

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 797 532**

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

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2012 E 18170388 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 3427598**

54 Título: **Método para preparar un colorante a partir de un extracto rico en genipina de Genipa americana**

30 Prioridad:

**07.11.2011 US 201161556441 P**

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

**02.12.2020**

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:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 797 532 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

Método para preparar un colorante a partir de un extracto rico en genipina de *Genipa americana*

5 **Campo técnico**

Esta solicitud se basa en y reivindica la prioridad de la solicitud provisional de patente estadounidense con n.º de serie 61/556.441, Wu y Horn, presentada el 7 de noviembre de 2011.

10 Esta invención se refiere a un método de preparación de un colorante a partir de *Genipa americana*. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para producir materiales ricos en genipina novedosos a partir del fruto de *Genipa americana*; el material rico en genipina tiene un contenido de genipina de al menos el 70% p/p de los sólidos lo que permite su uso como materia prima para la producción de colorantes.

15 **Antecedentes**

Hoy en día, los productos químicos sintéticos, tales como colorantes o reactivos de reticulación, tienden a tener una aceptación cada vez menor en las industrias alimentaria, cosmética, de alimentación animal y textil. Por motivos de seguridad, ya sean reales o percibidos, las personas tienden a favorecer el uso de componentes naturales u orgánicos en productos alimenticios, cosméticos, textiles y de biomateriales.

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

Puede encontrarse una gran cantidad de iridoides, como genipósido, gardenósido, genipin-1-b-gentiobiósido, ácido geniposídico y genipina, en el fruto de *Gardenia jasminoides* Ellis. El genipósido, un glucósido iridoide, es un componente principal que comprende el 7-8% del peso del fruto, mientras que sólo existen pequeñas cantidades de genipina en el fruto de la gardenia. Históricamente, los iridoides en el fruto de la gardenia se extrajeron del fruto con metanol o etanol, y luego se separaron como pigmento amarillo en carbono activo, y se trataron con enzimas que tienen actividad beta-glucosídica o actividad proteolítica para convertir los iridoides glicósidos en forma de aglicona, genipina o ácido genipínico. Luego, la genipina o el ácido genipínico pueden hacerse reaccionar con otros compuestos para producir colorantes (KR1020010096213A).

La genipina y otros compuestos iridoides, como el ácido genipínico, el genipin-gentiobiósido, el genipósido y el ácido geniposídico, también se encuentran en los frutos y hojas de *Genipa americana*, también conocido como jenipapo o huitu, una planta silvestre tropical. La genipina está presente de manera natural en el fruto maduro, y su cantidad es de desde el 0 hasta el 3,0% del peso del fruto dependiendo del grado de madurez. La genipina es estable en la célula vegetal a pesar de que no está establecido donde se almacena. Cada vez que se rompe la célula, la genipina reaccionará espontáneamente con los aminoácidos que existen de manera natural en la pulpa del fruto y cambiará de color a azul o negro en un ambiente con aire. En la solicitud de patente anterior (US20090246343A1) del presente solicitante, se elaboró zumo del fruto colorante (azul) mezclando la pulpa del fruto de *Genipa americana* con zumos de otras frutas o vegetales. El zumo azul natural estable a los ácidos se ha utilizado ampliamente en las industrias alimentarias y de bebidas. Lopes *et al.* (US7927637B2) usaron zumo de fruto sin procesar obtenido a partir de la pulpa del fruto de *Genipa americana*, y se mezcló con glicina o con glicina más almidón, para elaborar colorantes azules. Patrice Andre y colaboradores (US20100196298A1) usaron materiales colorantes obtenidos de la extracción de plantas de *Genipa americana*, *Gardenia jasminoides*, *Rothmannia*, *Adenorandia* o *Cremaspora*, unidas a un sustrato sólido, para elaborar composiciones cosméticas.

La genipina no sólo 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 de reticulación (EP2093256A2). Tales plásticos son útiles en sistemas biológicos para reparación de heridas, implantes, endoprótesis vasculares, encapsulación y administración de fármacos, y otras aplicaciones. Fujikawa *et al.* reivindicaron (US4983524) el uso de la aglicona iridoide, genipina, como agente de reticulación para producir enzimas inmovilizadas en perlas para la industria alimentaria. Quijano, R y Tu, H (US 20080195230A1) dieron a conocer el uso de genipina para fijar tejidos naturales completos para reducir la antigenicidad e inmunogenicidad y prevenir la degradación enzimática del tejido cuando se implanta en un huésped.

