

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual

Oficina Internacional

(Código de barras)

(43) Fecha de Publicación Internacional

27 de Noviembre de 2014 (27.11.2014)

(10) Número de Publicación Internacional

WO 2014/188275 A9

(51) Clasificación internacional de patente: No clasificado

(21) Número de solicitud internacional:

PCT/IB2014/001735

(22) Fecha de presentación internacional:

22 de mayo de 2014 (25.05.2014)

(25) Idioma de presentación:

Inglés

(26) Idioma de publicación:

Inglés

(30) Datos de la prioridad:

61/826,321 22 de mayo de 2013(22.05.2013) Estados Unidos de América

61/836,072 17 de junio de 2013 (17.06.2013) Estados Unidos de América

(71) Solicitante: ECOFLORA S.A.S. [CO/CO]; Calle 80 Sur # 47 D 65, Urbanización Industrial La Holanda, Int 103 Sabaneta, Antioquia, 103 (CO).

(72) Inventores: CANO, Esteban, Vargas; Calle 83 B # 57-87, Itagui (CO), **LOPEZ, Luis, Fernando Echeverri;** Carrera 43B 7 Sur-177, Apto. 2106, Medellin (CO), **ROMERO, Juan, Fernando Gil;** Calle 56 A, No. 81-33, Apto. 318, Medellin (CO), **GARCES, Edwin, Andres Correa;** Carrera 53D #9 Sur 76, Medellin (CO), **PORRAS, Sandra, Patricia Zapata;** Carrera 40 A #11 B-54, Apto. 406, Medellin (CO).

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

Sin reporte de búsqueda internacional y será de nuevo publicada tras la recepción de ese reporte (Artículo 48.2 (g))

(48) Fecha de publicación de esta versión corregida:

22 de enero de 2015

(15) Información sobre corrección:

Ver Notificación de fecha 22 de enero de 2015.

(54) Título: COMPUESTOS DE COLORANTE DERIVADOS DE GENIPINA O MATERIALES QUE CONTIENEN GENIPINA

(57) Resumen: La presente invención contribuye a superar la falta de conocimiento sobre las estructuras moleculares del material de pigmento azul derivado de una reacción de genipina con un aminoácido. En este documento se proporciona las composiciones de colorantes que comprenden compuestos de colorantes sustancialmente purificados (como los polímeros), y los métodos de aislamiento de compuestos de colorante y métodos de uso de los compuestos de colorante aislados.

Ciertos modos de realización apuntan hacia un compuesto sustancialmente purificado de fórmula 1A o fórmula 1B, su isómero geométrico, su tautómero, su sal, o una combinación de ellos.

COMPUESTOS DE COLORANTE DERIVADOS DE GENIPINA O MATERIALES QUE
CONTIENEN GENIPINA

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. Campo de la invención

La presente información hace referencia a los compuestos de colorante aislados a partir de una reacción del zumo de *Genipa americana*, la genipina, o análogos de genipina, y una amina, composiciones que comprenden la misma, así como a los métodos de fabricación y su uso.

2. Antecedentes de la invención

La desconfianza de los consumidores en el uso de colorantes sintéticos, principalmente debido a su toxicidad, ha llevado a la investigación y al desarrollo de compuestos naturales del color. Estos compuestos se han utilizado durante muchos siglos, pero los recientes avances tecnológicos permitieron que estos colorantes sean industrial y comercialmente viables y capaces de competir con los sintéticos. Consulte “*Market Brief in the European Union for selected natural ingredients derived from native species; Genipa americana*” [Pequeño mercado en la Unión Europea para ingredientes naturales seleccionados derivados de especies nativas; *Genipa americana*], presentado en la Conferencia de las Naciones Unidas sobre Comercio y Desarrollo (2005). A nivel internacional, los colores naturales como los colorantes azul y negro de *Genipa americana* son utilizados en la industria alimentaria, cosmética y textil.

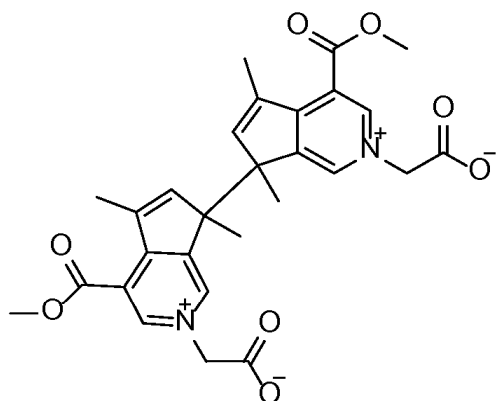
Se han notificado procedimientos de preparación de colorantes azules. Por ejemplo, Echeverri et al. (Patente en EE.UU. n.º 7.927.637), cuyo contenido completo se incorpora aquí a modo de referencia, describieron un método para elaborar un colorante azul estable con pH, derivado de la mezcla del jugo crudo sin procesar obtenido a partir de la pulpa y glicina del fruto de *Genipa americana*. Otros ejemplos de la preparación de colorantes azules se incluyen en las publicaciones de Patentes en Japón n.º 52053932A2 y 52053934A2, H. Okuyama et al., que describen un colorante azul violeta elaborado a partir de una reacción espontánea de aminas primarias con la genipina; y Wu et al. (WO 2009/120579), que describe la mezcla del jugo de *Genipa americana* con otros zumos de frutos (como la sandía) y aminoácidos. Por lo general, estos métodos existentes utilizan como resultado la mezcla en bruto sin purificación adicional, posiblemente debido a la dificultad reconocida en la técnica para la purificación de las mezclas. Consulte Touyama R. et al., Estudios sobre los pigmentos azules producidos a partir de la genipina y la metilamina. I. Estructuras de los pigmentos rojo parduzco,

intermedios que conducen a los pigmentos azules, Chem Pharm. Bull 42, 66, 1994 (se ha descubierto que el pigmento azul, derivado de una reacción de la genipina o análogos estructurales, y los aminoácidos “son una mezcla intratable de polímeros de alto peso molecular en función a su comportamiento cromatográfico, espectro ^{13}C -RMN no analizable y mediante mediciones del peso molecular”). Ha habido una descripción limitada de la estructura molecular del material de pigmento azul, ya que este material es casi soluble únicamente en agua debido a su polaridad muy alta que resulta en la intensa supervisión de la Cromatografía en capa fina [TLC por sus siglas en inglés]. Se ha notificado un polímero de peso molecular 9000 (consulte H. Jnouye, Y. et al., *26th Symposium on the Chemistry of Natural Product* [16.º Simposio sobre la química de productos naturales], Kioto, extracto pág. 577-584, 1983). Más recientemente, Wu y Horn (Publicación en EE.UU. n.º 2013/0115252) describieron un método que consistía en enriquecer la genipina de la *Genipa americana* y los usos del material de la genipina enriquecida. Sin embargo, el “extracto rico en genipina” se describe como genipina de 30 - 97 % (Peso/Peso) con el resto de la composición incluida la humedad, grasa, pequeñas cantidades de ácidos y compuestos que contienen nitrógeno, siendo los carbohidratos el equilibrio (consulte la Publicación n.º 2013/0115252, pág. 3, columna izquierda).

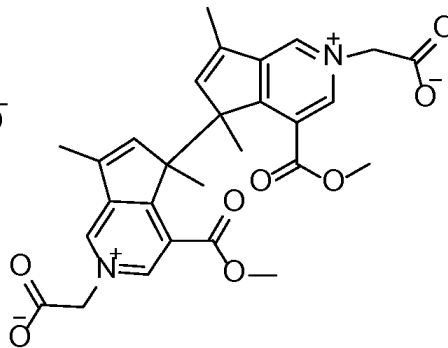
RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención contribuye a superar la falta de conocimiento sobre las estructuras moleculares del material de pigmento azul derivado de una reacción de genipina con un aminoácido. En este documento se proporciona las composiciones de colorantes que comprenden compuestos de colorantes sustancialmente purificados (como los polímeros), y los métodos de aislamiento de compuestos de colorante y métodos de uso de los compuestos de colorante aislados.

Ciertos modos de realización apuntan hacia un compuesto sustancialmente purificado de fórmula 1A o fórmula 1B, su isómero geométrico, su tautómero, su sal, o una combinación de ellos.

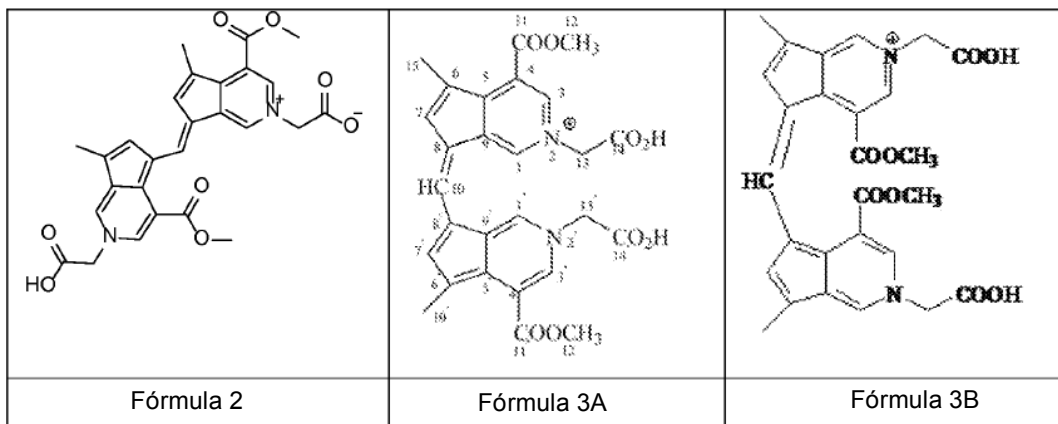


Fórmula 1A

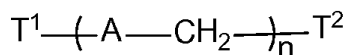


Fórmula 1B

Ciertos modos de realización apuntan hacia un compuesto sustancialmente purificado de Fórmula 2, 3A o 3B, o su isómero geométrico, su tautómero, su sal, o una combinación de ellos.



Ciertos modos de realización apuntan hacia una composición de colorante que comprende un polímero de Fórmula 4:

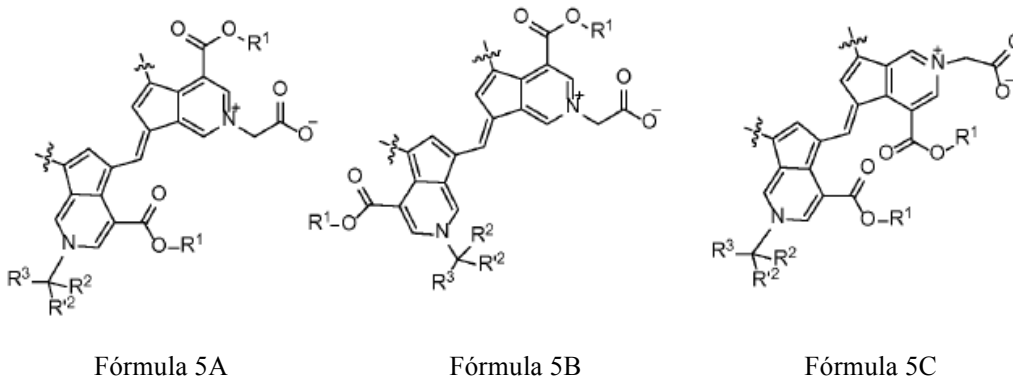


Fórmula 4

su isómero geométrico, su tautómero, o su sal,

donde n es un número entero de 2 a 200;

donde cada A se selecciona de forma separada a partir del grupo que comprende la Fórmula 5A, Fórmula 5B, Fórmula 5C, su isómero geométrico, su tautómero, su sal, y una combinación de ellos:



Donde:

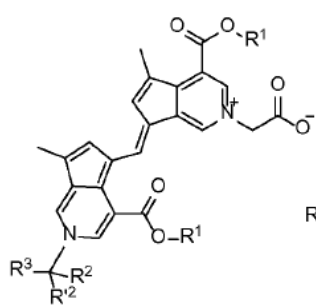
R^1 es hidrógeno, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, isobutilo, o terc-butilo;

R^2 y R^2 son por separado hidrógeno o alquilo C_{1-10} ;

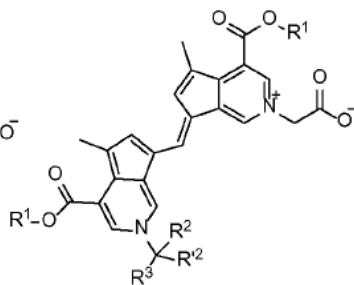
R^3 es hidrógeno o COOH;

y donde T¹ es hidrógeno o un grupo metilo; y T² es hidrógeno o A-T¹, siendo A y T¹ definidos anteriormente;

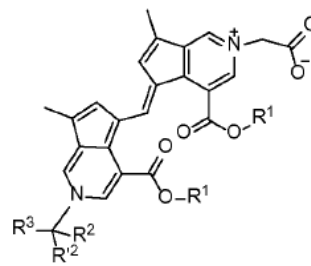
donde la composición de colorante está sustancialmente libre de un primer compuesto adicional seleccionado del grupo que consiste en la Fórmula 6, Fórmula 7, Fórmula 8, su isómero geométrico, su tautómero, y su sal:



Fórmula 6

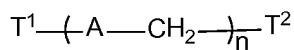


Fórmula 7



Fórmula 8

En algunos modos de realización, una composición de colorante comprende un polímero de Fórmula 4:

