

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 002**

51 Int. Cl.:

A23L 19/00 (2006.01)

A23L 5/20 (2006.01)

A23L 5/43 (2006.01)

A23P 10/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.11.2012 PCT/US2012/063836**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013 WO13070682**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2012 E 12790757 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017 EP 2775861**

54 Título: **Material rico en genipina y su uso**

30 Prioridad:

07.11.2011 US 201161556441 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

31.10.2017

73 Titular/es:

**WILD FLAVORS, INC. (100.0%)
1261 Pacific Avenue
Erlanger, KY 41018, US**

72 Inventor/es:

**WU, SHAOWEN y
HORN, GREGORY**

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 640 002 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Material rico en genipina y su uso

5 **Campo técnico**

Esta solicitud se basa en y reivindica la prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. número de serie 61/556.441, Wu y Horn, presentada el 7 de noviembre de 2001.

10 Esta invención se refiere a nuevos materiales ricos en genipina blanquecina y su uso como reactivos de reticulación y para el desarrollo de colorantes. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para producir materiales nuevos ricos en genipina a partir del fruto de *Genipa americana*; el material rico en genipina contiene genipina hasta el 97 % en p/p lo que permite su uso como agentes de reticulación y como materias primas para la producción de colorantes rojos.

15 **Antecedentes**

Hoy en día, los productos químicos sintéticos, tales como colorantes o reactivos de reticulación, tienden a tener una menor aceptación en las industrias alimentaria, cosmética, animal y textil. Por razones de seguridad, reales o percibidas, las personas tienden a favorecer el uso de ingredientes naturales u orgánicos en productos alimentarios, cosméticos, textiles y biomateriales.

La genipina es un compuesto incoloro. Pertenece al grupo iridoide. Es muy activo químicamente y reacciona inmediatamente cuando se combina con compuestos que tienen grupos amino primarios, tales como aminoácidos, colágeno, quitosano, compuestos de tipo glucosamina y diversas proteínas y enzimas. Cuando hay oxígeno, el producto puede volverse azul, verde o negro rápidamente. La genipina es un éster de iridoide, por lo tanto, se puede hidrolizar para generar ácido genipínico que también puede reaccionar con diferentes compuestos para generar colorantes rojos y marrones. Los colorantes generados a partir de la genipina son estables al calor y al pH. Dado que la genipina normalmente proviene de materiales vegetales, sus características Kosher ofrecen un gran potencial para el uso de colorantes derivados de la genipina en panadería y aplicaciones de alimentos enlatados.

Gran cantidad de iridoideos, tales como la geniposida, el gardenósido, la genipin-1-b-gentiobiósido, el ácido geniposídico y la genipina, se puede encontrar en la fruta de *Gardenia jasminoides* Ellis. El genipósido, un glicósido iridoide, es un componente principal que comprende el 7-8 % del peso del fruto, mientras que naturalmente en la fruta de *Gardenia* solo existen cantidades traza de genipina. Históricamente, los frutos de *Gardenia* se extraían de la fruta con metanol o etanol y a continuación se separaban como pigmento amarillo sobre carbón activo y se trataban con enzimas con actividad beta-glucosídica o actividad proteolítica para convertir los iridoideos de glicósidos en forma de aglicona, genipina o ácido genipínico. A continuación, se puede hacer reaccionar la genipina o el ácido genipínico con otros compuestos para producir colorantes (KR1020010096213A).