65 Sin embargo, la producción de genipina pura implica históricamente muchas etapas, incluida la separación por HPLC, y actualmente su coste es alto. Ninguna descripción en la técnica enseña la preparación de un extracto

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

## 5 Sumario

La presente invención proporciona un método de preparación de un colorante a partir de *Genipa americana* que comprende las etapas de:

- 10 1) preparar un extracto rico en genipina a partir de *Genipa americana*; y
  - 2) usar dicho extracto rico en genipina en la producción de colorantes;
- en el que la preparación del extracto rico en genipina comprende las siguientes etapas de:
- 15 a) lavar y/o blanquear los frutos maduros de *Genipin americana*;
  - b) pelar los frutos y cortarlos en trozos;
  - 20 c) moler o combinar los frutos con agua o disolventes polares en una razón en peso de 1:0,5-5,0;
  - d) extraer los frutos con el agua o los disolventes polares;
  - 25 e) separar la pulpa, las semillas y la cáscara del fruto mediante filtración y recoger el filtrado líquido;
  - f) ajustar el pH del filtrado a de 3,8 a 4,0 usando ácidos;
  - g) concentrar el filtrado para producir un extracto acuoso rico en genipina;
  - 30 h) extraer dicho extracto acuoso con disolventes orgánicos apolares a través de mezclado en una razón de aproximadamente 1:1, en el que dichos disolventes orgánicos apolares tienen un índice de polaridad de desde 0 hasta 5,0 y una solubilidad en agua de menos del 30%;
  - 35 i) separar la fase de disolvente orgánico de la fase acuosa mediante la sedimentación o sifonaje de la fase orgánica superior o mediante el uso de una centrifuga de alta velocidad;
  - j) evaporar el disolvente orgánico para producir un extracto rico en genipina como un sólido amarillo o blanquecino en el que el contenido de genipina es de al menos el 70% p/p de los sólidos.
- 40 La invención se define por el conjunto adjunto de reivindicaciones y cualquier otro aspecto o realización expuesto en el presente documento que no está dentro del alcance de las reivindicaciones es sólo para información.

La presente divulgación presenta además 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 en la

45 producción de productos alimenticios, fármacos, complementos nutricionales, productos de cuidado personal, cosméticos, alimentos para animales, textiles, polímeros biodegradables y biomateriales. Los ejemplos de tales usos se encuentran en numerosos documentos de patente, incluyendo los documentos US8283222, CN101899484, US20120189584, WO2012048188, CN102399370, CA2458821, DE602007013718, US20110082199, TW1334878, US20100183699.

50 Tal como se usa en el presente documento, todas las razones y proporciones se indican "en peso" a menos que se especifique lo contrario. Además, todas las patentes, solicitudes de patente y publicaciones técnicas citadas se incorporan en el presente documento por referencia.

## 55 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una representación de un diagrama de flujo de una realización del procedimiento para elaborar un extracto rico en genipina producido a partir del fruto de *Genipa americana*.

## 60 Descripción detallada

### Materiales de partida

65 Los materiales de partida usados en este procedimiento son frutos o hojas de una planta de *Genipa americana* L. que también se conoce por numerosos nombres informales: jenipapo, huito, jagua, bilito, cafecillo denta, caruto, caruto rebalseo, confiture de singe, danipa, genipa, génipa, genipayer bitu, guaitil, guaricha, guayatil colorado,

huitol, huitoc, huitu, irayol, jagua blanca, jagua amarilla, jagua colorado, jeipapeiro, juniper, maluco, mandipa, marmelade-box, nandipa, nandipa genipapo, tapaculo, tapoeripa, taproepa totumillo, yagua, yanupa-i, yenipa-i, yenipapa bi, genipapo, huitoc, vito, chipara, guanapay, u otras variedades tales como jenipaporana, o jenipapo-bravo, etc. El fruto es óptimo para su recogida cuando madura en tamaño, es firme y de color verde a marrón  
5 verdozo.