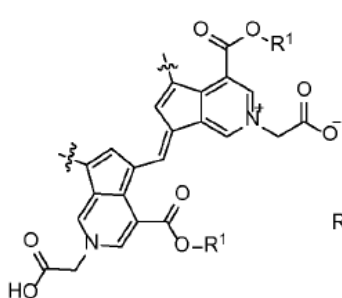


Fórmula 4

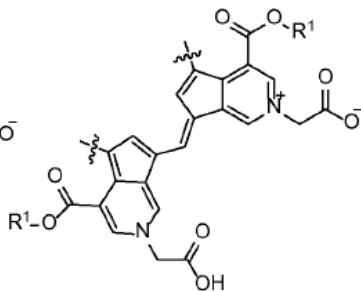
su isómero geométrico, su tautómero, o su sal,

donde *n* es un número entero de 2 a 20;

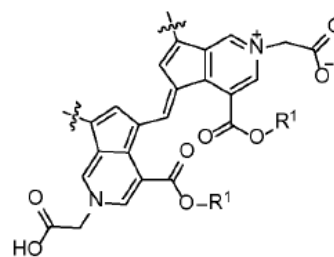
donde cada *A* se selecciona de forma separada a partir del grupo que comprende la Fórmula 5'A, Fórmula 5'B, Fórmula 5'C, su isómero geométrico, su tautómero, su sal, y una combinación de ellos:



Fórmula 5'A



Fórmula 5'B

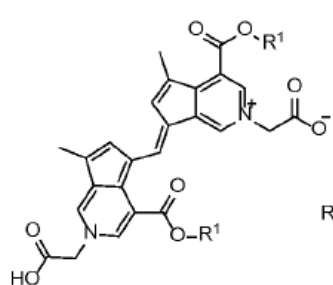


Fórmula 5'C

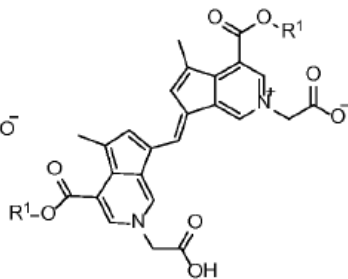
Donde:

R¹ es hidrógeno, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, isobutilo, o terc-butilo; y donde T¹ es hidrógeno o un grupo metilo; y T² es hidrógeno o A-T¹, siendo A y T¹ definidos anteriormente;

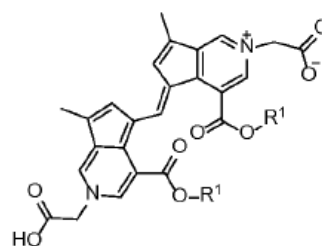
donde la composición de colorante está sustancialmente libre de un primer compuesto adicional seleccionado del grupo que consiste en la Fórmula 2', Fórmula 3'A, Fórmula 3'B, su isómero geométrico, su tautómero, y su sal:



Fórmula 2'



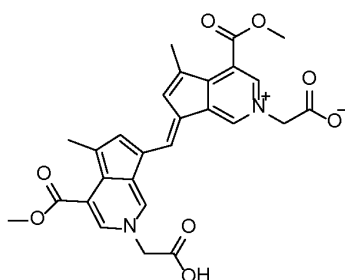
Fórmula 3'A



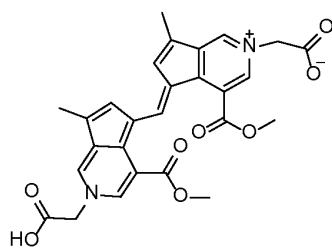
Fórmula 3'B

En algunos modos de realización, R¹ es metilo. En algunos modos de realización, el peso total del primer compuesto adicional es menor que 1 % por peso del polímero.

Ciertos modos de realización apuntan a un compuesto sustancialmente purificado de fórmula 3'A (Me) o fórmula 3'B (Me), su isómero geométrico, su tautómero, su sal, o una combinación de ellos:

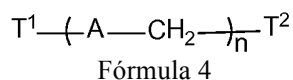


Fórmula 3'A (Me)



Fórmula 3'B (Me)

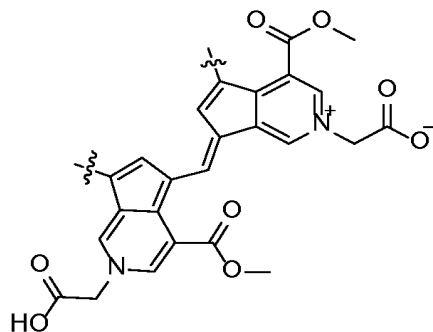
Ciertos modos de realización apuntan a un polímero sustancialmente purificado de Fórmula 4:



su isómero geométrico, su tautómero, o su sal,

donde *n* es un número entero de 2 a 20;

donde cada *A* es de fórmula 5'A (Me), su isómero geométrico, su tautómero, o su sal:



Fórmula 5'A (Me)

donde T^1 es hidrógeno o un grupo metilo; y T^2 es hidrógeno o $A-T^1$, siendo A y T^1 definidos anteriormente.

Ciertos modos de realización apuntan a compuestos de colorante purificados y a métodos de aislamiento de los compuestos de colorante derivados de una reacción de genipina y glicina. En algunos modos de realización, los compuestos de colorante se derivan de una reacción de genipina purificada (es decir, más del 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 99 % por peso) y glicina. En algunos modos de realización, los compuestos de colorante se derivan de una reacción de glicina y un zumo que contiene genipina. En algunos modos de realización, los compuestos de colorante se derivan de una reacción de glicina y un zumo de fruto derivado de *Genipa americana*. En algunos modos de realización, los compuestos de colorante se derivan de una reacción de una glicina purificada con genipina, donde la genipina es una genipina purificada (es decir, más de 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 99 % por peso) o un zumo que contiene genipina. En algunos modos de realización, los compuestos de colorante se derivan de una reacción de genipina y una mezcla que contiene glicina (es decir, un zumo que contiene glicina, o una mezcla seca que contiene glicina, como un concentrado de zumo que contiene glicina), donde la genipina es una genipina purificada (es decir, más de 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 99 % por peso) o un zumo que contiene genipina. En algunos modos de realización, los compuestos de colorante se derivan de una reacción de un zumo que contiene glicina (por ejemplo, zumo de fruto, como el zumo derivado de la sandía, uva blanca, piña, lichi, melón, plátano, naranja, manzana, pera, limón, maracuyá, uva roja, arándano, tamarindo, durazno, papaya, acai, ciruela, guaya, mandarina, borojón, cupuazú, goji, o kiwi) y un zumo que contiene genipina (por ejemplo, zumo de frutos, como el zumo derivado de la *Genipa americana*). En algunos modos de realización, los compuestos de colorante se derivan de una reacción de un zumo derivado de la sandía y un zumo derivado de la *Genipa americana*.

Ciertos modos de realización apuntan a un método de aislamiento de compuestos de colorante. Este método comprende: la extracción de una mezcla azul derivada de una reacción de la genipina y la

glicina con un disolvente alcohólico para producir una fracción soluble en alcohol y una fracción insoluble en alcohol, y la purificación tanto de la fracción soluble en alcohol como de la fracción insoluble en alcohol. En algunos modos de realización, la mezcla azul es un polvo seco (por ejemplo, un polvo liofilizado) derivado de la reacción de la genipina y la glicina.

Ciertos modos de realización apuntan a un compuesto de colorante sustancialmente purificado que comprende un polímero purificado de Fórmula 4, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal. En algunos modos de realización, el compuesto de colorante sustancialmente purificado comprende un dímero de Fórmula 2, 3'A (Me), o 3'B (Me). En algunos modos de realización, el compuesto de colorante sustancialmente purificado, como un polímero (por ejemplo, de la Fórmula 4, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal), está libre de hidratos de carbono, como azúcares. En algunos modos de realización, el compuesto de colorante sustancialmente purificado comprende un polímero (por ejemplo, de la Fórmula 4, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal) al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % libre de carbohidratos y al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % libre de otras impurezas, como monómeros, dímeros, ácidos grasos, grasas, proteínas y/o ácidos orgánicos.

En algunos modos de realización, un método de impartir color azul a un sustrato incluye poner en contacto el sustrato con una composición de colorante descrita en este documento. En algunos modos de realización, el sustrato es un alimento, un medicamento o producto nutracéutico, un producto cosmético, o un dispositivo médico. En algunos modos de realización, la composición de colorante comprende un polímero purificado de Fórmula 4, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal. En algunos modos de realización, la composición de colorante comprende un dímero sustancialmente puro de Fórmula 2, 3'A (Me), o 3'B (Me).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las **FIGURAS 1A-B** muestran las fórmulas químicas para ambas formas isoméricas del compuesto n.º 1.

Las **FIGURAS 2A-B** muestran otra representación de las fórmulas químicas para ambas formas isoméricas del compuesto n.º 1.

Las **FIGURAS 3A-B** muestran las fórmulas químicas para ambas formas isoméricas del compuesto n.º 3.

Las **FIGURAS 4A-B** muestran otra representación de las fórmulas químicas para ambas formas isómeras del compuesto n.º 3.

La **FIGURA 5** muestra los espectros para la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) del compuesto n.º 1 aislado a partir de una reacción de la genipina y la glicina.

La **FIGURA 6** muestra los espectros para espectroscopía de RMN del compuesto n.º 3 aislado a partir de una reacción de la genipina y la glicina.

La **FIGURA 7** muestra los espectros de RMN para las fracciones S31, S32, S33, y S34 (derivadas de la fracción S3) aisladas a partir de una reacción de la genipina y la glicina.

La **FIGURA 8** constituye el dibujo esquemático de una estructura de polímero que tiene la Fórmula 4.

La **FIGURA 9** muestra un espectro de RMN para la fracción insoluble aislada a partir de una reacción de la genipina y la glicina.

La **FIGURA 10** muestra un espectro de RMN sólida ^1H - ^{13}C de un polímero aislado a partir de una reacción de la genipina y la glicina.

La **FIGURA 11** muestra el perfil de masas obtenido por filtración selectiva del peso molecular de un polímero aislado a partir de una reacción de la genipina y la glicina.

La **FIGURA 12** muestra el perfil IR de un polímero aislado a partir de una reacción de la genipina y la glicina.

Las **FIGURAS 13A-D** muestran los indicios de la Cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC por sus siglas en inglés) de cuatro muestras (A, B, C, y D) que contienen polímero azul a partir de una reacción del zumo de *Genipa americana* y glicina. A) Línea rosada a 240 nm, línea azul a 590 nm con menor absorción; B) Absorciones casi iguales a 240 y 590 nm; C) Absorción mayor a 590 nm; y D) materia prima con el portador.

La **FIGURAS 14A-F** muestran las curvas de calibración 1 - 6, respectivamente, para las soluciones estándar de referencia de polímero azul.

La **FIGURA 15** muestra los espectros de la HPLC y absorciones UV de muestras las **PF**, **FC** y **PC** (consulte el Ejemplo 10 para conocer la definición de PF, FC y PC).

La **FIGURA 16** muestra los parámetros de color de las muestras PF, FC, y PC.

La **FIGURA 17** muestra los espectros de la HPLC de la fracción de polímero y la fracción acuosa eluida de la resina XAD-7.

La **FIGURA 18** muestra los espectros de absorción UV-vis de productos de reacción del zumo de *Genipa americana* con diferentes aminoácidos.

Las **FIGURAS 19A-C** muestran el análisis de la HPLC de productos de reacción del zumo de *Genipa americana* con diferentes aminoácidos, clasificados según los aminoácidos. Las Figuras 19A-C muestran, para cada aminoácido, (19A) Glicina, Lisina y Valina, (19B) Metionina y Prolina, y (19C) Tirosina y Triptófano, lo siguiente: los espectros de la HPLC de los productos de reacción del zumo de *Genipa americana* con el aminoácido usando un método del Ejemplo 6; una vista ampliada de la región de la HPLC, donde se identifica un polímero; y los espectros UV-vis de señal seleccionada.

La **FIGURA 20** muestra las estabilidades (expresadas en vidas medias) de productos de reacción de los diferentes aminoácidos con zumo de *Genipa americana* en solución amortiguadora a pH 3,0 con irradiación UV a 254 nm.

La **FIGURA 21A** muestra un espectro de la HPLC de un extracto acuoso de los mesocarpios de los frutos frescos de *Genipa americana*, el cual tiene un pico con un tiempo de retención de 19 a 20 minutos, cerca del tiempo de retención de la genipina (22 - 23 minutos), con una longitud de onda de máxima absorción a 240 nm.

La **FIGURA 21B** muestra un espectro de la HPLC de un extracto acuoso de los mesocarpios (cáscaras) de los frutos de *Genipa americana* que tienen la misma madures que las de la Figura 21A, pero que se dejaron a temperatura ambiente durante tres días antes de la extracción. El espectro tiene picos con tiempo de retención de 19 - 20 minutos y 22 - 23 minutos.

La **FIGURA 22** muestra una RMN de ^1H del producto púrpura obtenido a partir del extracto acuoso de los mesocarpios (cáscaras) del fruto de *Genipa americana* con glicina.

La **FIGURA 23** muestra una RMN de ^1H del producto azul obtenido a partir de un método de reacción de un extracto acuoso precalentado de los mesocarpios (cáscaras) del fruto de *Genipa americana* con glicina.

La **FIGURA 24** muestra los frutos inmaduros de la *Genipa americana* (jagua) con el pericarpio (cáscara externa), endocarpo (pulpa) y mesocarpo (cáscara) etiquetados.

La **FIGURA 25A-B** muestra los espectros de RMN de ^1H en CD_3OD (con supresión de agua) de genipina (25A) y el precursor encontrado en los mesocarpios (25B).