La genipina y otros compuestos iridoideos, como el ácido genipínico, la genipina-gentiobiósido, el genipósido y el ácido geniposídico, también se encuentran en los frutos y hojas de *Genipa americana*, también conocida como Genipap, o Huito, una planta silvestre tropical. La genipina está presente de forma natural en la fruta madura, y su cantidad es del 0 al 3,0 % del peso del fruto, dependiendo del grado de madurez. La genipina es estable en la célula de la planta aunque no se establece donde se almacena. Siempre que la célula se rompe, la genipina reaccionará espontáneamente con los aminoácidos que existen naturalmente en la pulpa de la fruta y virarán a color azul o negro en un ambiente con aire. En nuestra solicitud de patente anterior (US20090246343A1), produjimos la coloración (azul) de zumo de fruta mezclando la pulpa del fruto de *Genipa americana* con jugos de otras frutas o verduras. El zumo azul natural estable a ácidos se ha utilizado ampliamente en las industrias de alimentos y bebidas. Lopes et al. (US7927637B2) utilizó el zumo en bruto no procesado obtenido de la pulpa del fruto de *Genipa americana*, y lo mezcló con glicina o con glicina más almidón, para hacer colorantes azules. Patrice Andre y su colaborador (US20100196298A1) utilizaron materiales colorantes obtenidos de la extracción de plantas de *Genipa americana*, *Gardenia jasminoides*, *Rothmannia*, *Adenorandia* o *Cremaspora*, unidas a un sustrato sólido, para preparar composiciones cosméticas.

La genipina no solo puede generar colorantes, sino que también puede actuar como un buen agente de reticulación. Campbell et al. descubrieron un nuevo polímero plástico biodegradable que incluía genipina como agente reticulante (EP2093256A2). Dichos plásticos son útiles en sistemas biológicos para la reparación de heridas, implantes, stents, encapsulación y administración de fármacos y otras aplicaciones. Fujikawa et al. Reivindicó (US4983524) el uso de aglicona iridoide, la genipina, como agente reticulante para producir enzima inmovilizada en perlas para la industria alimentaria. Quijano, R y Tu, H (US 20080195230A1) desveló el uso de genipina para fijar tejidos naturales enteros para reducir la antigenicidad y la inmunogenicidad y prevenir la degradación enzimática del tejido cuando se implanta en un huésped.

65 Sin embargo, la producción la genipina pura históricamente implica muchos pasos, incluyendo la separación por HPLC, y actualmente su coste es elevado. Ninguna descripción en la técnica enseña la preparación de un extracto

rico en genipina estable de la planta *Genipa americana* y sus amplias aplicaciones como colorantes naturales y agentes reticulantes en las industrias de alimentos, fármacos, suplementos nutricionales, productos para el cuidado personal, cosméticos, piensos, textiles, polímeros y biomateriales.

5 Sumario

La presente divulgación proporciona un método para producir colorantes rojos a partir de extractos ricos en genipina de la planta de *Genipa americana*. El proceso implica la extracción con disolvente acuoso o polar y la extracción con disolvente orgánico no polar; el polvo formado es un extracto rico en genipina con un color blanquecino y que tiene un contenido de genipina de hasta aproximadamente el 97 %. La invención está definida por el juego de reivindicaciones adjunto.

La presente divulgación además proporciona aplicaciones de los extractos ricos en genipina en la producción de colorantes naturales y la formación de polímeros para su uso en una amplia gama de áreas, tales como alimentos, fármacos, suplementos nutricionales, productos para el cuidado personal, cosméticos, piensos, textiles, polímeros biodegradables y la producción de biomateriales. Ejemplos de dichos usos se encuentran en numerosos documentos de patente, incluyendo US8283222, CN101899484, US20120189584, WO2012048188, CN102399370, CA2458821, DE602007013718, US20110082199, TW1334878, US20100183699.

Tal como se usa en el presente documento, todas las relaciones y proporciones indicadas son "en peso" a menos que se especifique lo contrario.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación de un diagrama de flujo de una realización del proceso para preparar el extracto rico en genipina producido a partir de la fruta de *Genipa americana*.

Descripción detallada

La presente divulgación proporciona un método para producir extractos ricos en genipina estables de la planta de *Genipa americana*. El proceso implica la extracción con disolvente acuoso o polar y la extracción con disolvente orgánico no polar. La forma en polvo resultante de extracto rico en genipina es de color blanquecino y tiene un contenido de genipina de hasta aproximadamente el 97 %. La presente divulgación además proporciona aplicaciones de los extractos ricos en genipina en la producción de colorantes naturales estables al calor y como nuevo agente de reticulación para su uso en una amplia gama de áreas, tales como productos alimenticios, fármacos, suplementos nutricionales, productos para el cuidado personal, cosméticos, piensos para animales, textiles, polímeros biodegradables y la producción de biomateriales.