Los materiales puede ser el fruto completo, la pulpa del fruto, el zumo del fruto, el puré del fruto, el concentrado del zumo del fruto, el polvo secado de los frutos o el zumo, la parte insoluble en agua del fruto y las hojas de *Genipa americana* L.  
10

#### Procedimiento 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 disolvente polar en razones de aproximadamente 1:0,5-5,0 (en peso) dependiendo de la eficiencia de la extracción, preferiblemente desde razones aproximadamente 1:1-1,5. Después del lavado y/o blanqueamiento, el fruto se pela y se corta en trozos; luego se muele o combina con agua o disolventes polares; se extrae con o sin calentamiento, se separan la pulpa, las semillas y la cáscara mediante filtración; y se recoge el líquido. La extracción puede tener lugar durante hasta aproximadamente 1 hora, preferiblemente aproximadamente 15-30 min, a una temperatura de aproximadamente 15-40°C. La extracción con agua o disolvente polar de la pulpa del fruto de *Genipa americana* puede repetirse 1-3 veces. Luego, se mide el pH de los extractos de disolvente polar y se ajusta a aproximadamente 3,8-4,0 usando ácidos. La concentración puede realizarse en un evaporador rotatorio a vacío y la temperatura se ajusta a aproximadamente 40-46°C. El contenido de sólidos en el concentrado puede ser mayor del 15% p/p, preferiblemente aproximadamente el 40-70% p/p.  
15  
20

A continuación, el extracto acuoso o el extracto acuoso rico en genipina concentrado puede extraerse adicionalmente con disolventes orgánicos apolares que implica un mezclado apropiado (removiendo o agitando) en una razón de aproximadamente 1:1. Esos disolventes orgánicos apolares tienen un índice de polaridad desde aproximadamente 0 hasta 5,0 y una solubilidad en agua menor de aproximadamente el 30%. Luego se separa la fase de disolvente orgánico de la fase acuosa mediante la sedimentación y sifonaje de la fase orgánica superior o mediante el uso de una centrifuga de alta velocidad. La extracción con disolvente apolar puede repetirse 2-3 veces dependiendo de la eficiencia de la extracción. Los extractos ricos en genipina pueden secarse posteriormente mediante evaporación y el disolvente orgánico puede recircularse y reutilizarse para la extracción de genipina. El sólido amarillo o blanquecino restante es un extracto rico en genipina en el que el contenido de genipina es de al menos aproximadamente el 70% p/p de los sólidos.  
25  
30  
35

Los extractos ricos en genipina pueden ser extractos acuosos o de disolvente polar obtenidos de las fuentes de materiales de partida descritas. Los disolventes polares incluidos aquellos con solubilidad en agua de hasta el 100% e índice de polaridad mayor de aproximadamente 5,0, tal como agua, ácido acético, metanol, etanol, n-propanol, iso-propanol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, acetonitrilo, acetona, dioxano, tetrahidrofurano, etc., o disoluciones de tampón de ácido acético, cítrico, fosfato, o mezclas de los mismos en diferentes razones. Esta lista no pretende limitar el disolvente usado, sin embargo, considerando la seguridad alimenticia, se prefieren agua, etanol, n-propanol, iso-propanol, metanol y disoluciones de tampón de ácido acético, cítrico y fosfato, para los usos alimentarios del extracto.  
40

Los extractos ricos en genipina pueden ser alternativamente extractos de disolvente orgánico obtenidos de los extractos acuosos o de disolvente polar descritos anteriormente. Los disolventes orgánicos apolares incluyen aquellos con menos de aproximadamente el 30% de solubilidad en agua y un índice de polaridad desde 0 hasta aproximadamente 5,0, tal como acetato de etilo, acetato de butilo, n-butanol, dietil éter, hexano, 2-butanona, cloroformo, 1,2-dicloroetano, benceno, xileno, metil-t-butil éter, tolueno, tetracloruro de carbono, tricloroetileno, ciclohexano, pentano y heptano, o mezclas de los mismos en diferentes razones. Esta lista no pretende limitar el disolvente usado, sin embargo, considerando la seguridad alimenticia, se prefieren acetato de etilo, acetato de butilo y n-butanol.  
45  
50

Los métodos usados para la separación sólido-líquido pueden ser, por ejemplo, filtración convencional, centrifugación, filtración con prensado y filtración por cartucho de membrana. La separación líquido-líquido puede realizarse, por ejemplo, mediante el uso de una centrifuga de alta velocidad, o mediante la sedimentación y sifonaje de la fase líquida requerida.  
55

Los ácidos usados para el ajuste del pH pueden ser cualquier ácido orgánico o inorgánico, seleccionado para ser adecuado para el uso final previsto.  
60

La concentración puede realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante evaporación usando un evaporador rotatorio a vacío, un evaporador instantáneo, un dispositivo de filtración por ósmosis o un dispositivo de ultrafiltración con una membrana adecuada.  
65

#### Propiedades del extracto rico en genipina

El extracto rico en genipina es un polvo o cristales blanquecinos. Algunos lotes pueden tener una coloración ligeramente amarillenta o verdosa 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 analizó mediante 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 hidratos de carbono, tal como se indica en la siguiente tabla.