La **FIGURA 26A-B** muestra los perfiles de la HPLC (240 nm) del extracto de agua de mesocarpios (26A) y partición con disolvente de acetato de etilo del extracto de agua (26B).

La **FIGURA 27** muestra el perfil de la HPLC (240 nm) del extracto de agua de mesocarpios de los frutos de la Jagua almacenados en condiciones ambientales durante varios días después de la cosecha.

La **FIGURA 28** muestra el experimento de la RMN de ^1H para el extracto de agua del mesocarpio, el campo se amplió para mostrar la región donde se espera la presencia de los picos de aldehído.

La **FIGURA 29** muestra el espectro de la RMN de ^{13}C para el precursor de genipina encontrado en el mesocarpio de la Jagua.

La **FIGURA 30** muestra las estructuras químicas de la Genipina (1) y la Geniposida (2)

La **FIGURA 31** muestra los cromatogramas obtenidos mediante Me - Gly: reacción simultánea del zumo de la *Genipa americana* con glicina y metionina; 1 + 2: reacción de la metionina con el zumo de la *Genipa americana* seguido por la glicina; y RN: reacción del zumo de la *Genipa americana* con la glicina sola.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

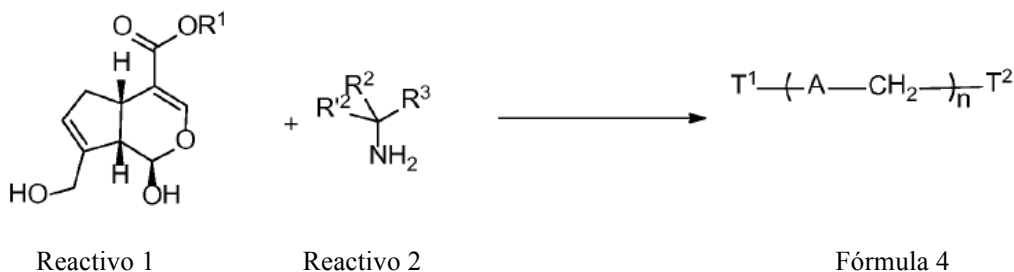
Definiciones

Según se utiliza en este documento, el término “polímero” se refiere a un compuesto químico o mezcla de compuestos que se forman por polimerización y que consisten esencialmente en unidades estructurales repetitivas.

En este documento, un polímero purificado se puede interpretar como un compuesto químico único purificado con una estructura molecular específica y un número fijo de unidades estructurales repetitivas. Un polímero purificado también se puede entender como una mezcla de compuestos poliméricos formados en una reacción de polimerización con diversos grados de polimerización (es decir, el número de unidades estructurales repetitivas puede ser diferente).

El Esquema 1 muestra una reacción de polimerización ejemplar del reactivo 1 (es decir, genipina, $\text{R}^1 = \text{Me}$) y del reactivo 2 (es decir, glicina, $\text{R}^3 = \text{COOH}$, R^2 y R^{12} son H). Un polímero purificado a partir de la reacción descrita en el Esquema 1 puede ser una composición de polímero aislado de una determinada pureza (por ejemplo, que contiene más de 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o 95 % de polímero por peso) de una sola molécula polimérica (una única molécula de polímero de Fórmula 4 significa que T^1 , T^2 , A y n en la fórmula son fijos). Un polímero purificado a partir de la reacción descrita en el Esquema 1 también puede ser una composición de polímero aislado de una determinada pureza (por ejemplo, que contiene más de 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o 95 % de polímero por peso) de una mezcla de compuestos poliméricos formados en la mezcla de reacción que comparten las mismas unidades

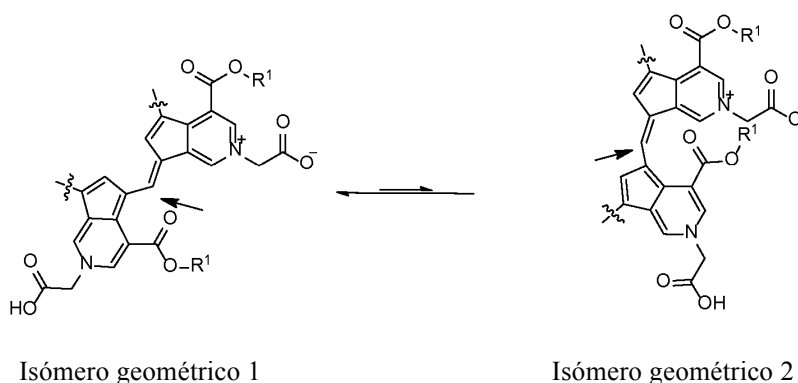
estructurales repetitivas pero con grado variado de polimerización (por ejemplo, en la Fórmula 4, los compuestos poliméricos tendrían el mismo valor de A, pero con diferente valor de n).



Esquema 1

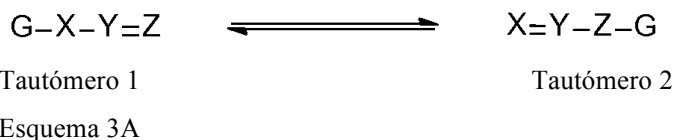
En ciertos modos de realización, en este documento, el polímero se caracteriza por una fórmula molecular, por ejemplo, la Fórmula 4, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal. Según se emplea aquí, el frase “un polímero de fórmula 4” o polímeros de fórmula 4 se refiere a un polímero o polímeros que tienen una estructura según la Fórmula 4, o su isómero geométrico, su tautómero, o su sal. En ciertos modos de realización, en este documento, el polímero se caracteriza por los datos físicos (por ejemplo, datos espectrales, distribución de peso molecular). Los métodos para la caracterización de un polímero son conocidos en la técnica. Por ejemplo, un polímero se puede caracterizar por los métodos espectroscópicos (por ejemplo, IR, UV/vis, RMN, MS, etc.); y el peso molecular de un polímero se puede analizar para obtener un peso molecular promedio en número (M_n), y/o el peso molecular promedio en peso (M_w).

El término “isómeros geométricos”, según se emplea en este documento, se refiere a los isómeros medios de estructura idéntica, excepto con diferentes configuraciones en el(los) doble(s) enlace(s) (es decir, isómero E o Z, o isómero cis/trans). A modo de ilustración, el Esquema 2 muestra un ejemplo de un par de dos isómeros geométricos, donde la única diferencia entre los dos isómeros es la configuración en el doble enlace.

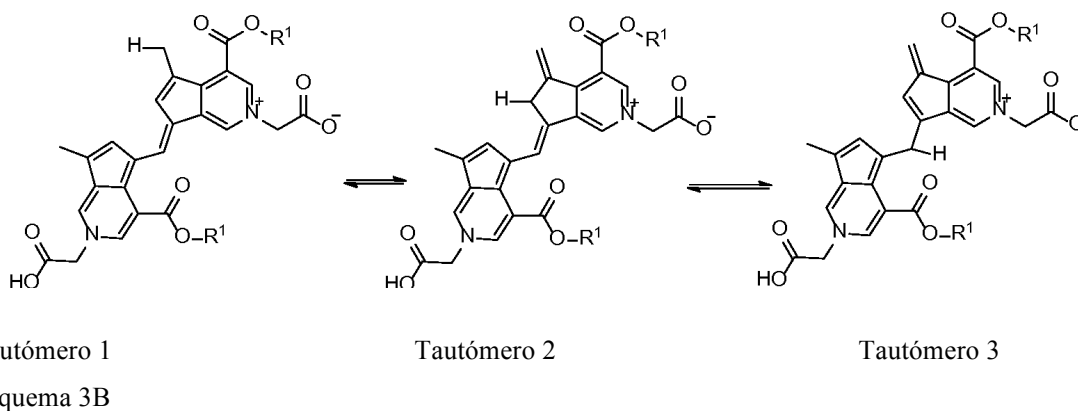


Esquema 2

Según se emplea en este documento, el término “tautómeros” o “isómeros tautómeros” se refiere a compuestos que pueden ser interconvertibles a través de la tautomerización. La tautomerización es conocida en la técnica y, en general, se refiere a una reacción como se muestra en el Esquema 3A. En la mayoría de los casos, el grupo G en la reacción es el hidrógeno.



Un ejemplo adicional de tautómeros se muestra en el Esquema 3B. El Esquema 3B no debe ser interpretado como una proyección de todas las posibles estructuras de tautómeros.



Las flechas utilizadas en los Esquemas 2, 3A y 3B se usan para fines de ilustración y no se deben interpretar como el equilibrio real entre los isómeros o tautómeros.

Según se emplea en este documento, el término “sal” incluye tanto la sal interna como la sal externa, a menos que se especifique lo contrario. Los ejemplos de sales externas incluyen sales que tienen un catión como un contraión, como un ion de metal alcalino (por ejemplo, Na^+ , K^+ , etc.), un ión de metal alcalinotérreo (por ejemplo, Mg^{2+} , Ca^{2+} , etc.), un ion amonio (por ejemplo, NH_4^+ , o un ion amonio orgánico), etc. Ejemplos de sales externas incluyen también sales que tienen un anión como un contraión, como un anión inorgánico (por ejemplo, Cl^- , SO_4^{2-} , Br^- , HSO_4^- , etc.) o un anión orgánico (por ejemplo, un anión del ácido carboxílico, como el formiato, el acetato, etc.).

Según se emplea en este documento, los “compuestos n.º 1, 2, y 3” se refieren a los compuestos aislados a partir de una reacción de la genipina y la glicina, según se describe en la sección de Ejemplos.

Según se emplea en este documento, un “dímero” o un “compuesto dimérico” se refiere a un compuesto que consta esencialmente de dos monómeros. Ejemplos de dímeros incluyen los

compuestos n.º 1, n.º 2, n.º 3, y los compuestos de fórmula 1A, 1B, 2, 3A, 3B, 2', 3'A, 3'B, 3'A (Me), 3'B (Me), 6, 7 y 8.

Según se emplea en este documento, la frase “sustancialmente libre de” un compuesto (por ejemplo, un primer compuesto adicional, un segundo compuesto adicional, o una combinación de los mismos) se refiere que el peso total del compuesto es menor que 5 % por peso de una referencia (por ejemplo, un polímero de Fórmula 4, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal). En algunos modos de realización, la frase “sustancialmente libre de” un compuesto se refiere a que el peso total del compuesto es menor que 4,5 %, menor que 4 %, menor que 3 %, menor que 2 %, menor que 1 %, menor que 0,5 %, menor que 0,1 %, o menor que 0,01 % por peso de una referencia (por ejemplo, un polímero de Fórmula 4, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal). En algunos modos de realización, una composición (por ejemplo, una composición de colorante) “sustancialmente libre de” un compuesto se refiere a que la composición está libre del compuesto. En algunos modos de realización, “sustancialmente libre de” un compuesto se refiere a que el peso total del compuesto es 0,01 - 5 %, 0,01 - 4,5 %, 0,01 - 4 %, 0,01 - 3 %, 0,01 - 2 %, 0,01 - 1 %, 0,01 - 0,5 %, o 0,01 - 0,1 % por peso de una referencia (por ejemplo, un polímero de Fórmula 4, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal).

Según se emplea en este documento, el término “sustancialmente purificado” o un compuesto sustancialmente puro (por ejemplo, un polímero sustancialmente purificado, un dímero sustancialmente purificado) se refiere a un compuesto que tiene una pureza mayor que el 80 % (es decir, más del 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 99 % por peso (por ejemplo, el peso seco, es decir, sin contar los componentes volátiles como los disolventes (por ejemplo, agua, CH₃CN, MeOH, EtOH, etc.)). En algunos modos de realización, un polímero sustancialmente puro de Fórmula 4, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal, comprende más del 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 99 % del polímero, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal por peso seco.

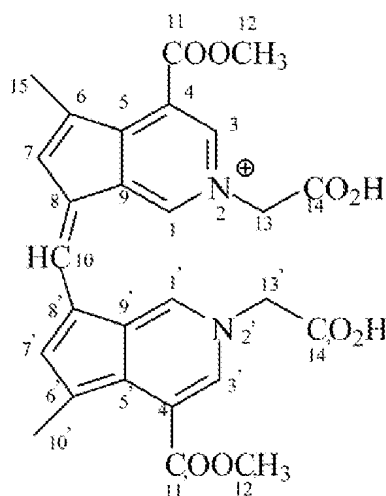
En este documento, el término “genipina purificada” se refiere a una sustancia que comprende más del 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 99 % por peso de genipina. Del mismo modo, el término “glicina purificada” se refiere a una sustancia que comprende más del 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 99 % por peso de glicina.

La pureza de los colorantes de esta divulgación se puede medir por métodos analíticos conocidos (por ejemplo, el análisis de Cromatografía de líquidos de alto rendimiento [HPLC por sus siglas en inglés]). Así, la cuantificación de un compuesto (por ejemplo, un dímero, un polímero) en una muestra se puede lograr mediante la utilización de los métodos de HPLC, es decir, similar a los métodos descritos en la sección de Ejemplos.

Composiciones de colorante que comprenden un dímero

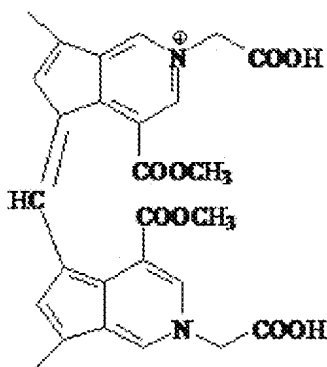
La presente invención proporciona compuestos de colorantes y sus fórmulas estructurales moleculares, así como los métodos de aislamiento de los compuestos de colorante derivados de una reacción de la *Genipa americana*, la genipina y la glicina. En algunos modos de realización, los compuestos se obtienen a partir de múltiples fraccionamiento mediante cromatografía del material resultante de la reacción. En algunos modos de realización, las fórmulas estructurales moleculares se determinan mediante experimentos de Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^1H (^1H NMR), J-Modulación (JMOD), Espectroscopia de Correlación H-H (COSY ^1H - ^1H), y otros análisis de herramientas estructurales moleculares.