Materiales de partida

Los materiales de partida utilizados en este proceso son los frutos u hojas de una planta de *Genipa americana* L., también conocida por numerosos nombres informales: genipap, huitoc, jaguar, bilito, cafecillo denta, caruto, caruto rebalsero, confitura de singe, danipa, genipa, génipa, genipayer bitu, guaitil, guaricha, guayatil colorado, huitoc, huitoc, huitu, irayol, jagua blanca, jagua amarilla, jagua colorado, jeipapeiro, enebro, maluco, mandipa, marmelade-box, nandipa, ñandipa genipapo, tapaculo, tapoeripa, taproepa totumillo, yagua, yanupa-i, yenipa-i, yenipapa bi, genipapo, huitoc, vito, chipara, guanapay, u otras variedades como jenipaporana, o jenipapo-bravo, etc. La fruta es óptima para su cosecha cuando madura en tamaño, es firme, y de color verde a marrón verdoso.

Los materiales pueden ser la fruta entera, pulpa de la fruta, zumo de fruta, puré de fruta, concentrado del zumo de fruta, polvo seco de frutas o del zumo, parte insoluble en agua de la fruta y hojas de *Genipa americana* L.

Proceso para la extracción rica en genipina

Para producir los extractos ricos en genipina de la presente invención, los frutos maduros de *Genipa americana* se procesan con agua o un disolvente polar en proporciones de aproximadamente 1:0,5-5,0 (en peso) dependiendo de la eficacia de la extracción, preferentemente de aproximadamente 1:1-1,5. Después del lavado y/o blanqueado, la fruta se pela y se corta en trozos; después se muele o se mezcla con agua o disolventes polares; se extrae con o sin calentamiento, la pulpa, las semillas y la piel se separan por filtración; y se recoge líquido. La extracción puede tener lugar durante aproximadamente 1 hora, preferentemente aproximadamente 15-30 minutos, a una temperatura de aproximadamente 15-40 °C. La extracción con agua o el disolvente polar de la pulpa del fruto de *Genipa americana* se puede repetir 1-3 veces. A continuación, se mide el pH de los extractos de los disolventes polares y se ajusta a aproximadamente 3,8-4,0 usando ácidos. La concentración se puede realizar en un evaporador rotatorio con vacío y la temperatura ajustada a aproximadamente 40-46 °C. El contenido de sólidos en el concentrado puede ser superior al 15 % en p/p, preferentemente a aproximadamente el 40-70 % en p/p.

A continuación, el extracto acuoso o el extracto acuoso concentrado rico en genipina se puede extraer

adicionalmente con disolventes orgánicos no polares que implican una mezcla adecuada (por remoción o agitación) en una relación de aproximadamente 1:1. Los disolventes orgánicos no polares tienen un índice de polaridad de aproximadamente 0 a 5,0 y una solubilidad en agua inferior a aproximadamente el 30 %. La fase del disolvente orgánico a continuación se separa de la fase acuosa mediante sedimentación y sifonación de la capa orgánica superior o utilizando una centrifuga de alta velocidad. La extracción con disolvente no polar puede repetirse 2-3 veces dependiendo de la eficiencia de la extracción. Los extractos ricos en genipina pueden secarse posteriormente por evaporación y el disolvente orgánico se puede reciclar y reutilizarse para la extracción de genipina. El sólido restante amarillo o blanquecino es un extracto rico en genipina en el que el contenido de genipina es de al menos aproximadamente el 70 % en p/p de los sólidos.

Como alternativa, los frutos maduros de *Genipa americana* se procesan directamente con disolventes orgánicos en una proporción de aproximadamente 1:1-2. Después del lavado y/o blanqueado, se pelan y se cortan en trozos, luego se muelen o se mezclan, se extraen directamente con disolvente orgánico no polar, con o sin calentamiento, se separa la pulpa, las semillas y la piel y se recoge el extracto disolvente. La extracción puede tener lugar durante aproximadamente 1 hora, preferentemente durante aproximadamente 15-30 minutos a una temperatura de aproximadamente 18-25 °C. La extracción con disolvente orgánico se puede repetir 2-3 veces dependiendo de la eficacia de la extracción. Los extractos ricos en genipina se pueden secar posteriormente utilizando un evaporador y un condensador, y el disolvente orgánico se puede reciclar y reutilizarse.