10 Especificación del material rico en genipina

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

Pueden usarse métodos de HPLC para determinar el contenido de genipina y realizar otro análisis de iridoides.

15 El contenido de genipina del polvo blanquecino rico en genipina es estable cuando se almacena a temperaturas de refrigeración. El nivel de genipina disminuyó en menos de aproximadamente el 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.

20 El extracto con alto contenido de genipina se disuelve fácilmente en alcohol, mezclas de alcohol-agua o agua caliente. Su solubilidad en agua fría es limitada.

Producción de colorantes

25 La presente invención también proporciona un método de fabricación de un colorante azul usando la reacción del extracto rico en genipina y mezclando con agua y aminoácidos, por ejemplo (pero sin limitarse a), lisina, histidina, arginina, glutamina, asparagina, metionina, glicina, ácidos glutámicos, tirosina, valina, alanina, serina, leucina, taurina, carnitina, ornitina y citrulina, en presencia de oxígeno. Puede usarse calentamiento para acelerar la velocidad de reacción. Las razones molares del extracto rico en genipina con respecto a aminoácidos son desde aproximadamente 1:0,5 hasta aproximadamente 1:10. Los matices azules generados son variables entre azulón, azul violáceo, azul brillante y azul verdoso dependiendo del aminoácido usado. El colorante azul generado a partir del extracto rico en genipina es un pigmento termoestable y estable a los ácidos.

35 También pueden generarse colorantes azules similares mediante la reacción del extracto rico en genipina con otros extractos, zumos de frutas y vegetales, materiales de origen vegetal y animal, incluyendo productos lácteos y de huevo, que contienen aminoácidos, polipéptidos, proteínas, y compuestos con uno o más grupos amina primaria. El color azul también puede generarse mediante la reacción del extracto rico en genipina con colágeno, gelatina, quitosano, enzimas y microbios. Adicionalmente, el colorante producido puede concentrarse o depositarse sobre arcilla u otros portadores y usarse en aplicaciones alimenticias, cosméticas (dentífrico, maquillaje, tinte capilar, etc.) y textiles (ropa).

45 La presente invención proporciona un método de fabricación de un colorante rojo usando el extracto rico en genipina. El extracto rico en genipina se hidroliza para retirar un grupo metilo y convertir la genipina en ácido genipínico que reacciona adicionalmente con compuestos que contienen aminas, con el ácido orgánico extra presente y en condiciones anaerobias, para generar un pigmento rojo. Puede usarse calentamiento para acelerar la formación del pigmento rojo. La disolución roja puede purificarse adicionalmente en una columna de intercambio iónico y el material eluido puede concentrarse en un evaporador rotatorio a vacío. El rojo de genipa es un pigmento termoestable, y también es estable a un pH elevado.

50 El extracto rico en genipina puede dispersarse o disolverse en etanol al 5-50% aproximadamente, preferiblemente etanol al 5-15% aproximadamente, y una disolución de hidróxido de sodio o hidróxido de potasio 0,5-1,5 N aproximadamente, hasta una concentración de extracto de aproximadamente el 5-10% p/p. Puede realizarse hidrólisis con o sin calentamiento durante desde aproximadamente 30 min hasta 24 horas, preferiblemente aproximadamente 2-10 horas a temperatura ambiente (~20°C).

55 El extracto rico en genipina hidrolizado puede neutralizarse en pH usando ácidos, preferiblemente 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, preferiblemente ácido acético y/o ácido tartárico. El pH de la

disolución hidrolizada puede ajustarse al intervalo de aproximadamente 3,5-5,0.

Luego se calienta la disolución acidificada hasta aproximadamente 65-85°C, y preferiblemente aproximadamente 70-75°C, durante aproximadamente 5-120 minutos, preferiblemente aproximadamente 10-20 minutos. Los subproductos de color marrón insolubles se retiran ya no contribuirán a la formación del color rojo. La separación del precipitado puede lograrse mediante cualquier método de filtración o centrifugación conocido en la técnica, por ejemplo, usando métodos de filtración convencional, centrífuga, filtración con prensado, o filtración de flujo tangencial o filtración por cartucho de membrana. La formación de los subproductos de color marrón insolubles puede mejorarse adicionalmente mediante la adición de carbonato de calcio para ajustar el pH a aproximadamente 5-7,5 y mezclado durante aproximadamente 5-30 minutos. La separación por precipitación puede lograrse mediante los métodos descritos anteriormente.