En algunos modos de realización, un compuesto de colorante de la Fórmula 3A (en la presente solicitud, la Fórmula 3A es para el Compuesto n.º 3 en la forma isomérica preferida):



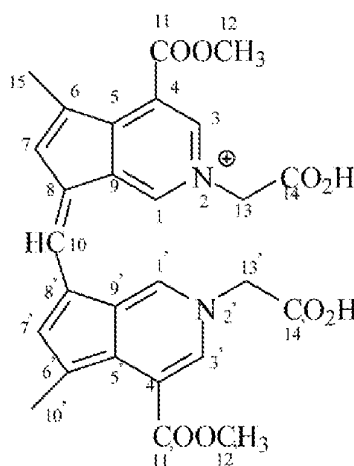
En otro modo de realización, el compuesto de colorante tiene la forma isomérica de la Fórmula 3B (en la presente solicitud, la Fórmula 3B es para el compuesto n.º 3 en una forma isomérica):

Fórmula 3B



Ciertos modos de realización apuntan a un método de aislamiento del compuesto de colorante de la Fórmula 3A:

Fórmula 3A

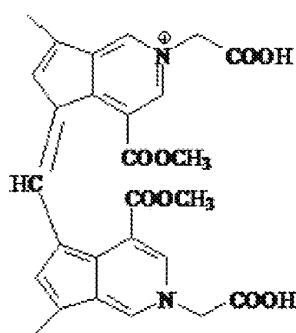


Donde los métodos comprenden:

- A. Aislamiento de la genipina proveniente del zumo de la *Genipa americana*;
- B. Reacción de la glicina con dicha genipina para obtener un material soluble en metanol;
- C. Mediante cromatografía, separación del material soluble en metanol en fracciones de S1, S2, S3 y S4.
- D. Mediante cromatografía, nueva separación de la fracción S3 en fracciones S31, S32, S33 y S34. Mediante cromatografía en fase inversa, aislamiento del compuesto de Fórmula I de la fracción S33.

Un modo de realización menos preferida apunta a un método de aislamiento de un compuesto que tiene la forma isomérica de la Fórmula 3B:

Fórmula 3B



El método comprende:

- A. Aislamiento de la genipina proveniente del zumo de la *Genipa americana*;
- B. Reacción de la glicina con dicha genipina para obtener un material soluble en metanol;
- C. Mediante cromatografía, separación del material soluble en metanol en fracciones de S1, S2, S3 y S4.
- D. Mediante cromatografía, nueva separación de la fracción S3 en fracciones S31, S32, S33 y S34.
- E. Mediante cromatografía en fase inversa, aislamiento del compuesto de Fórmula I de la fracción S33.

Las **FIGURAS 3A** y **4A** muestran representaciones de la fórmula química para la forma isómera preferida del compuesto n.º 3. El compuesto n.º 3 es una sustancia colorante azul muy oscuro. Las **FIGURAS 3B** y **4B** muestran la forma isomérica menos preferida del compuesto n.º 3. La **FIGURA 6** muestra el perfil para la espectroscopia de Resonancia magnética nuclear (RMN) del compuesto n.º 3. El análisis del perfil para la espectroscopia de RMN del compuesto n.º 3 muestra:

RMN de ^1H (400 MHz, D_2O). δ 8.6, 8.0, 7.9, 6.7, 3.90, 1.8 ppm.

RMN de ^{13}C (100 MHz). δ 172.2, 166.3, 138.8, 135.6, 135.1, 133.3, 131.4, 127.1, 120.46, 118.9, 61.0, 53.3, 11.2 ppm.

m/z 505 [M+H]

El análisis adicional del compuesto n.º 3 mostró lo siguiente:

Los espectros de masas del compuesto n.º 3 mostraron m/z = 505 [M+H]⁺ en la espectrometría de masas, indicando así un isómero del compuesto descrito anteriormente. Sin embargo, los espectros de ^1H y ^{13}C NM fueron muy diferentes en comparación con ellos. En los espectros de protones, se detectaron los siguientes singletes: δ 8.0, δ 7.9, y δ 6.7 (2H cada uno) y un singlete adicional a δ 8.6 para la integración de ^1H . Otras señales fueron un singlete a δ 4.7 (N-CH₂) y dos grupos metilo a δ 3.9 (OCH₃) y δ 1.8 (CH₃ vinilo). Según el experimento de JMOD, también se observó los siguientes átomos de carbono: un grupo carboxilo a δ 172.2, un éster metílico a δ 166.3, (COOH), cinco átomos de carbono cuaternarios a δ 138.8, δ 135.1, δ 127.1, δ 120.4, δ 118.9, cuatro metinos a δ 135.6, δ 133.3, δ 131.4, δ 131.4, un metileno (N-CH₂) a δ 61.0 y dos grupos metilo a δ 53.3 (OCH₃) y δ 11.2 (vinilo CH₃). La estructura de cada unidad de monómero fue asignada de acuerdo al experimento de

Correlación heteronuclear múltiple cuántica (HMBC por sus siglas en inglés): las señales a δ 7.9 y δ 8,0 fueron asignadas a protones del grupo piridilo, ya que se detectó una correlación de largo alcance con el grupo N-metileno a δ 61.0; además, el último protón mostró un acoplamiento ^3J al carbonilo del éster metílico a δ 172.2. Asimismo, otro acoplamiento importante se mostró entre el singlete a δ 131.4 (C-7) con protones del grupo metilo. Las bajas cantidades de protón aromático y de vinilo indicaron la presencia de una molécula dimérica simétrica, según se muestra en las **FIGURAS 3A-3B**. Se podría asignar dos estructuras a esta molécula, de acuerdo con la orientación relativa del grupo éster metílico (**FIGURAS 3A-3B**), pero la estructura B tiene una baja probabilidad debido nuevamente al impedimento estérico.

En otro modo de realización, un método de aislamiento del compuesto de colorante n.º 3 comprende lo siguiente:

- A. Aislamiento de la genipina proveniente del zumo de la *Genipa americana*;
- B. Reacción de la glicina con dicha genipina para obtener un material soluble en metanol;
- C. Mediante cromatografía, separación del material soluble en metanol en fracciones de S1, S2, S3 y S4.
- D. Mediante cromatografía, nueva separación de la fracción S3 en fracciones S31, S32, S33 y S34 (**FIGURA 7**). Mediante cromatografía en fase inversa, aislamiento del compuesto de Fórmula I de la fracción S33.

En la presente solicitud, los términos S1, S2, S3, S4 y S31, S32, S33 y S34 son una forma de definir las fracciones derivadas de las etapas descritas del método. Sin embargo, estos términos (S1, S2, S3, S4 y S31, S32, S33 y S34) abarcan cualquier fracción obtenida por etapas cromatográficas similares y que podrían derivarse de una reacción de la genipina y la glicina, donde se produce una fracción similar a S3 y fracciones derivadas de S3 (de espectroscopía de RMN similar según se muestra en la **FIGURA 7**). La **FIGURA 7** muestra la espectroscopía de RMN de las fracciones S31, S32, S33 y S34 derivadas de la fracción de S3.

En algunos modos de realización, una composición de colorante comprende un compuesto sustancialmente puro de Fórmula 1A, 1B, 2, 3'A (Me) y 3'B (Me), aislado a partir de una reacción de la genipina y la glicina.

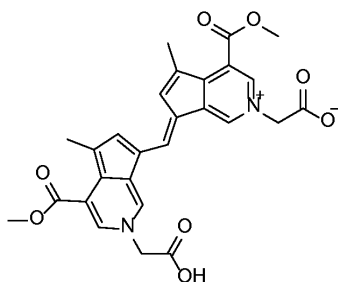
En algunos modos de realización, un método de aislamiento del compuesto de colorante n.º 3 comprende lo siguiente:

- A. Aislamiento de la genipina proveniente del zumo de la *Genipa americana*;

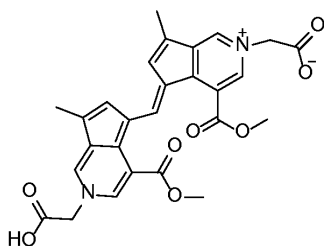
- B. Reacción de la glicina con dicha genipina para obtener un material soluble en metanol;
- C. Mediante cromatografía, separación del material soluble en metanol en fracciones de S1, S2, S3 y S4.
- D. Mediante cromatografía, nueva separación de la fracción S3 en fracciones S31, S32, S33 y S34 (**FIGURA 7**). Mediante cromatografía en fase inversa, aislamiento del compuesto de Fórmula I de la fracción S33.

Para fines de la presente solicitud, los términos S1, S2, S3, S4 y S31, S32, S33, S34 y M2S1R, M2S2R, M2S3R, M2S4R e i1 e i2 son una manera de definir las fracciones derivadas de las etapas descritas del método. Sin embargo, estos términos (S1, S2, S3, S4 y S31, S32, S33 y S34) abarcan cualquier fracción obtenida por etapas cromatográficas similares y que podrían derivarse de una reacción de la genipina y la glicina, donde se produce una fracción similar a S3 y fracciones derivadas de S3 (de espectroscopía de RMN similar según se muestra en la **FIGURA 7**). La **FIGURA 7** muestra la espectroscopía de RMN de las fracciones S31, S32, S33 y S34 derivadas de la fracción de S3.

Ciertos modos de realización apuntan a un compuesto sustancialmente purificado de Fórmula 3'A (Me) o Fórmula 3'B (Me), su isómero geométrico, su tautómero, su sal, o una combinación de ellos:

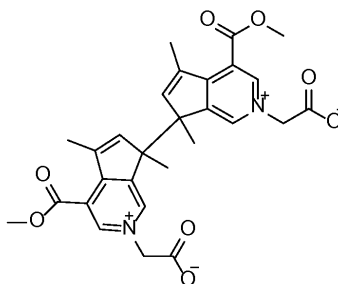


Fórmula 3'A (Me)

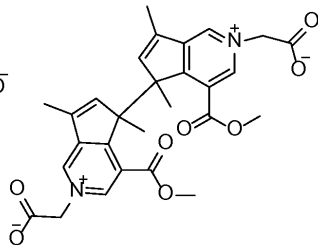


Fórmula 3'B (Me)

Ciertos modos de realización apuntan a un compuesto sustancialmente purificado de Fórmula 1A o Fórmula 1B, su isómero geométrico, su tautómero, su sal, o una combinación de ellos;



Fórmula 1A

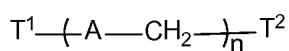


Fórmula 1B

Composición que comprende un polímero

En ciertos modos de realización, un polímero purificado de la divulgación, por ejemplo, un polímero de Fórmula 4, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal, puede ser utilizado como un colorante único o primario por su cuenta o en combinación con otro colorante (por ejemplo, un dímero de Fórmula 1A, 1B, 2, 3A, 3B, 2', 3'A, 3'B, 3'A (Me), 3'B (Me), o cualquier combinación de las mismas). En algunos modos de realización, un polímero purificado de la divulgación, por ejemplo, un polímero de Fórmula 4, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal, se puede diluir mezclando el polímero con un diluyente (como el agua). En algunos modos de realización, un polímero purificado de la divulgación, por ejemplo, un polímero de Fórmula 4, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal, se puede concentrar mediante la extracción de un diluyente (como el metanol, el agua, etc.) de una composición que comprende el polímero y el diluyente.

En algunos modos de realización, una composición de colorante comprende un polímero de Fórmula 4:

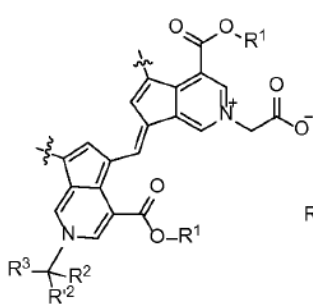


Fórmula 4

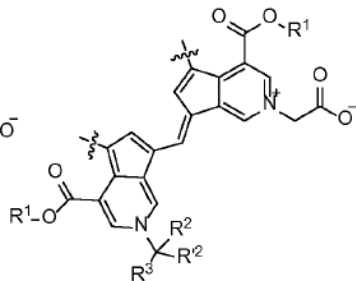
su isómero geométrico, su tautómero, o su sal,

donde n es un número entero de 2 a 200;

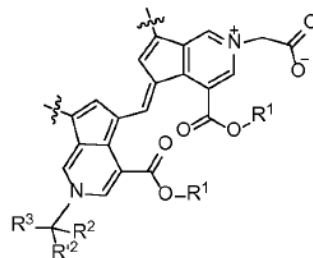
donde cada A se selecciona de forma separada a partir del grupo que comprende la Fórmula 5A, Fórmula 5B, Fórmula 5C, su isómero geométrico, su tautómero, su sal, y una combinación de ellos:



Fórmula 5A



Fórmula 5B



Fórmula 5C

Donde:

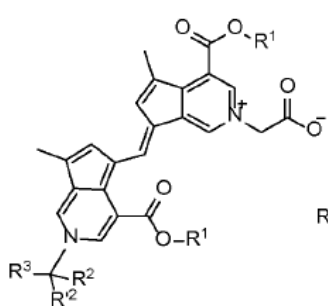
R^1 es hidrógeno, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, isobutilo, o terc-butilo;

R^2 y R^2 son por separado hidrógeno o alquilo C_{1-10} ;

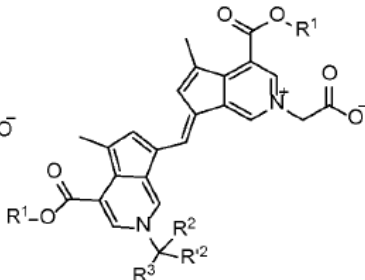
R^3 es hidrógeno o COOH;

y donde T^1 es hidrógeno o un grupo metilo; y T^2 es hidrógeno o $A-T^1$, siendo A y T^1 definidos anteriormente;

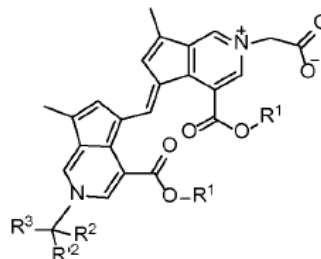
donde la composición de colorante está sustancialmente libre de un primer compuesto adicional seleccionado del grupo que consiste en la Fórmula 6, Fórmula 7, Fórmula 8, su isómero geométrico, su tautómero, y su sal:



Fórmula 6



Fórmula 7



Fórmula 8

En algunos modos de realización, R^3 es H. En algunos modos de realización, R^3 es COOH.