Los extractos ricos en genipina pueden ser extractos de disolventes acuosos o polares obtenidos a partir de las fuentes de materiales de partida descritos. Los disolventes polares incluyen aquellos con solubilidad en agua de hasta el 100 % y un índice de polaridad superior a 5,0, tal como agua, ácido acético, metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, acetonitrilo, acetona, dioxano, tetrahidrofurano, etc., o soluciones tampón de ácido acético, cítrico, fosfato o mezclas de las mismas en diferentes relaciones. Esta lista no pretende limitar el disolvente utilizado, sin embargo, considerando la seguridad alimentaria para usos alimentarios del extracto se prefieren soluciones de agua, etanol, n-propanol, isopropanol, metanol y soluciones tampón de ácido acético, cítrico, y fosfato.

Los extractos ricos en genipina como alternativa pueden ser extractos de disolventes orgánicos obtenidos a partir de extractos de disolventes acuosos o polares descritos anteriormente. Los disolventes orgánicos no polares incluyen aquellos con menos de aproximadamente el 30 % de solubilidad en agua y un índice de polaridad de 0 a aproximadamente 5,0, tal como acetato de etilo, acetato de butilo, n-butanol, éter dietílico, hexano, 2-butanona, cloroformo, 1,2-dicloroetano, benceno, xileno, metil-t-butiléter, tolueno, tetracloruro de carbono, tricloroetileno, ciclohexano, pentano y heptano, o mezclas de los mismos en diferentes proporciones. Esta lista no pretende limitar el disolvente utilizado, sin embargo la seguridad alimentaria, se prefieren acetato de etilo, acetato de butilo y n-butanol.

Los extractos ricos en genipina como alternativa pueden ser extractos de disolventes orgánicos obtenidos de las fuentes de materiales de partida descritas. Los disolventes orgánicos incluyen aquellos con un índice de polaridad inferior a aproximadamente 6,0, y mezclas de los mismos en diferentes proporciones. Se prefiere el disolvente o mezcla de disolventes con una baja solubilidad en agua para obtener extractos incoloros ricos en genipina.

Los métodos utilizados para la separación sólido-líquido pueden ser, por ejemplo, filtración regular, centrifugación, filtración por prensa y filtración con cartucho de membrana. La separación líquido-líquido se puede realizar, por ejemplo, utilizando una centrifugadora de alta velocidad, o por sedimentación y sifonado de la capa líquida requerida.

Los ácidos utilizados para el ajuste del pH pueden ser cualesquiera ácidos orgánicos o inorgánicos, seleccionados para ser adecuados para el uso final previsto.

La concentración se puede realizar por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, por evaporación usando un evaporador rotatorio de vacío, un evaporador de evaporación rápida, un dispositivo de filtración por ósmosis o un dispositivo de ultrafiltración con una membrana adecuada.

Propiedades del extracto rico en genipina

El extracto rico en genipina es un polvo o cristales blanquecinos. Algunos lotes pueden tener un tinte ligeramente amarillento o verdoso si la pureza es relativamente baja. El contenido de genipina puede ser de hasta aproximadamente el 97 % (p/p) dependiendo del método de extracción. No se encontraron genipósido, ácido geniposídico u otros compuestos iridoides en el extracto rico en genipina cuando se analizaron por HPLC. El resto de la composición del extracto rico en genipina es principalmente humedad, grasa, y también pequeñas cantidades de ácidos y compuestos que contienen nitrógeno, siendo el resto carbohidratos, como se indica en la siguiente tabla.

Especificación de material rico en genipina

Genipina	30-97 %
Ácidos grasos	<1,0 %
Grasa	<5,0 %
Proteína	<1,0 %
Ácidos orgánicos	<0,5 %

Se pueden usar métodos de HPLC para determinar el contenido de genipina y realizar otros análisis de iridoides.