La disolución transparente descrita anteriormente puede ajustarse a pH aproximadamente 4,0-4,6 con sal o ácido orgánico, preferiblemente ácido acético y/o acetato de sodio. El color rojo se genera después del mezclado con compuestos que tienen grupos amina primaria y calentamiento a aproximadamente 70-95°C, preferiblemente aproximadamente 80-85°C, durante aproximadamente 2 horas, o aproximadamente 90-95°C, durante aproximadamente 1 hora. Los compuestos con grupos amina primaria pueden seleccionarse de aminoácidos, tales como alanina, arginina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, histidina, valina, leucina y serina. Este listado no pretende limitar los compuestos útiles con grupos amina primaria.

La presente invención proporciona además un método de fabricación de colorante verde usando el extracto rico en genipina. El extracto rico en genipina puede reaccionar con determinados aminoácidos, tales como isoleucina, treonina, cisteína y triptófano, para generar el color verde. También puede reaccionar con compuestos que contienen aminas primarias y mezclarse con pigmentos de cúrcuma, bija y carotenoides para generar el color verde. Debido a que el verde de genipa puede proporcionar un matiz verde resistente al calor, es muy útil en la industria alimentaria debido a la inestabilidad del pigmento verde natural, clorofila.

También pueden generarse colorantes verdes similares mediante la reacción del extracto rico en genipina con otros extractos, zumos de frutas y vegetales, materiales de origen vegetal y animal, incluyendo productos lácteos y de huevo, que son ricos en aminoácidos, por ejemplo, isoleucina, treonina, cisteína y triptófano. El color verde también puede generarse mediante la reacción del extracto rico en genipina con colágeno, gelatina, quitosano, enzimas y microbios y el mezclado con pigmentos de cúrcuma, bija y carotenoides para generar el color verde. Adicionalmente, el colorante producido puede concentrarse o depositarse sobre arcilla u otros portadores y usarse en aplicaciones alimenticias, cosméticas (dentífrico, maquillaje, tinte capilar, etc.) y textiles (ropa).

La presente invención proporciona además un medio para generar otros colorantes, como morado, rojo, amarillo, naranja, marrón y negro usando el extracto rico en genipina. Los morados y rojos pueden crearse mezclando el extracto rico en genipina con carmín, zumo de remolacha y colorantes de antocianina y disolución con compuestos que contienen aminas. Los naranjas y amarillos pueden crearse haciendo reaccionar extracto rico en genipina con pentosas, tales como xilosa, ribosa o vitamina C. El matiz de color negro puede generarse cuando se implican metales alcalinotérreos (por ejemplo, magnesio o calcio) o metales con multivalencias durante la reacción de la genipina con compuestos que contienen un grupo amina primaria.

#### Agente de reticulación

La presente divulgación 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 primaria, tal como colágeno, gelatina, quitosano, glucosamina y diversas enzimas y proteínas, para formar nuevos materiales de textura usados en, por ejemplo, las industrias alimentaria, cosmética, de biomateriales y de polímeros.

La presente divulgación también proporciona un agente de reticulación obtenido a partir de la planta natural, *Genipa americana*, que puede sustituir productos químicos sintetizados, tales como glutaraldehído, formaldehído, glioxal, malonaldehído, succinaldehído, compuestos epoxídicos, etc. El extracto rico en genipina usado como un agente de reticulación tienen una toxicidad mucho menor que los reactivos de reticulación sintéticos habitualmente usados.

El extracto rico en genipina puede funcionar como un agente de reticulación natural para la producción de encapsulación en las industrias alimentaria y farmacéutica. Los materiales encapsulados pueden ser componentes nutricionales, tales como aceite omega-3, vitamina A, aceite linolénico conjugado o medicamentos. La gelatina, el colágeno, las proteínas del suero, 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 para elaborar una cubierta, película o micromembrana de encapsulación. Los productos tienen buena estabilidad térmica y mecánica, así como su propiedad biocompatible.