En algunos modos de realización, uno de R^2 y R'^2 es hidrógeno. En algunos modos de realización, tanto R^2 como R'^2 son hidrógeno. En algunos modos de realización, uno de R^2 y R'^2 es hidrógeno; y el otro de R^2 y R'^2 es una cadena de alquilo lineal C_{1-10} no sustituido (por ejemplo, el metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, etc.), o una cadena de alquilo lineal C_{1-10} sustituido con grupos metilo 1 - 3, como el isopropilo, isobutilo, isopentilo, etc.



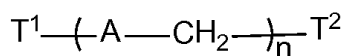
En algunos modos de realización,  representa un residuo de aminoácido (R^3 es COOH y R^2 y/o R'^2 representa la(s) cadena(s) lateral(s)). En algunos modos de realización, el residuo de aminoácido es un residuo de Glicina, Alanina, Valina, Leucina, Isoleucina, Serina, Cisteína, Treonina, Metionina, Prolina, Fenilalanina, Tirosina, Triptófano, Histidina, Lisina, Arginina, Aspartato, Glutamato, Asparagina, taurina, carnitina, ornitina, citrulina, o Glutamina. En algunos modos de realización, el residuo de aminoácido es un residuo de Glicina.

En algunos modos de realización, R^1 puede ser hidrógeno, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, isobutilo, o terc-butilo, por ejemplo, R^1 puede ser hidrógeno, metilo o etilo; R^1 puede ser metilo.

En algunos modos de realización, T^1 puede ser hidrógeno o metilo.

En algunos modos de realización, n oscila entre 2 - 200, 2 - 150, 2 - 100, 2 - 50, 2 - 25, 2 - 20, 2 - 15, 2 - 10, o 2 - 5.

En algunos modos de realización, una composición de colorante comprende un polímero de Fórmula 4:

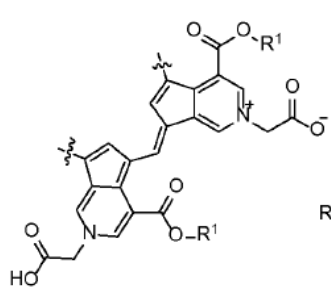


Fórmula 4

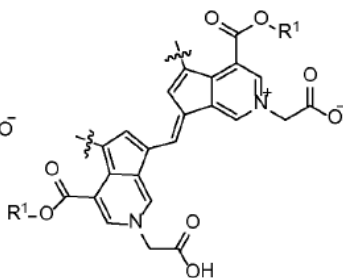
su isómero geométrico, su tautómero, o su sal,

donde n es un número entero de 2 a 200;

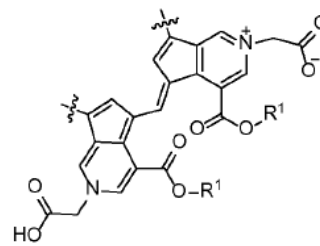
donde cada A se selecciona de forma separada a partir del grupo que comprende la Fórmula 5'A, Fórmula 5'B, Fórmula 5'C, su isómero geométrico, su tautómero, su sal, y una combinación de ellos:



Fórmula 5'A



Fórmula 5'B

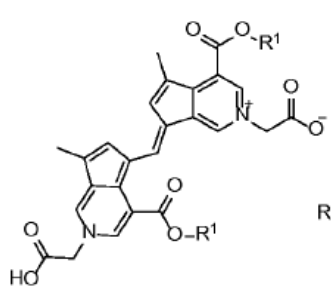


Fórmula 5'C

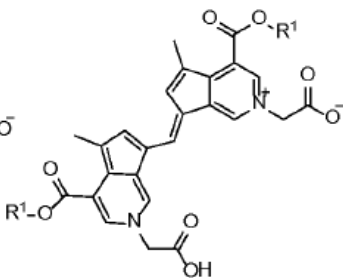
Donde:

R^1 es hidrógeno, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, isobutilo, o terc-butilo; y donde T^1 es hidrógeno o un grupo metilo; y T^2 es hidrógeno o $A-T^1$, siendo A y T^1 definidos anteriormente;

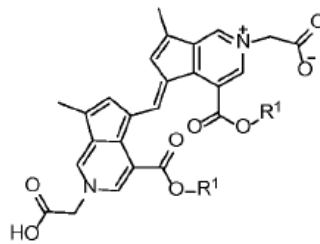
donde la composición de colorante está sustancialmente libre de un primer compuesto adicional seleccionado del grupo que consiste en la Fórmula 2', Fórmula 3'A, Fórmula 3'B, su isómero geométrico, su tautómero, y su sal:



Fórmula 2'



Fórmula 3'A



Fórmula 3'B

En algunos modos de realización, R^1 es metilo.

En algunos modos de realización, los polímeros adecuados de Fórmula 4, su isómero geométrico, su tautómero del mismo, o su sal, tienen varias unidades de repetición (es decir, diferente “A” en la Fórmula 4), diversos grupos terminales (por ejemplo, diferentes T^1 , T^2 , o ambos), y/o diferentes longitudes de cadena. En otro modo de realización, los polímeros adecuados de Fórmula 4, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal, incluyen aquellos que tienen espectros de absorción UV-Vis característicos (por ejemplo, longitud de onda de absorción máxima (λ_{max}), espectros de RMN, espectros de IR, peso molecular promedio (por ejemplo, peso molecular promedio en número (M_n)), o una combinación de ellos. En otro modo de realización, los polímeros adecuados de Fórmula 4, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal, incluyen aquellos que tienen ciertos niveles de pureza.

Estructura del polímero

En algunos nodos de realización, cada A del polímero de Fórmula 4 es independientemente una fórmula 5'A, fórmula 5'B, fórmula 5'C, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal. En algunos modos de realización, cada A en el polímero de Fórmula 4 es una fórmula 5'A, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal. En algunos modos de realización, cada A en el polímero de Fórmula 4 es una fórmula 5'B, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal. En algunos modos de realización, cada A en el polímero de Fórmula 4 es una fórmula 5'C, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal. En otros modos de realización, el polímero de Fórmula 4 puede incluir unidades repetidas que comprenden tanto la fórmula 5'A como la fórmula 5'B, tanto la fórmula 5'A como la fórmula 5'C, tanto la fórmula 5'B como la fórmula 5'C, o la fórmula 5'A, fórmula 5'B, y la fórmula 5'C.

Los polímeros de Fórmula 4 con diversos grupos R^1 (por ejemplo, el hidrógeno, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, isobutilo, o terc-butilo) son útiles como compuestos de colorante azul. En algunos modos de realización, R^1 puede ser hidrógeno, metilo, o etilo. En algunos modos de realización, cada A en el polímero de Fórmula 4 es una fórmula 5'A, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal, y R^1 en la fórmula 5'A es hidrógeno. En algunos modos de realización, cada A en el polímero de Fórmula 4 es una fórmula 5'A, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal, y R^1 en la fórmula 5'A es metilo. En algunos modos de realización, cada A en el polímero de Fórmula 4 es una fórmula 5'A, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal, y R^1 en la fórmula 5'A es etilo. En algunos modos de realización, cada A en el polímero de Fórmula 4 es una fórmula 5'B, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal, y R^1 en la fórmula 5'B es hidrógeno. En algunos modos de realización, cada A en el polímero de Fórmula 4 es una fórmula 5'B, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal, y R^1 en la fórmula 5'B es metilo. En algunos modos de realización, cada A en el polímero de Fórmula 4 es una fórmula 5'B, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal, y R^1 en la

fórmula 5'B es etilo. En algunos modos de realización, cada A en el polímero de Fórmula 4 es una fórmula 5'C, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal, y R¹ en la fórmula 5'C es hidrógeno. En algunos modos de realización, cada A en el polímero de Fórmula 4 es una fórmula 5'C, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal, y R¹ en la fórmula 5'C es metilo. En algunos modos de realización, cada A en el polímero de Fórmula 4 es una fórmula 5'C, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal, y R¹ en la fórmula 5'C es etilo.

La presente divulgación también proporciona polímeros de fórmula 4 con diferentes grupos terminales. En algunos modos de realización, un grupo terminal adecuado es cualquiera de los formados de acuerdo a una reacción mostrada en el Esquema 1. En algunos modos de realización, T¹ es un grupo hidrógeno o metilo; y T² es hidrógeno o A-T¹, siendo A y T¹ descritos en el presente documento.

En algunos modos de realización, los polímeros purificados de fórmula 4, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal, con un grado diferente de polimerización son adecuados para los diversos usos descritos en la presente divulgación. En algunas formas de realización, *n* en la fórmula 4 es un número entero del 2 al 20, del 2 al 18, del 2 al 16, del 2 al 14, del 2 al 12, del 2 al 10, del 2 al 8, del 2 al 6, del 2 al 4, del 4 al 20, del 4 al 18, del 4 al 16, del 4 al 14, del 4 al 12, del 4 al 10, del 4 al 8, del 4 al 6, del 6 al 20, del 6 al 18, del 6 al 16, del 6 al 14, del 6 al 12, del 6 al 10, del 6 al 8, del 8 al 20, del 8 al 18, del 8 al 16, del 8 al 14, del 8 al 12, del 8 al 10, del 10 al 20, del 10 al 18, del 10 al 16, del 10 al 14, o del 10 al 12. En algunos modos de realización, cuando un polímero purificado es un compuesto químico único purificado de la fórmula general 4, entonces *n* en la fórmula 4 es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20.

Características del Polímero

En ciertos modos de realización, los polímeros, como un polímero de Fórmula 4, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal, que cuentan con ciertas características son adecuados para su uso en una composición de colorante.

En algunos modos de realización, el polímero tiene una longitud de onda de absorción máxima (λ_{max}) en el rango de 580 aproximadamente a 610 nm aproximadamente en un espectro UV-Vis. En algunos modos de realización, el polímero tiene una longitud de onda de absorción máxima (λ_{max}) de 580 nm aproximadamente, 585 nm aproximadamente, 590 nm aproximadamente, 595 nm aproximadamente, 600 nm aproximadamente, 605 nm aproximadamente, o 610 nm aproximadamente. En algunos modos de realización, el polímero tiene una longitud de onda de absorción máxima (λ_{max}) de menos de 580 nm aproximadamente (por ejemplo, 570 nm aproximadamente, 560 nm, aproximadamente, etc.). En algunos modos de realización, el polímero tiene una longitud de onda de

absorción máxima (λ_{max}) de más de 610 nm aproximadamente (por ejemplo, 620 nm aproximadamente, 630 nm aproximadamente, etc.).

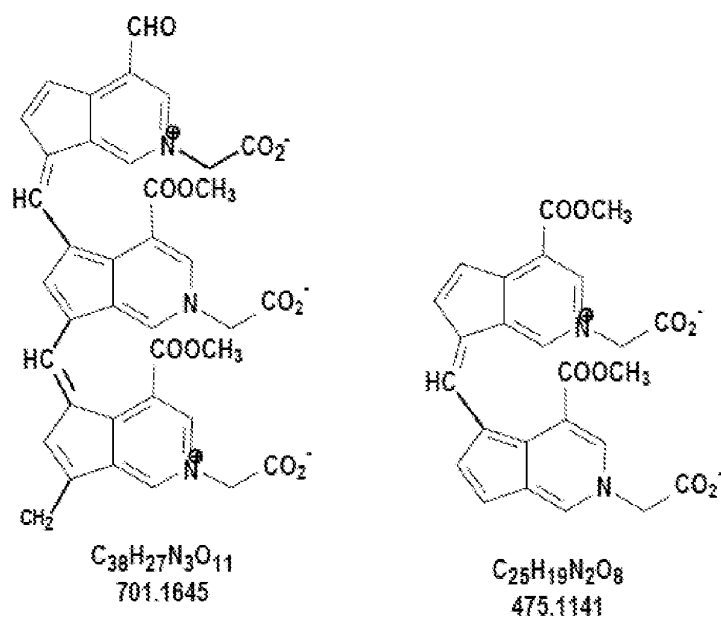
En algunas formas de realización, el polímero se caracteriza por tener un tiempo de retención de HPLC de aproximadamente 10,3 minutos, por ejemplo, cuando se analiza mediante el método descrito en el Ejemplo 6. En algunos modos de realización, el polímero se caracteriza por tener una absorción más sólida a 590 nm en comparación con la absorción a 240 nm. En algunas formas de realización, el polímero se caracteriza por tener una traza de HPLC sustancialmente idéntica a la del espectro de la **FIGURA 13C**.