- 5 El contenido de genipina del polvo blanquecino rico en genipina es estable cuando se almacena a temperaturas refrigeradas. El nivel de genipina disminuyó en menos de aproximadamente un 5 % después de 3 meses de almacenamiento. Sin embargo, cuando se mezcla el extracto rico en genipina con compuestos que tienen un grupo amina primaria, la genipina reaccionará rápidamente y generará colorantes y/o polímeros.
- 10 El alto contenido de extracto de genipina se disuelve fácilmente en alcohol, mezclas de alcohol-agua o agua caliente. Su solubilidad en agua fría es limitada.

Producción de colorantes

- 15 La presente invención proporciona un método para fabricar un colorante rojo usando el extracto rico en genipina. El extracto rico en genipina se hidroliza para eliminar un grupo metilo y convierte la genipina en ácido genipínico que reacciona adicionalmente con compuestos que contienen amina, con ácido orgánico adicional presente y en condiciones anaerobias, para generar pigmento rojo. Se puede utilizar calentamiento para acelerar la formación de pigmentos rojos. La solución roja puede purificarse adicionalmente sobre una columna de intercambio iónico y el material eluido puede concentrarse en un evaporador rotatorio de vacío. El rojo genipa es un pigmento estable al calor, y también es estable a un pH alto.
- 20

El extracto rico en genipina se puede dispersar o disolver en aproximadamente el 5-50 % de etanol, preferentemente en aproximadamente el 5-15 % de etanol, y solución de hidróxido de sodio o de hidróxido de potasio 0,5-1,5 N aproximadamente, a una concentración de extracto de aproximadamente el 5-10 % en p/p. La hidrólisis se puede realizar con o sin calentamiento durante aproximadamente 30 minutos a 24 horas, preferentemente aproximadamente 2-10 horas a temperatura ambiente (~20 °C).

25

El extracto hidrolizado rico en genipina puede llevarse a pH neutro usando ácidos, preferentemente ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido adípico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido fumárico y ácido málico, preferentemente ácido acético y/o ácido tartárico. El pH de la solución hidrolizada se puede ajustar a un intervalo de aproximadamente 3,5-5,0.

30

La solución acidificada a continuación se calienta a aproximadamente 65-85 °C, y preferentemente a aproximadamente 70-75 °C, durante aproximadamente 5-120 minutos, preferentemente 10-20 minutos aproximadamente. Los subproductos marrones insolubles se eliminan ya que no contribuirán a la formación de color rojo. La separación de precipitados se puede realizar mediante cualquiera de los métodos de filtración o centrifugación conocidos en la técnica, por ejemplo, usando filtración regular, centrifugación, filtración a presión, o filtración tangencial o métodos de filtración de cartucho de membrana. La formación de los subproductos marrones insolubles puede potenciarse adicionalmente mediante la adición de carbonato de calcio para ajustar el pH a aproximadamente 5-7,5 y mezcla durante aproximadamente 5-30 minutos. La separación por precipitación se puede conseguir por los métodos descritos anteriormente.

35

40

La solución transparente descrita anteriormente se puede ajustar a pH 4,0-4,6 aproximadamente con ácido orgánico o sal, preferentemente ácido acético y/o acetato sódico. El color rojo se genera después de mezclar con compuestos que tienen grupos amina primarios y calentamiento a aproximadamente 70-95 °C, preferentemente 80-85 °C aproximadamente, durante aproximadamente 2 horas, o aproximadamente 90-95 °C, durante aproximadamente 1 hora. Los compuestos con grupos amino primarios se pueden seleccionar entre aminoácidos, tales como alanina, arginina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, histidina, valina, leucina y serina. Esta lista no pretende limitar los compuestos útiles con grupos amina primaria.