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

Ejemplo 1

Se generó un extracto rico en genipina basándose en el siguiente procedimiento:

- 5 a) Se pelaron frutos de huito para proporcionar 866,0 g de fruto pelado. Se cortó el fruto pelado en trozos y se combinó con 1300 g de agua desionizada (DI) y se hizo puré con una mezcladora para producir un puré;
- b) se dejó reposar el puré durante 15 min a temperatura ambiente; y se separó el sólido insoluble del extracto acuoso mediante filtración. Luego, se añadieron 1212,4 g de agua DI al filtrado y se mezclaron durante 15 minutos  
10 seguido por una segunda etapa de filtración;
- c) se ajustó el filtrado a pH < 4,0 usando ácido cítrico, y se concentró hasta el 25-55% (p/p) de contenido de sólidos en un rotavapor;
- 15 d) luego, se extrajo el extracto acuoso concentrado usando acetato de etilo en una razón 1:1. Se recogió la fase de acetato de etilo transparente incolora o ligeramente amarilla. Esta extracción líquido-líquido se repitió 2 veces;
- e) a continuación, se evaporaron las fases de extracto de acetato de etilo combinadas en un rotavapor a una temperatura de 40°C y vacío de 35 mm Hg para retirar el disolvente. El acetato de etilo condensado puede  
20 reutilizarse para la extracción de genipina. Después de la evaporación del acetato de etilo, se obtuvo un polvo blanquecino o ligeramente amarillo. El polvo contenía el 74,4% p/p de genipina.

Ejemplo 2

25 Se generó un extracto rico en genipina basándose en el siguiente procedimiento:

- a) Se pelaron frutos de huito, 462 g, y se combinaron con 537 g de agua DI para producir un puré;
- b) se dejó reposar el puré durante 15 min a temperatura ambiente, y se separó el sólido insoluble del extracto  
30 acuoso mediante filtración. Luego, se añadió la misma cantidad de agua DI a la parte sólida, y se repitió la etapa de extracción 2 veces;
- c) se ajustó el extracto acuoso combinado a pH < 4,0 usando ácido cítrico y se concentró hasta el 24,92% (p/p) de contenido de sólidos a través de un rotavapor;  
35
- d) luego, se extrajo el extracto acuoso concentrado usando acetato de butilo en una razón 1:1 ratio. Se recogió la fase de acetato de butilo transparente incolora o ligeramente amarilla. Esta extracción líquido-líquido se repitió 2 veces;
- 40 e) a continuación, se evaporó el extracto de acetato de butilo combinado en un rotavapor a una temperatura de 55°C y vacío de 35 mm Hg para retirar el disolvente. El acetato de butilo condensado puede reutilizarse para la extracción de genipina. Después de la evaporación del acetato de butilo, se obtuvo un polvo blanquecino o ligeramente amarillo. El polvo contiene el 90,9% p/p de genipina.

45 Ejemplo 3

El extracto rico en genipina elaborado mediante el método del ejemplo 2 se sometió a prueba para determinar la estabilidad. Polvo rico en genipina, 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 y 12 semanas, y se sometió a prueba el contenido de genipina usando el método de  
50 HPLC. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Estabilidad del extracto rico en genipina

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

55 El material de genipina era estable a lo largo del periodo de la prueba.

Ejemplo 4

## ES 2 797 532 T3

Se disolvieron quince gramos de extracto rico en genipina elaborado mediante el método del ejemplo 1 en 118,10 g de disolución de etanol al 10%. Se añadieron 16,89 g de disolución de KOH 0,9 N a la mezcla anterior y se hidrolizó la genipina con agitación a temperatura ambiente (22°C) durante 7,5 horas. Se ajustó el pH de la disolución hidrolizada a menos de 4,0 con ácido tartárico. Se calentó la disolución hasta 74°C durante 15 min y se enfrió. Se separó por filtración el precipitado a través de un papel de filtro n.º 2. A continuación, se ajustó el pH del filtrado a ~6,5 usando carbonato de calcio y se mezcló la suspensión durante 10 minutos. Se separó por filtración el precipitado resultante y se ajustó el pH del filtrado a 4,0-4,5 mediante la adición de ácido acético. Tras la adición de alanina (4,50 g), se desarrolló el color rojo de la genipina calentando hasta 82°C durante 2 h. Se analizó el color tomando 0,30 g de color rojo de genipina y diluyendo hasta 30,0 g con agua DI. Se midieron los valores L, a y b en un espectrómetro Hunter Lab, y se midió la curva de absorción en un espectrómetro UV/VIS. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