En ciertos modos de realización, los polímeros de fórmula 4, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal, que tienen diferente peso molecular promedio son adecuados para el uso en una composición de colorante. En algunos modos de realización, el polímero tiene un peso molecular promedio en el rango de 1 000 aproximadamente a 20 000 aproximadamente. En algunos modos de realización, el polímero tiene un peso molecular promedio en el rango de 3 000 aproximadamente a 15 000 aproximadamente, o de 3 000 aproximadamente a 10 000 aproximadamente. En algunos modos de realización, el polímero tiene un peso molecular promedio en el rango de 4 500 aproximadamente a 7 500 aproximadamente. En algunos modos de realización, el polímero tiene un peso molecular promedio de 5 000 aproximadamente, 5 500 aproximadamente, 6 000 aproximadamente, 6 500 aproximadamente, o 7 000 aproximadamente. En algunos modos de realización, el polímero tiene un peso molecular promedio de 6 000 aproximadamente. En algunos modos de realización, el peso molecular promedio es un peso molecular promedio en número (M_n). En algunos modos de realización, el peso molecular promedio es un peso molecular promedio en peso (M_w). En algunos modos de realización, el peso molecular promedio es cualquier peso molecular promedio conocido en la técnica, tales como un peso molecular promedio en viscosidad (M_v), un peso molecular promedio Z (M_z), etc. Los métodos para medir y/o calcular el peso molecular promedio (es decir, M_n , M_w , M_v , o M_z) son conocidos en la técnica.

En ciertos modos de realización, los polímeros que tienen una absorción de IR especificado son adecuados para su uso en una composición de colorante. En algunos modos de realización, el polímero se caracteriza por un espectro de IR que tiene los siguientes picos ($\pm 5 \text{ cm}^{-1}$): 3393, 2949, 1726, 1630, y 1540 cm^{-1} . En algunos modos de realización, el polímero se caracteriza por tener un espectro de IR sustancialmente idéntico al espectro mostrado en la **FIGURA 12**. En algunos modos de realización, el polímero se caracteriza por un espectro de IR que tiene los siguientes picos ($\pm 5 \text{ cm}^{-1}$): 3393, 2949, 1726, 1630, y 1540 cm^{-1} , o que tienen un espectro de IR sustancialmente idéntico al espectro mostrado en la **FIGURA 12**.

La RMN de ^1H es otro método espectroscópico para la caracterización de un polímero. En algunos modos de realización, el polímero tiene RMN de ^1H según se muestra en la **FIGURA 9**. En algunos modos de realización, la composición de colorante comprende un polímero, en el que la RMN de ^1H del polímero es sustancialmente idéntica al espectro que se muestra en la **FIGURA 9**. En algunos modos de realización, el polímero tiene una RMN de ^1H sustancialmente idéntica al espectro en la **FIGURA 9** y/o un espectro de IR sustancialmente idéntico al espectro se muestra en la **FIGURA 12**.

La Espectrometría de masas es otro método para la caracterización de un polímero. En algunos modos de realización, los polímeros que tienen fragmentos de MS (m/e) de 701 y/o 475 se utilizan en composiciones de colorante azul. En algunos modos de realización, la composición de colorante comprende un polímero caracterizado por tener un fragmento de MS (m/e) de 701 o 475. En algunos modos de realización, el polímero se caracteriza por tener fragmentos de MS (m/e) de 701 y 405. En algunos modos de realización, los fragmentos de MS (m/e) de 701 y 405 corresponden a la fórmula 9, izquierda y derecha, respectivamente.

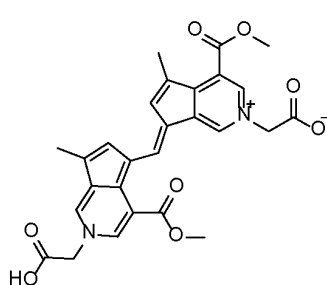


Fórmula 9

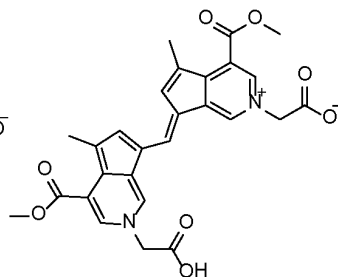
En algunos modos de realización, el polímero se caracteriza por tener fragmentos de MS (m/e) de 701 y 405, también tiene una RMN de ^1H sustancialmente idéntica en comparación con el espectro en la **FIGURA 9**. En algunos modos de realización, el polímero se caracteriza además por un espectro de IR sustancialmente idéntico al espectro en la **FIGURA 12**. En algunos modos de realización, el polímero se caracteriza por tener un perfil de masa sustancialmente idéntico a los mostrados en la **FIGURA 11**. En algunos modos de realización, la composición de colorante está sustancialmente libre de un primer compuesto adicional de fórmula 6, 7 o 8.

Pureza de Polímero

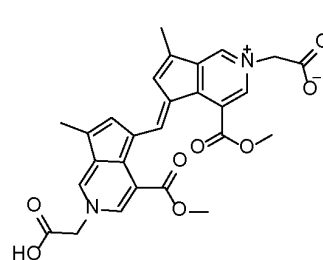
En ciertos modos de realización, los polímeros adecuados incluyen, por ejemplo, los descritos en el presente documento con ciertos niveles de pureza. En algunos modos de realización, la composición de colorante comprende un polímero de fórmula 4, donde la composición de colorante está sustancialmente libre de un primer compuesto adicional seleccionado del grupo que comprende la fórmula 6, fórmula 7, fórmula 8, su isómero geométrico, su tautómero, y su sal. En algunos modos de realización, la composición de colorante está sustancialmente libre de un primer compuesto adicional seleccionado del grupo que comprende la fórmula 2', fórmula 3'A, fórmula 3'B, su isómero geométrico, su tautómero, y su sal. En algunos modos de realización, la composición de colorante está sustancialmente libre de un primer compuesto adicional seleccionado del grupo que comprende la fórmula 2, fórmula 3'A (Me), fórmula 3'B (Me), su isómero geométrico, su tautómero, y su sal:



Fórmula 2



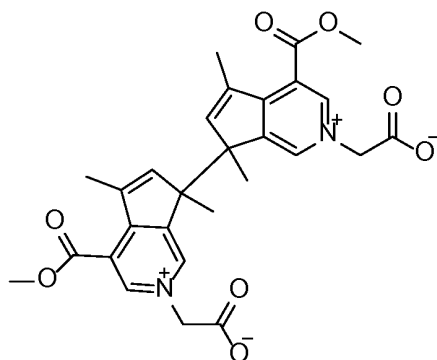
Fórmula 3'A (Me)



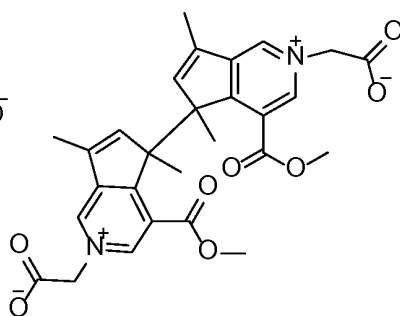
Fórmula 3'B (Me)

En algunos modos de realización, el peso total del primer compuesto adicional es menor que 4,5 %, menor que 4 %, menor que 3 %, menor que 2 %, menor que 1 %, menor que 0,5 %, menor que 0,1%, o menor que 0,01 % por peso del polímero. En algunos modos de realización, el peso total del primer compuesto adicional es menor que 1 % por peso del polímero. En algunos modos de realización, el peso total del primer compuesto adicional es menor que 0,1 % por peso del polímero. En otros modos de realización, el peso total del primer compuesto adicional es menor que 0,01 % por peso del polímero. En algunos modos de realización, la composición de colorante está libre del primer compuesto adicional. En algunos modos de realización, el peso total del primer compuesto adicional oscila entre 0,01 - 5 %, 0,01 - 4,5 %, 0,01 - 4 %, 0,01 - 3 %, 0,01 - 2 %, 0,01 - 1 %, 0,01 - 0,5 %, o 0,01 - 0,1 % por peso del polímero.

En algunos modos de realización, la composición de colorante comprende un polímero de fórmula 4, donde la composición de colorante está sustancialmente libre de un segundo compuesto adicional seleccionado del grupo que comprende la fórmula 1A, fórmula 1B, su isómero geométrico, su tautómero, y su sal:



Fórmula 1A



Fórmula 1B

En algunos modos de realización, el peso total del segundo compuesto adicional es menor que 1% por peso del polímero. En algunos modos de realización, el peso total del segundo compuesto adicional es menor que 0,1 % por peso del polímero. En otros modos de realización, el peso total del segundo compuesto adicional es menor que 0,01 % por peso del polímero. En algunos modos de realización, la composición de colorante está libre del segundo compuesto adicional. En algunos modos de realización, el peso total del segundo compuesto adicional oscila entre 0,01 - 5 %, 0,01 - 4,5 %, 0,01 - 4 %, 0,01 - 3 %, 0,01 - 2 %, 0,01 - 1%, 0,01 - 0,5 %, o 0.01 - 0,1 % por peso del polímero.

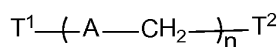
En algunos modos de realización, la composición de colorante sustancialmente libre de un primer compuesto adicional está aún más sustancialmente libre de un segundo compuesto adicional. En el presente documento, se describen los porcentajes por peso adecuados del primer o segundo compuesto adicional a los del polímero. En algunos modos de realización, el peso combinado de un primer y segundo compuesto adicional es menor que 5 % (es decir, menor que 4,5 %, menor que 4 %, menor que 3 %, menor que 2 %, menor que 1 %, menor que 0,5 % , menor que 0,1 %, menor que 0,01 %) por peso del polímero. En algunos modos de realización, la composición de colorante está libre del primer y segundo compuesto adicional. En algunos modos de realización, el peso total del primer y segundo compuesto adicional oscila entre 0,01 - 5 %, 0,01 - 4,5 %, 0,01 - 4 %, 0,01 - 3 %, 0,01 - 2 %, 0,01 - 1%, 0,01 - 0,5 %, o 0.01 - 0,1 % por peso del polímero.

En algunos modos de realización, la composición de colorante comprende un polímero de fórmula 4 sustancialmente libre de compuestos, salvo el polímero, que tienen una longitud de onda de absorción máxima (λ_{max}) en el rango de 580 - 610 nm. En algunos modos de realización, el peso total de los compuestos, salvo el polímero, que tienen una longitud de onda de absorción máxima (λ_{max}) en el rango de 580 - 610 nm es inferior a 5 % (es decir, menor que 4,5 %, menor que 4 %, menor que 3 %, menor que 2 %, menor que 1 %, menor que 0,5 %, menor que 0,1 %, menor que 0,01 %) por peso del polímero. En algunos modos de realización, la composición de colorante está libre de compuestos, salvo el polímero, que tienen una longitud de onda de absorción máxima (λ_{max}) en el rango de 580 -

610 nm. En algunos modos de realización, el peso total de los compuestos, salvo el polímero, que tienen una longitud de onda de absorción máxima (λ_{max}) en el rango de 580 - 610 nm, oscila entre 0,01 - 5 %, 0,01 - 4,5 %, 0,01 - 4 %, 0,01 - 3 %, 0,01 - 2 %, 0,01 - 1 %, 0,01 - 0,5 %, o 0,01 - 0,1 % por peso del polímero.

Ciertos modos de realización apuntan a un polímero sustancialmente purificado de la Fórmula 4, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal.

En algunos modos de realización, el polímero sustancialmente purificado comprende lo siguiente:

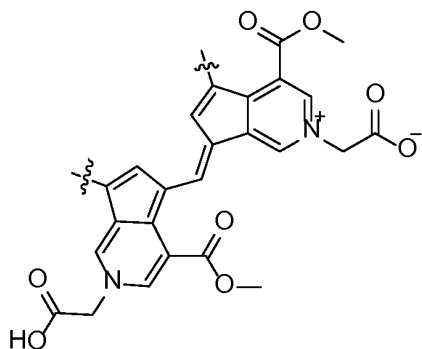


Fórmula 4

su isómero geométrico, su tautómero, o su sal,

donde n es un número entero de 2 a 20;

donde cada A es de fórmula 5'A (Me), su isómero geométrico, su tautómero, o su sal:



Fórmula 5'A (Me)

donde T^1 es hidrógeno o un grupo metilo; y T^2 es hidrógeno o $A-T^1$, siendo A y T^1 definidos anteriormente. En algunos modos de realización, el polímero sustancialmente purificado se caracteriza por tener un peso molecular promedio descrito en este documento (por ejemplo, un peso molecular promedio en número (M_n) de aproximadamente 6 000). En algunos modos de realización, el polímero sustancialmente purificado se caracteriza por tener un espectro de IR descrito en el presente documento (por ejemplo, un espectro de IR con los siguientes picos ($\pm 5 \text{ cm}^{-1}$): 3393, 2949, 1726, 1630, y 1540 cm^{-1}). En algunos modos de realización, la composición de colorante comprende un polímero de fórmula 4, donde la composición de colorante está libre de o sustancialmente libre de carbohidratos, como los azúcares. En algunos modos de realización, la composición de colorante está

libre de carbohidratos y al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % libre de otras impurezas, como los monómeros, dímeros, ácidos grasos, grasas, proteínas o ácidos orgánicos.

Método de preparación del polímero purificado

En ciertos modos de realización, los polímeros de la presente divulgación se preparan mediante reacción de un derivado de genipina (por ejemplo, la genipina) con una amina (por ejemplo, la glicina) según se describe en el Esquema 1. En algunos modos de realización, los polímeros purificados se obtienen mediante la purificación de la mezcla de reacción de un derivado de genipina (por ejemplo, la genipina) y una amina (por ejemplo, la glicina) según se describe en el Esquema 1.