45

50

Además, se pueden proporcionar medios para generar otros colorantes, como púrpura, rojo, amarillo, naranja, marrón y negro usando el extracto rico en genipina. Los púrpuras y los rojos se pueden crear mezclando el extracto rico en genipina con carmin, zumo de remolacha y colorantes de ancianina y solución con compuestos que contienen amina. Los naranjas y los amarillos se pueden crear haciendo reaccionar extracto rico en genipina con pentosas, como xilosa, ribosa o vitamina C. Se puede generar un tono de color negro cuando se incluyen metales alcalinotérreos (por ejemplo magnesio o calcio) o metales con múltiples valencias durante la reacción de genipina con compuestos que contienen un grupo amina primaria.

55

Agente de reticulación

La presente invención proporciona nuevos materiales que contienen hasta aproximadamente el 97 % de contenido de genipina. El extracto rico en genipina puede reaccionar con cualquier compuesto que contenga un grupo amina primario, tal como colágeno, gelatina, quitosano, glucosamina, y diversas enzimas y proteínas, para formar nuevos materiales con textura utilizados, por ejemplo, en las industrias de alimentos, cosméticos, biomateriales, y polímeros.

La presente invención también proporciona un agente reticulante obtenido de la planta natural *Genipa americana* que puede reemplazar a los productos químicos sintetizados, tales como glutaraldehído, formaldehído, glioxal, malonaldehído, succinaldehído, compuestos epoxi, etc. El extracto rico en genipina utilizado como agente de reticulación tiene una toxicidad mucho menor que los reactivos de reticulación sintéticos utilizados habitualmente.

El extracto rico en genipina puede funcionar como agente reticulante natural para la producción de encapsulación en las industrias alimentaria y farmacéutica. Los materiales encapsulados pueden ser ingredientes nutricionales, tales como aceite omega-3, vitamina A, aceite linolénico conjugado o medicamentos. La gelatina, el colágeno, las proteínas del suero de la leche, la caseína, el quitosano, las proteínas de soja y otras proteínas vegetales o animales, son buenos materiales de partida junto con el extracto rico en genipina para su uso en la fabricación de una envoltura de encapsulación, una película o una micro-membrana. Los productos tienen una buena estabilidad térmica y mecánica, además de su propiedad biocompatible.

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de ilustrar adicionalmente la presente divulgación, pero en ningún caso deben tomarse como limitantes.

Ejemplo 1

Se generó un extracto rico en genipina basado en el siguiente proceso:

a) Se pelaron los frutos de Huito para obtener 866,0 g de fruta pelada. La fruta pelada se cortó en trozos y se mezcló con 1300 g de agua desionizada (DI) y se purificó con un mezclador para producir un puré;

b) el puré se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente; y el sólido insoluble se separó del extracto acuoso por filtración. A continuación, se añadieron 1212,4 g de agua DI al filtrado y se mezclaron durante 15 minutos seguido de una segunda etapa de filtración;

c) se ajustó el filtrado a pH <4,0 utilizando ácido cítrico, y se concentró hasta un 25-55 % (p/p) de contenido sólido en un evaporador rotatorio;

d) a continuación, el extracto acuoso concentrado se extrajo utilizando acetato de etilo en una relación 1:1. Se recogió la capa de acetato de etilo transparente incoloro o ligeramente amarilla. Esta extracción líquido-líquido se repitió 2 veces;

e) a continuación, las capas de extracto de acetato de etilo combinadas se evaporaron sobre un evaporador rotatorio a una temperatura de 40 °C y un vacío de 35 mm de Hg para eliminar el disolvente. El acetato de etilo condensado se puede reutilizar para la extracción de genipina. Después de evaporar el acetato de etilo, se obtuvo un polvo blanquecino o ligeramente amarillo. El polvo contenía el 74,4 % en p/p de genipina.

