pressure processing. *LWT - Food Science and Technology*, 63(2), 1347–1350. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.038>
- Service, F., Francis, J. K., Lowe, C. A., & Trabanino, S. (2000). *Bioecología de Arboles Nativos y Exóticos de Puerto Rico y las Indias Occidentales Silvics of Native and Exotic Trees of Puerto Rico and the Caribbean Islands.*
- TOHRU ENDO, H. T. (n.d.). The Constituents of Gardenia jasminoides Geniposide and Genipin-gentiobioside.
- VALLEJO PINZÓN, J. C. (2014). Síntesis Y Caracterización De Redes De Polímeros Interpenetrados De Quitosano Y Pnipa-Co-Ácido Itacónico. *Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015*, 1. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Yao, C., Liu, B., & Chang, C. (2004). Preparation of networks of gelatin and genipin as degradable biomaterials, 83, 204–208. <https://doi.org/10.1016/j.mathchemphys.2003.08.027>
- Zhou, M., Zhuo, J., Wei, W., Zhu, J., & Ling, X. (2012). Simple and effective large-scale preparation of geniposide from fruit of Gardenia jasminoides Ellis using a liquid–liquid two-phase extraction. *Fitoterapia*, 83(8), 1558–1561. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.09.001>

Zhou, T., Fan, G., Hong, Z., Chai, Y., & Wu, Y. (2005). Large-scale isolation and purification of geniposide from the fruit of *Gardenia jasminoides* Ellis by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1100(1), 76–80. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.09.026>.

Fundamentos de Química Orgánica. 2008. (s.f.). Obtenido de Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear: <http://www.sinorg.uji.es/Docencia/FUNDQO/TEMA10FQO.pdf>

Genipin. (11 de 05 de 2017). Obtenido de Cymitquimica.com: <http://www.cymitquimica.com/es/producto-quimico/5G-80458/genipin/6902-77-8>

(2003). Guía para análisis de muestra por infrarrojo. Caracas: Universidad Central de Venezuela.

Nations, F. a. (1986). Food and fruit-bearing forests species. 3: Examples from Latin America. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 308.

Oviedo, G. F. (1959). Natural history of the West Indies. The University of North Carolina Press, Chapel Hill. p.140.

Parque JE, L. J. (2002). Aislamiento y Caracterización de hidrosolubles intermedios de pigmentos azules transformado de Geniposide de *Gardenia Jasminoides*. *J. Agric. Food Chem*, 6511 a 6514.

Record, S. J., & Mell, C. D. (1924). *Timbers of tropical America*. Yale University Press, 610.

Ryousuke TOUYAMA, K. I. (1994). Studies on the Blue Pigments Produced from Genipin and Methylamine. II .On the Formation Mechanisms of Brownish-Red Intermediates Leading to the Blue Pigment Formation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1571-1578.

Sung, H. D. (1999). Gelatin-derived bioadhesives for closing skin wounds: an in vivo study. *J Biomater Sci Polym Ed.*, 751-771.

Chudnoff, M. (1980). *Tropical Timbers of the World*. *Agriculture*, (April), 826. <https://doi.org/10.5150/jngcgc.2010.078-D>

Djerassi, C., Nakano, T., James, a N., Zalkow, L. H., Eisenbraun, E. J., & Shoolery, J. N. (1960). Structure of Genipin. *The Journal of Organic Chemistry*, 26(5), 1192–1206. <https://doi.org/10.1021/jo01063a052>

FAO. (1986). Food and fruit-bearing forest forest species. 3: Examples from Latin America.

Genipa, L. (n.d.). *Genipa americana*, (1759), 1–11.

Biotage. (2017). Obtenido de <http://www.biotage.com/product-page/isolera-prime>

Colombia, U. N. (2015). *Catálogo de plantas y líquenes de Colombia*. Obtenido de Catálogo de plantas y líquenes de Colombia.: <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co>

Garden., M. B. (1 de 11 de 2017). *Tropicos*. Obtenido de Tropicos: <http://www.tropicos.org/Name/27906413>

Icesi, U. (2017). *Herbario Universidad Icesi*.

Merck, S. A. (2017). Obtenido de Sigmaaldrich.com

Puerto, E. (s.f.). *Diseño e ingeniería de ventilación y climatización*. Obtenido de <https://efrainpuerto.wordpress.com/2011/02/26/f1-2/>

Santa Cruz Biotechnology, I. (02 de 05 de 2015). *Ficha de datos de seguridad*. Obtenido de <http://datasheets.scbt.com/sds/eghs/es/sc-203057.pdf>

2.9. Anexos

El uso del fruto de *Genipa americana* en este proyecto de investigación requirió de la aprobación del Ministerio de Ambiente de la República de Colombia, para esto se diligenció un Documento de Acceso a Recursos Genéticos, en donde se hizo una pequeña descripción del proyecto, junto con la solicitud de acceso al área donde se encuentra el árbol, la recolección del fruto y el lugar de procesamiento y uso del material vegetal. A continuación, se anexan específicamente los apartados del documento para que pueden ser revisadas por el lector.

Anexo 1. Documento de Acceso a Recursos Genéticos.

6. LOCALIZACION DE LAS AREAS DE ACCESO Y DE REALIZACION DE LAS ACTIVIDADES DE ACCESO (COORDENADAS)

Ampliamente distribuida en América Central y América del Sur tropical. En Colombia se encuentra en todo el territorio.

a) DE RECOLECCION: El sitio de recolección está ubicado en el perímetro urbano de la ciudad de Cali, aproximadamente sobre la Carrera 80 entre las calles 13 y la calle 5, al sur de la ciudad. Latitud: 3°26'13" N. Longitud: 76°31'20" O.

b) UBICACION DEL AREA DE ACCESO: No aplica.

In Situ

Ex Situ

Coordenada

Detalle:

c) LUGAR DE PROCESAMIENTO Y/O USO DEL MATERIAL GENETICO, LOCALIZACIÓN

Laboratorio de Investigación de Productos Naturales y Laboratorio de Investigación en Química Orgánica y Polímeros de la Universidad Icesi.

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