En algunos modos de realización, el polímero se prepara mediante reacción de la genipina con una amina. En algunos modos de realización, el polímero se prepara mediante reacción de la genipina con una amina de alquilo primaria (por ejemplo, amina de metilo, amina de etilo, amina de propilo, u otras aminas primarias C₁₋₁₀). En algunos modos de realización, el polímero se prepara mediante reacción de la genipina con una amina de alquilo secundaria (por ejemplo, la isopropilamina, u otras aminas secundarias C₁₋₁₀). En algunos modos de realización, el polímero se prepara mediante reacción de la genipina con un aminoácido (por ejemplo, la glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, lisina, tirosina, metionina, prolina, fenilalanina, etc.). En algunos modos de realización, el polímero se prepara mediante reacción de la genipina con la glicina.

En algunos modos de realización, la genipina es una genipina purificada, o un zumo que contiene genipina. En algunos modos de realización, el polímero de la presente divulgación es un producto formado por la reacción de una genipina purificada (por ejemplo, más del 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 99 % por peso) y la glicina. En algunos modos de realización, el polímero de la presente divulgación es un producto purificado obtenido de una reacción de la glicina y un zumo que contiene genipina. En algunos modos de realización, el jugo que contiene genipina es un zumo de fruto. En algunos modos de realización, el zumo de fruto se deriva de la *Genipa americana*.

En algunos modos de realización, la glicina es una glicina purificada. En algunos modos de realización, la glicina es una mezcla que contiene glicina (por ejemplo, un zumo que contiene glicina, o una mezcla seca que contiene glicina, como un concentrado de zumo que contiene glicina). En algunos modos de realización, la glicina es un zumo que contiene glicina (por ejemplo, el zumo de fruto, como el zumo derivados de la sandía, uva blanca, piña, lichi, melón, plátano, naranja, manzana, pera, limón, maracuyá, uva roja, arándano, tamarindo, durazno, papaya, acai, ciruela, guaya, mandarina, borojó, cupuacu, goji, o kiwi). En algunos modos de realización, la glicina es un zumo que contiene glicina y que se deriva de la sandía. En algunos modos de realización, la glicina es un zumo que contiene glicina y que se deriva de la sandía fresca.

En algunos modos de realización, el polímero se deriva de la reacción de un zumo derivado de la sandía y la genipina. En algunos modos de realización, el polímero se deriva de la reacción de un zumo derivado de la sandía y un zumo derivado de la *Genipa americana*. En algunos modos de realización, el polímero se deriva de la reacción de un zumo derivado de la sandía y una genipina purificada (por ejemplo, más del 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 99 % por peso).

Ciertos modos de realización apuntan a un método de aislamiento de polímeros a partir de una mezcla de reacción de la genipina y una amina. En algunos modos de realización, el método comprende (a) la extracción de una mezcla azul derivada de una reacción de la genipina y una amina con un disolvente (por ejemplo, el metanol) a fin de producir una fracción soluble y una fracción insoluble; y (b) la purificación de la fracción insoluble. En algunos modos de realización, la etapa de purificación (b) implica someter la fracción insoluble a una purificación mediante HPLC.

Ciertos modos de realización apuntan a un método de aislamiento de polímeros a partir de una mezcla de reacción de la genipina y la glicina. En algunos modos de realización, el método comprende (a) la extracción de una mezcla azul derivada de una reacción de la genipina y la glicina con metanol a fin de producir una fracción soluble en metanol y una fracción insoluble en metanol; y (b) la purificación de la fracción insoluble en metanol. En algunos modos de realización, la mezcla azul se deriva de una reacción de la genipina purificada (por ejemplo, más del 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 99 % por peso) y la glicina. En algunos modos de realización, la mezcla azul se deriva de una reacción de la glicina y el zumo derivado de la *Genipa americana*. En algunos modos de realización, la mezcla azul es un polvo seco (por ejemplo, un polvo liofilizado) derivado de la reacción de la genipina y la glicina. En algunos modos de realización, la etapa de purificación implica someter la fracción insoluble a una purificación mediante HPLC. En algunos modos de realización, la purificación mediante HPLC es una purificación mediante HPLC de fase inversa. En algunos modos de realización, la etapa de purificación (b) es similar a la etapa de purificación descrita en la sección de Ejemplos. En algunos modos de realización, el método de purificación proporciona un polímero purificado según se describe en el presente documento.

En algunos modos de realización, un producto colorante es producido mediante los métodos descritos en el presente documento. En algunos modos de realización, el producto colorante es producido mediante (a) la extracción de una mezcla azul derivada de una reacción de la genipina y la glicina con metanol a fin de producir una fracción soluble en metanol y una fracción insoluble en metanol; y (b) la purificación de la fracción insoluble en metanol para obtener el producto colorante. En algunos modos de realización, la mezcla azul es un polvo seco (por ejemplo, un polvo liofilizado) derivado de la reacción de la genipina y la glicina. En algunos modos de realización, el producto colorante está sustancialmente libre de cualquier compuesto de las Fórmulas 6, 7 o 8 descritas en este documento. En algunos modos de realización, el producto colorante se puede caracterizar por tener (a) un espectro

de RMN sustancialmente idéntico al que se muestra en la **FIGURA 9**; (b) un espectro de IR que tiene los siguientes picos ($\pm 5 \text{ cm}^{-1}$): 3393, 2949, 1726, 1630 y 1540 cm^{-1} ; (c) un peso molecular promedio (por ejemplo, un peso molecular promedio en número (M_n)) de aproximadamente 6 000; (d) un espectro de MS que muestra fragmentos de MS de 701 y/o 475; o (e) cualquier combinación de (a) - (d).

Composición de colorante sustancialmente libre de carbohidratos

Ciertos modos de realización apuntan a una composición de colorante que comprende un polímero purificado (por ejemplo, un polímero de fórmula 4), donde la composición de colorante está sustancialmente libre de carbohidratos (por ejemplo, monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos o polisacáridos). En algunos modos de realización, el carbohidrato es un azúcar (por ejemplo, monosacáridos y disacáridos). En algunos modos de realización, la composición de colorante sustancialmente libre de carbohidratos también está sustancialmente libre de otras impurezas (por ejemplo, un dímero de fórmula 1A, 1B, 2, 3A o 3B). En algunos modos de realización, la composición de colorante está libre de carbohidratos, por ejemplo, la composición de colorante no contiene carbohidratos que se pueden detectar, por ejemplo, mediante el método descrito en el Ejemplo 7. Los términos “carbohidrato” y “azúcar” se usan indistintamente en el presente documento, a menos que se diferencie de otro modo.

En algunos modos de realización, la composición de colorante libre o sustancialmente libre de carbohidratos incluye composiciones que tienen los materiales adicionales que no sea el polímero purificado, por ejemplo, monómeros, dímeros, ácidos grasos, grasas, proteínas o ácidos orgánicos. En algunos modos de realización, la composición de colorante libre o sustancialmente libre de carbohidratos comprende también un compuesto adicional (por ejemplo, un dímero de fórmula 1A, 1B, 2, 3A, o 3B, un colorante adicional (como un aditivo de color aprobado por la FDA)). En algunos modos de realización, la composición de colorante libre o sustancialmente libre de carbohidratos también está libre de, o sustancialmente libre de, por ejemplo, monómeros, dímeros (por ejemplo, un dímero de fórmula 1A, 1B, 2, 3A o 3B), un colorante adicional (como un aditivo de color aprobado por la FDA), ácidos grasos, grasas, proteínas o ácidos orgánicos. En algunos modos de realización, la composición de colorante libre o sustancialmente libre de carbohidratos se prepara mediante un proceso que comprende la mezcla de un polímero purificado sustancialmente libre de carbohidratos con un compuesto adicional (por ejemplo, un dímero de fórmula 1A, 1B, 2, 3A, o 3B, un colorante adicional (como un aditivo de color aprobado por la FDA)) que está sustancialmente libre de carbohidratos.

En algunos modos de realización, el polímero purificado se deriva de una reacción de la genipina y la glicina. En algunos modos de realización, el polímero purificado se deriva de una reacción de la

genipina purificada (por ejemplo, más del 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 99 % por peso) y la glicina. En algunos modos de realización, la genipina purificada se deriva de la *Genipa americana*. En algunos modos de realización, el polímero purificado se deriva de una reacción del zumo que contiene la genipina y la glicina. En algunos modos de realización, el polímero purificado se deriva de una reacción del zumo de fruto (por ejemplo, el zumo derivado de la *Genipa americana*, el zumo enriquecido con genipina derivado de la *Genipa americana*)) y la glicina. En algunos modos de realización, el polímero purificado se deriva de una reacción de la genipina y un zumo que contiene la glicina (por ejemplo, el zumo de frutos como la sandía y otros según se describe en el presente documento).

En algunos modos de realización, el polímero purificado se caracteriza por tener un tiempo de retención de HPLC de aproximadamente 10,3 minutos cuando se analiza, por ejemplo, mediante el método descrito en el Ejemplo 6. En algunos modos de realización, el polímero purificado se caracteriza por tener una absorción más sólida a 590 nm en comparación con la absorción a 240 nm. En algunos modos de realización, el polímero purificado se caracteriza por tener una traza de HPLC sustancialmente idéntica a la del espectro de la **FIGURA 13C**.

Ciertos modos de realización apuntan a un método de preparación de una composición de colorante sustancialmente libre de carbohidratos. En algunos modos de realización, el método comprende la purificación de una composición de colorante en bruto con cromatografía en columna (por ejemplo, la cromatografía en columna de exclusión por tamaño, la HPLC de fase inversa, etc.); el análisis de las fracciones para determinar la presencia de carbohidratos (por ejemplo, mediante cromatografía en capa fina); y la recolección de fracciones que están sustancialmente libres de carbohidratos. En algunos modos de realización, la composición de colorante en bruto se deriva de una reacción de la genipina (por ejemplo, una genipina purificada, un zumo derivado de la *Genipa americana*, un zumo enriquecido con genipina, un zumo enriquecido con genipina derivado de la *Genipa americana*) y la glicina. En algunos modos de realización, el método produce una composición de colorante que tiene una traza de HPLC sustancialmente idéntica a la del espectro de la **FIGURAS 13A, 13B o 13C**. En algunos modos de realización, el método produce una composición de colorante que tiene una traza de HPLC sustancialmente idéntica a la del espectro de la **FIGURA 13C**.

Ciertos modos de realización apuntan a un método de preparación de una composición de colorante libre de azúcar. En algunos modos de realización, el método comprende (a) la mezcla del zumo de la *Genipa americana* y un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, valina, lisina, metionina, prolina, tirosina, triptófano, y cualquier combinación de los mismos; (b) la extracción del azúcar de la mezcla de (a); y (c) el aislamiento de una composición de colorante a partir del producto sin azúcar de (b), donde la intensidad de la composición de colorante obtenida mediante el método es mayor que, por ejemplo, al menos dos veces, la intensidad de una composición de colorante obtenida

de la mezcla de la etapa (a) sin la extracción del azúcar. En algunos modos de realización, la intensidad de la composición de colorante se mide por absorbancia UV-vis a una longitud de onda determinada (por ejemplo, a λ_{max} de la composición de colorante, a una longitud de onda en el rango de 580 - 610 nm, a una longitud de onda de 590 nm, etc.). En algunos modos de realización, el contenido del polímero es un porcentaje % (muestra de g/100g) y es determinado mediante la medición de HPLC, y la intensidad del color se determina usando un espectrofotómetro (por ejemplo, valor de absorbancia de 0,6). En algunos modos de realización, el método comprende la extracción del azúcar (por ejemplo, de la mezcla de reacción del zumo de la *Genipa americana* y un aminoácido (como la glicina, valina, lisina, metionina, prolina, tirosina, triptófano, o cualquier combinación de los mismos)) mediante fermentación, cromatografía en columna (como la cromatografía de exclusión por tamaño, la HPLC), filtración de ósmosis inversa, ultrafiltración, microfiltración, diálisis (por ejemplo, los métodos de diálisis con gradientes osmóticos), separación de resina a medida (por ejemplo, separación de resina a medida XAD4, XAD7 o XAD8), o cualquier combinación de las mismas. En ciertos modos de realización, la estabilidad microbiológica de los productos fermentados se mejora mediante la eliminación del contenido de azúcar, que, por ejemplo, puede generar fácilmente agentes microbianos mesófilos, como hongos y levaduras.

En algunos modos de realización, el método comprende la extracción de azúcar mediante fermentación. En algunos modos de realización, la fermentación se lleva a cabo con la levadura (por ejemplo, la levadura natural, levaduras genéticamente modificadas, como aquellas con mayor eficiencia en la degradación de azúcar) o las bacterias (incluidas bacterias genéticamente modificadas que han aumentado la eficiencia en la degradación de azúcar). En algunos modos de realización, la levadura o las bacterias se inmovilizan (por ejemplo, siendo adheridas a un soporte sólido; encapsuladas con microcápsulas).

En algunos modos de realización, un método de preparación de una composición de colorante comprende los siguiente: (a) la mezcla del zumo de la *Genipa americana* y un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en la glicina, valina, lisina, metionina, prolina, tirosina, triptófano, y cualquier combinación de los mismos; (b) la esterilización de la mezcla de la etapa (a); (c) la inoculación de la mezcla esterilizada de la etapa (b) con una levadura o una bacteria; (d) la incubación de la mezcla inoculada de la etapa (c) bajo condiciones de fermentación a fin de producir un producto de fermentación; y (e) el aislamiento de una composición de colorante del producto de fermentación de la etapa (d), donde la intensidad de la composición de colorante obtenida mediante el método es mayor que, por ejemplo, al menos dos veces, la intensidad de una composición de colorante obtenida de la mezcla de la etapa (a) sin fermentación.