Ejemplo 2

Se generó un extracto rico en genipina basado en el siguiente proceso:

a) 462 g de frutos de Huito se pelaron y se mezclaron con 537 g de agua DI para producir puré;

b) el puré se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente, y el sólido insoluble se separó del extracto acuoso por filtración. A continuación, se añadió la misma cantidad de agua DI a la parte sólida, y la etapa de extracción se repitió 2 veces;

c) el extracto acuoso combinado se ajustó a pH <4,0 utilizando ácido cítrico y se concentró hasta un 24,92 % (p/p) de contenido sólido a través de un evaporador rotatorio;

d) a continuación, el extracto acuoso concentrado se extrajo utilizando acetato de butilo en una relación 1:1. Se recogió la capa de acetato de butilo transparente, incolora o ligeramente amarilla. Esta extracción líquido-líquido se repitió 2 veces;

e) a continuación, se evaporó el extracto combinado de acetato de butilo en un evaporador rotatorio a una temperatura de 55 °C y vacío de 35 mm Hg para eliminar el disolvente. El acetato de butilo condensado se puede reutilizar para la extracción de genipina. Después de evaporar el acetato de butilo, se obtuvo un polvo

blanquecino o ligeramente amarillo. El polvo contiene el 90,9 % en p/p de genipina.

Ejemplo 3

- 5 Se analizó la estabilidad del extracto rico en genipina preparado por el método del Ejemplo 2. Polvo rico en genipina, de 0,20 g cada uno, se selló en viales y se almacenó a 4 °C. Se extrajeron muestras a las 0, 4 semanas, 6 semanas a menos de 4,0 con ácido tartárico. La solución se calentó a 74 °C durante 15 min y se enfrió. El precipitado se separó por filtración a través de papel de filtro n.º 2. A continuación, el pH del filtrado se ajustó a ~6,5 usando carbonato de calcio y la suspensión se mezcló durante 10 minutos. El precipitado resultante se separó por filtración y el pH del filtrado se ajustó a 4,0-4,5 mediante la adición de ácido acético. Después de añadir alanina (4,50 g), se desarrolló el color rojo de la genipina calentando a 82 °C durante 2 h. El color se analizó tomando 0,30 g de genipina de color rojo y dilución a 30,0 g con agua DI. Los valores de L, a y b se midieron en un espectrómetro Hunter Lab y la curva de absorción se midió en un espectrómetro UV/VIS. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

10

Tabla 1. Estabilidad del extracto rico en genipina

Tiempo de Almacenamiento (semanas)	Genipina, % en p/p
0	83,9
4	86,0
6	85,3
12	84,7

El material de genipina fue estable durante el período del ensayo.

Ejemplo 4

15

- Se disolvieron quince gramos de extracto rico en genipina preparado por el método del Ejemplo 1 en 118,10 g de solución de etanol al 10 %. Se añadieron a la mezcla anterior 0,89 g de solución de KOH 0,9 N y la genipina se hidrolizó con agitación a temperatura ambiente (22 °C) durante 7,5 horas. El pH de la solución hidrolizada se ajustó a menos de 4,0 con ácido tartárico. La solución se calentó a 74 °C durante 15 min y se enfrió. El precipitado se separó por filtración a través de papel de filtro n.º 2. A continuación, el pH del filtrado se ajustó a ~6,5 usando carbonato de calcio y la suspensión se mezcló durante 10 minutos. El precipitado resultante se separó por filtración y el pH del filtrado se ajustó a 4,0-4,5 mediante la adición de ácido acético. Después de añadir alanina (4,50 g), se desarrolló el color rojo de la genipina calentando a 82 °C durante 2 h. El color se analizó tomando 0,30 g de genipina de color rojo y dilución a 30,0 g con agua DI. Los valores de L, a y b se midieron en un espectrómetro Hunter Lab y la curva de absorción se midió en un espectrómetro UV/VIS. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

20

25

Parámetros	Valor
Valor L de Hunter	27,86
Valor a de Hunter	10,21
Valor b de Hunter	2,26
Longitud de onda (máx, nm)	550,09
Absorción (máx.)	0,67314