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

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

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

Se disolvieron un gramo y medio de extracto rico en genipina elaborado mediante el método del ejemplo 2 en 11,8 g de disolución de etanol al 10%. Se añadieron 1,97 g de disolución de KOH 1,0 N a la mezcla anterior y se hidrolizó la genipina con agitación a temperatura ambiente (22°C) durante 8,0 horas. Se ajustó el pH de la disolución hidrolizada a menos de 4,0 con ácido tartárico. Se calentó la disolución hasta 74°C durante 15 minutos y se enfrió. Se retiró el precipitado mediante filtración a través de un papel de filtro n.º 2. A continuación, se ajustó el pH del filtrado a ~7,0 usando carbonato de calcio y se mezcló la suspensión durante 15 minutos. Se separó por filtración el precipitado resultante y se ajustó el pH del filtrado a 4,0-4,5 mediante la adición de ácido acético. Tras la adición de alanina (0,60 g), taurina (0,60 g) y cloruro de magnesio (0,4486g), se desarrolló un color negro amarronado oscuro calentando hasta 84°C durante 2 horas. Se analizó el color tomando 1,0 g de color de genipina y diluyendo hasta 30,0 g con agua DI. Se midieron los valores L, a y b en un espectrómetro Hunter Lab, y se midió la curva de absorción en un espectrómetro UV/VIS. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Parámetros	Valor
Valor L de Hunter	24,73

## ES 2 797 532 T3

Valor a de Hunter	0,29
Valor b de Hunter	0,85
Longitud de onda (máx., nm)	542,83
Absorción (máx.)	0,0170
Longitud de onda (2º pico, nm)	595,06
Absorción (2º pico)	0,88795

### Ejemplo 7

- 5 Se dispersaron 0,108 g de extracto rico en genipina, elaborado mediante el método del ejemplo 2, en 8,6 g de disolución acuosa de etanol al 8% en un tubo de ensayo. Se disolvieron completamente los sólidos después de calentamiento en un baño de agua de ~50°C. Luego, se pusieron alícuotas de 1,0 ml de la disolución de genipina anterior en tubo de ensayos de manera separada y se añadieron 0,012 g de L-treonina, 0,014 g de L-isoleucina o 0,016 g de L-histidina, respectivamente. Se calentaron todos los tubos de ensayo en un baño de agua de 80°C durante 2 horas. Se analizó el color tomando 0,30 g del color de genipina producido y diluyendo hasta 30,0 g con agua DI. Se midieron los valores L, a y b en un espectrómetro Hunter Lab, y se midió la curva de absorción en un espectrómetro UV/VIS. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Parámetros	L-treonina	L-isoleucina	L-histidina
Dilución (g/ml)	0,50/100	0,30/100	0,10/100
Color	Verde	Verde	Azul
Valor L de Hunter	79,12	87,41	71,13
Valor a de Hunter	-5,91	-3,42	-7,82
Valor b de Hunter	-2,42	-0,77	-17,46
Longitud de onda (máx., nm)	596,32	600,12	592,2
Absorción (máx.)	0,11914	0,06746	0,2537

### Ejemplo 8

- 15 Se dispersaron 0,37 g de extracto rico en genipina, elaborado mediante el método del ejemplo 2, en 34,63 g de disolución 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. Se calentó la muestra a 92°C durante 1 hora. Después de enfriar, se analizó el color tomando 1,50 g de la disolución 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 se mezclaba alanina sola con el extracto rico en genipina. Se midieron los valores L, a y b 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. Método de preparación de un colorante a partir de *Genipa americana* que comprende las etapas de:
  - 5 1) preparar un extracto rico en genipina a partir de *Genipa americana*; y
  - 2) usar dicho extracto rico en genipina en la producción de colorantes;
 en el que la preparación del extracto rico en genipina comprende las siguientes etapas de:
  - 10 a) lavar y/o blanquear los frutos maduros de *Genipin americana*;
  - b) pelar los frutos y cortarlos en trozos;
  - 15 c) moler o combinar los frutos con agua o disolventes polares en una razón en peso de 1:0,5-5,0;
  - d) extraer los frutos con el agua o los disolventes polares;
  - e) separar la pulpa, las semillas y la cáscara del fruto mediante filtración y recoger el filtrado líquido;
  - 20 f) ajustar el pH del filtrado a de 3,8 a 4,0 usando ácidos;
  - g) concentrar el filtrado para producir un extracto acuoso rico en genipina;
  - 25 h) extraer dicho extracto acuoso con disolventes orgánicos apolares a través de mezclado en una razón de aproximadamente 1:1, en el que dichos disolventes orgánicos apolares tienen un índice de polaridad de desde 0 hasta 5,0 y una solubilidad en agua de menos del 30%;
  - 30 i) separar la fase de disolvente orgánico de la fase acuosa mediante la sedimentación o sifonaje de la fase orgánica superior o mediante el uso de una centrifuga de alta velocidad;
  - j) evaporar el disolvente orgánico para producir un extracto rico en genipina como un sólido amarillo o blanquecino en el que el contenido de genipina es de al menos el 70% p/p de los sólidos.
- 35 2. Método según la reivindicación 1, en el que el disolvente orgánico apolar se selecciona del grupo que consiste en acetato de etilo, acetato de butilo, n-butanol, dietil éter, hexano, 2-butanona, cloroformo, 1,2-dicloroetano, benceno, xileno, metil-t-butil éter, tolueno, tetracloruro de carbono, tricloroetileno, ciclohexano, pentano, heptanos o mezclas de los mismos.
- 40 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el disolvente orgánico apolar se selecciona del grupo que consiste en acetato de etilo, acetato de butilo y n-butanol.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el disolvente polar es un disolvente que tiene una solubilidad en agua de hasta el 100% y un índice de polaridad mayor de 5,0.
- 45 5. Método según la reivindicación 4, en el que el disolvente polar se selecciona del grupo que consiste en agua, ácido acético, metanol, etanol, n-propanol, iso-propanol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, acetonitrilo, acetona, dioxano, tetrahidrofurano, y disoluciones de tampón de ácido acético, cítrico, fosfato, o mezclas de los mismos; preferiblemente del grupo que consiste en agua, etanol, n-propanol, iso-propanol, metanol y disolución de tampón de ácido acético, cítrico y fosfato.
- 50 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se produce un colorante azul en la etapa 2) o bien
  - 55 (i) mezclando el extracto rico en genipina con agua y aminoácidos en una razón molar de desde 1:0,5 hasta 1:10 en presencia de oxígeno, preferiblemente en el que los aminoácidos se seleccionan del grupo que consiste en lisina, histidina, arginina, glutamina, asparagina, metionina, glicina, ácidos glutámicos, tirosina, valina, alanina, serina, leucina, taurina, carnitina, ornitina y citrulina; o bien
  - 60 (ii) haciendo reaccionar el extracto rico en genipina con otros extractos, zumos de frutas y vegetales, materiales de origen vegetal y animal, incluyendo productos lácteos y de huevo, que contienen aminoácidos, polipéptidos, proteínas, y compuestos con uno o más grupos amina primaria; o bien
  - (iii) haciendo reaccionar el extracto rico en genipina con colágeno, gelatina, quitosano, enzimas y microbios.
- 65 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se produce un colorante verde en la etapa

2) o bien

- 5 (i) haciendo reaccionar el extracto rico en genepina con aminoácidos, tales como isoleucina, treonina, cisteína y triptófano; o bien
- (ii) haciendo reaccionar el extracto rico en genepina con compuestos que contienen aminas primarias y mezclando con pigmentos de cúrcuma, bija y carotenoides; o bien
- 10 (iii) haciendo reaccionar el extracto rico en genipina con otros extractos, zumos de frutas y vegetales, materiales de origen vegetal y animal, incluyendo productos lácteos y de huevo, que son ricos en aminoácidos tales como isoleucina, treonina, cisteína y triptófano; o bien
- 15 (iv) haciendo reaccionar el extracto rico en genipina con colágeno, gelatina, quitosano, enzimas y microbios y mezclando con pigmentos de cúrcuma, bija y carotenoides.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se produce un colorante negro en la etapa 2) haciendo reaccionar el extracto rico en genepina con compuestos que contienen un grupo amina primaria en presencia de metales alcalinotérreos o metales con multivalencias.
- 20 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que un se produce un colorante morado o rojo en la etapa 2) mezclando el extracto rico en genepina con carmín, zumo de remolacha y colorantes de antocianina y una disolución con compuestos que contienen aminas.
- 25 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se produce un colorante naranja o amarillo en la etapa 2) haciendo reaccionar el extracto rico en genepina con pentosas o vitamina C, preferiblemente en el que dichas pentosas se seleccionan de xilosa y ribosa.

Figura 1 Procedimiento para preparar extracto rico en genipina