Ejemplo 5

- 30 Se disolvieron tres gramos de extracto rico en genipina preparado por el método del Ejemplo 2 en 23,5 g de solución de etanol al 10 %. Se añadieron 3,78 g de una solución de KOH 1,0 N a la mezcla anterior y la genipina se hidrolizó con agitación a temperatura ambiente (22 °C) durante 8,0 horas. El pH de la solución hidrolizada se ajustó a menos de 4,0 con ácido tartárico. La solución se calentó a 74 °C durante 15 minutos y se enfrió. El precipitado se eliminó por filtración en papel de filtro n.º 2. A continuación, el pH del filtrado se ajustó a ~7,0 usando carbonato de calcio y la suspensión se mezcló durante 15 minutos. El precipitado resultante se separó por filtración y el pH del filtrado se ajustó a 4,0-4,5 por adición de ácido acético. Después de añadir alanina (1,20 g), se desarrolló el color rojo de la genipina calentando a 84 °C durante 2 horas. El color se analizó tomando 0,50 g de genipina de color rojo y diluyendo a 30,0 g con agua DI. Los valores de L, a y b se midieron en un espectrómetro Hunter Lab y la curva de absorción se midió en un espectrómetro UV/VIS. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

35

40

Parámetros	Valor
Valor L de Hunter	27,42
Valor a de Hunter	9,46
Valor b de Hunter	2,32
Longitud de onda (máx, nm)	549,97
Absorción (máx.)	0,94423

Ejemplo 6

- 45 Se dispersaron 0,37 g de extracto rico en genipina, preparado por el método del Ejemplo 2, en 34,63 g de una solución acuosa de etanol al 10 % en un vaso de precipitados. Se añadieron 0,7 g de alanina y 1,4 g de xilosa y se disolvieron. La muestra se calentó a 92 °C durante 1 hora. Después de enfriar, se analizó el color tomando 1,50 g de la solución de color y diluyendo hasta 30,0 g con agua DI. Se observó que el color era rojo anaranjado en contraste con el color rojo observado cuando la alanina se mezclaba sola con el extracto rico en genipina. Los valores de L, a

ES 2 640 002 T3

y b se midieron en un espectrómetro Hunter Lab y los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Parámetros	L-Alanina y Xilosa
Color	Rojo anaranjado
Valor L de Hunter	25,12
Valor a de Hunter	2,48
Valor b de Hunter	-0,22

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar colorantes rojos a partir de un material rico en genipina del fruto de *Genipa Americana* que comprende
- 5
- (a) suministrar zumo o extracto de fruta de una planta de *Genipa americana*, que contiene suficiente genipina o derivados de genipina capaces de formar la aglicona genipina;
- (b) extraer la genipina/derivados de genipina de la fruta usando un disolvente seleccionado entre agua, un disolvente polar y mezclas de los mismos;
- 10
- (c) ajustar el pH de la etapa de extracción (b) para formar la aglicona genipina, usando ácidos
- (d) extraer la aglicona genipina de la mezcla de la etapa (c) usando un disolvente no polar;
- (e) procesar el extracto de la etapa (d) para formar un material que contiene al menos aproximadamente el 70 % de genipina usando al menos la mezcla, y eliminación de disolvente, obteniendo de este modo un material rico en genipina; y
- 15
- (f) mezclar el material rico en genipina obtenido en la etapa (e) después de la hidrólisis en condiciones alcalinas con un aminoácido, en presencia de un ácido orgánico adicional, y en condiciones anaeróbicas.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la genipina/derivado de genipina se selecciona entre genipina, genipina-gentiobiosido, genipósido, ácido geniposídico, gardinósido y mezclas de los mismos.
- 20
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el disolvente no polar se selecciona entre acetato de etilo, acetato de butilo, n-butanol, éter dietílico, hexano, 2-butanona, cloroformo, 1,2-dicloroetano, benceno, xileno, metil-t-butil éter, tolueno, tetracloruro de carbono, tricloroetileno, ciclohexano, pentano, heptanos y mezclas de los mismos.
- 25
4. El método de la reivindicación 1, en el que la fuente de genipina se selecciona entre fruta entera, zumo de fruta, puré de fruta, concentrado de zumo de fruta, formas en polvo secas de frutas o zumos, partes insolubles en agua de la fruta y mezclas de las mismas, de la fruta de Huito, *Genipa americana*, o sus variedades.
- 30
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el aminoácido se selecciona entre alanina, arginina, lisina, ácido glutámico y mezclas de los mismos.

Figura 1. Proceso para la preparación de extracto rico en genipina