En algunos modos de realización, la incubación de la etapa (d) es de al menos 6 horas (por ejemplo, 6 - 24, 6 - 18, 6 - 12, 6 - 9, 9 - 24, 9 - 18, 9 - 12, 12 - 24, 12-18, o más de 24 horas). En algunos modos

de realización, la incubación de la etapa (d) es inferior a 6 horas (por ejemplo, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0.5 horas). Ciertos modos de realización apuntan a un método de cuantificación de un polímero en una muestra que comprende el uso de un método de HPLC con el polímero en forma pura como referencia externa. En algunos modos de realización, el polímero es el polímero azul derivado de una reacción de la genipina y la glicina. En algunos modos de realización, el polímero en forma pura como referencia externa está sustancialmente libre de carbohidratos. En algunos modos de realización, el polímero en forma pura como referencia externa se caracteriza por tener una traza de HPLC sustancialmente idéntica a la del espectro de la **FIGURA 13C**.

Los métodos para producir composiciones Colorante

Ciertos modos de realizaciones apuntan a un método de preparación de una composición de colorante. En algunos modos de realización, un método de preparación de una composición de colorante comprende lo siguiente: (a) el aislamiento del zumo del fruto de la *Genipa americana*; (b) la mezcla del zumo y un primer aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina (GLY), valina (VAL), lisina (LYS), prolina (PRO), metionina (MET), tirosina (TYR), y triptófano (TRP) y un segundo aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina (GLY), valina (VAL), lisina (LYS), prolina (PRO), metionina (MET), tirosina (TYR), y triptófano (TRP); (c) después de la etapa (b), el aislamiento de una composición de colorante. Ciertos modos de realización apuntan a composiciones de colorante que comprenden un producto formado por reacción del zumo del fruto de la *Genipa americana* con una combinación de aminoácidos, como la glicina y la metionina. En ciertos modos de realización, las frutas frescas se utilizan dentro de uno o dos días luego de la recolección (por ejemplo, dentro de aproximadamente 0 - 6, 0 - 12, 0 - 18, 0 - 24, 0 - 36, o 0 - 48 horas). En otros modos de realización, los frutos se utilizan después del almacenamiento en condiciones de refrigeración dentro de 1,5 semanas (por ejemplo, dentro de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 días) o dentro de 2 semanas (por ejemplo, dentro de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 días). En otro modo de realización, el fruto no está maduro, es decir, el fruto está duro y tiene la piel uniforme en contraste con el fruto maduro que es suave y tiene la piel irregular. En algunos modos de realización, la composición de colorante es azul, azul verde, púrpura, rojo o negro.

En algunos modos de realización, un método de preparación de una composición de colorante comprende lo siguiente: (a) la mezcla de la genipina o un derivado de la genipina con un primer aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina (GLY), valina (VAL), lisina (LYS), prolina (PRO), metionina (MET), tirosina (TYR) o triptófano (TRP) y un segundo aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina (GLY), valina (VAL), lisina (LYS), prolina (PRO), metionina (MET), tirosina (TYR) o triptófano (TRP), y el aislamiento de una composición de colorante formada de los mismos. Ciertos modos de realización apuntan a composiciones de colorante

que comprenden un producto formado mediante reacción de la genipina o un derivado de la genipina con una combinación de aminoácidos, como la glicina y la metionina. En algunos modos de realización, la composición de colorante es azul, azul verde, púrpura, rojo o negro.

Composiciones de colorante de color púrpura

Los frutos inmaduros de la *Genipa americana* son una fuente de genipina, un metabolito iridoide que reacciona con aminas para proporcionar productos de color azul. En los frutos de la *Genipa americana* (Jagua), la genipina se encuentra en los endocarpos (pulpa) y el resto de la fruta se descarta. El material del mesocarpio (cáscara) de la Jagua se descarta debido a su bajo contenido de genipina.

Ciertos modos de realización apuntan a un método de preparación de una composición de colorante de color púrpura. En algunos modos de realización, un método de preparación de una composición de colorante púrpura comprende los siguiente (a) el aislamiento del mesocarpio del fruto de la *Genipa americana*; (b) la preparación de un extracto de zumo del mesocarpio; (c) la mezcla del extracto de zumo y la glicina; (d) después de la etapa (c), el calentamiento de la mezcla del zumo y la glicina; y (e) el aislamiento de una composición de colorante púrpura después de la etapa (d). En algunos modos de realización, el calentamiento en la etapa (d) es de al menos 90 minutos (por ejemplo, de 90 minutos a aproximadamente 3, 4, 5, o 6 horas, o más de 6 horas). Según se emplea en este documento, el término “mesocarpio” se refiere a la cáscara del fruto, como el fruto de la *Genipa americana*. En ciertos modos de realización, las frutas frescas se utilizan dentro de uno o dos días luego de la recolección (por ejemplo, dentro de aproximadamente 0 - 6, 0 - 12, 0 - 18, 0 - 24, 0 - 36, o 0 - 48 horas). En otros modos de realización, los frutos se utilizan después del almacenamiento en condiciones de refrigeración dentro de 1,5 semanas (por ejemplo, dentro de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 días) o dentro de 2 semanas (por ejemplo, dentro de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 días). En otro modo de realización, el fruto no está maduro, es decir, el fruto está duro y tiene la piel uniforme en contraste con el fruto maduro que es suave y tiene la piel irregular.

Ciertos modos de realización apuntan a composiciones de colorante que comprenden un producto formado por la reacción de un extracto acuoso que contiene un derivado de la genipina con una amina (por ejemplo, un aminoácido como la glicina, valina, prolina, lisina, triptófano, tirosina, o metionina). En algunos modos de realización, el extracto acuoso que contiene un derivado de la genipina se prepara mediante un método que comprende lo siguiente: (a) el aislamiento del mesocarpio del fruto de la *Genipa americana*; y (b) la extracción del mesocarpio con agua. En algunos modos de realización, la composición de colorante es una composición de colorante púrpura que comprende un producto formado por el extracto acuoso del mesocarpio del fruto de la *Genipa americana* y la

glicina. En algunos modos de realización, el extracto acuoso tiene menos del 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, o 0,1 % por el ABC (Área bajo la curva en un espectro de HPLC) de la genipina. En algunos modos de realización, el aminoácido es la glicina. En algunos modos de realización, el producto se forma mezclando el extracto acuoso del mesocarpio del fruto de la *Genipa americana* con la glicina, y luego calentando la mezcla, teniendo en cuenta que el extracto acuoso no se precalienta. En algunos modos de realización, la composición de colorante comprende un precursor de genipina que consta de una geniposida (+)- o un precursor iridoide B-glicósido de la genipina, que se deriva del mesocarpio (cáscara) del fruto de la *Genipa americana*.

La geniposida es el glucósido de la genipina. La geniposida tiene diferentes cinéticas y propiedades químicas de la genipina. La glucosa forma parte de la estructura de la geniposida.

La glucosa está presente en el zumo de la *Genipa americana* en la pulpa (endocarpio) como glucosa libre. Sin embargo, la genipina se encuentra en el endocarpio, que produce un colorante azul cuando se produce reacción con la glicina. La reacción de la glicina con la geniposida del mesocarpio resultó en un colorante de color púrpura.

Ciertos modos de realización apuntan a un método de preparación de una composición de colorante que comprende lo siguiente: (a) el aislamiento del mesocarpio del fruto de la *Genipa americana*; (b) el aislamiento de la geniposida del mesocarpio; (c) la mezcla de la geniposida y el aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina (GLY), valina (VAL), lisina (LYS), prolina (PRO), metionina (MET), tirosina (TYR), triptófano (TRP), o cualquier combinación de los mismos; y (d) el aislamiento de una composición de colorante después de la etapa (c). En algunos modos de realización, la geniposida se estabiliza mediante la liofilización o la congelación flash. En algunos modos de realización, la composición de colorante es de color púrpura.

Composiciones de colorante de colores verde y negro

Ciertos modos de realización apuntan a un método de preparación de una composición de colorante verde o negro. La reacción del zumo de la *Genipa americana* con diferentes aminoácidos originó productos de diferentes colores, por ejemplo, azul (GLY y LYS), verde azul (VAL, MET y TYR), verde (PRT) y negro (PRO). Algunos modos de realización apuntan a un método de preparación de una composición de colorante negro que comprende lo siguiente: (a) la preparación de un extracto del zumo del fruto de la *Genipa americana*; (c) la mezcla del extracto del zumo y la prolina; y (e) el aislamiento de una composición de colorante negro resultante de la etapa (c). Algunos modos de realización apuntan a un método de preparación de una composición de colorante verde que comprende lo siguiente: (a) la preparación de un extracto del zumo del fruto de la *Genipa americana*;

(c) la mezcla del extracto del zumo y el triptófano; y (e) el aislamiento de una composición de colorante verde de la etapa (c).

Uso de composiciones de colorante que comprenden un polímero y/o un dímero

Ciertos modos de realización apuntan al uso de un polímero purificado (por ejemplo, un polímero de Fórmula 4, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal, o un polímero (como un polímero derivado de una reacción de la genipina y la glicina) sustancialmente libre de hidratos de carbono) o un dímero purificado (por ejemplo, un compuesto sustancialmente puro n.º 1, 2, 3, o un compuesto sustancialmente puro de Fórmula 1A, 1B, 2, 3'A (Me), 3'B (Me), o una combinación de los mismos) con la finalidad de impartir un color azul a un sustrato (por ejemplo, un alimento, un cosmético, un fármaco o un producto nutracéutico, un producto textil, o un dispositivo, como un dispositivo médico).

En algunos modos de realización, el método de impartición de un color azul a un sustrato (por ejemplo, un alimento, un cosmético, un fármaco o un producto nutracéutico, un producto textil, un dispositivo, como un dispositivo médico) comprende poner en contacto el sustrato con una composición de colorante que incluye un polímero purificado (por ejemplo, un polímero de Fórmula 4, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal, o un polímero (como un polímero derivado de una reacción de la genipina y la glicina) sustancialmente libre de hidratos de carbono) o un dímero purificado (por ejemplo, un compuesto sustancialmente puro n.º 1, 2, 3, o un compuesto sustancialmente puro de Fórmula 1A, 1B, 2, 3'A (Me), 3'B (Me)), una composición de colorante descrita en el presente documento, o cualquier combinación de los mismos. En algunos modos de realización, la composición de colorante comprende un polímero de Fórmula 4, su isómero geométrico, su tautómero, o su sal. En algunos modos de realización, la composición de colorante comprende un dímero. En algunos modos de realización, el dímero es un compuesto sustancialmente purificado de fórmula 1A, 1B, 2, 3'A (Me), o 3'B (Me). En algunos modos de realización, la composición de colorante se prepara mediante un proceso de mezcla de un compuesto de Fórmula 1A, 1B, 2, 3'A (Me), o 3'B (Me) con cualquiera de los polímeros descritos en este documento. En algunos modos de realización, la composición de colorante se prepara mezclando un polímero o un dímero descrito en este documento con un aditivo de color (por ejemplo, un aditivo de color aprobado por la FDA). En algunos modos de realización, el sustrato es un producto alimenticio. En algunos modos de realización, el sustrato es un dispositivo médico. En algunos modos de realización, el sustrato es un producto farmacéutico. En algunos modos de realización, el sustrato es un producto nutracéutico. En algunos modos de realización, el sustrato es un producto cosmético.

Ciertos modos de realización apuntan a un producto alimenticio que comprende un elemento alimenticio y una composición de colorante descrito en este documento (por ejemplo, una

composición de colorante que comprende un polímero purificado descrito en este documento, o una composición de colorante que comprende un dímero purificado descrito en este documento). El elemento alimenticio puede ser un alimento sólido o un alimento líquido. En algunas formas de realización, el producto alimenticio es un producto lácteo, un producto de panadería, un refresco, un producto de confitería (como dulces o barras de cereales, etc.), o una bebida. En algunos modos de realización, el elemento alimenticio es una bebida. En algunos modos de realización, el elemento alimenticio es una bebida carbonatada. En algunos modos de realización, el elemento alimenticio es para el consumo humano. En algunos modos de realización, el elemento alimenticio es un alimento veterinario, como un alimento para mascotas (como comida para gatos, comida para perros, etc.) o un alimento para animales de granja (como comida para vacas). En algunos modos de realización, el elemento alimenticio es un elemento alimenticio vegetal, como un fertilizante. En algunos modos de realización, el elemento alimenticio es un alimento de dosificación unitaria, como un yogur de dosificación unitaria, pudín, sopa, etc.

Ciertos modos de realización apuntan a un producto farmacéutico que comprende un fármaco (por ejemplo, un fármaco aprobado por la FDA) y una composición de colorante descrita en este documento (por ejemplo, una composición de colorante que comprende un polímero purificado descrito en este documento, o una composición de colorante que comprende un dímero purificado descrito en este documento). En algunos modos de realización, el medicamento está en forma de dosificación líquida. En algunos modos de realización, el medicamento está en forma de dosificación sólida. En algunos modos de realización, el medicamento está en forma de dosificación seleccionada del grupo que consiste en comprimidos, cápsulas de gel, perlas, pellets, píldoras, grageas, pastillas, pomadas, cápsulas, polvos, líquidos, geles, jarabes, soluciones de cremas y suspensiones. En algunos modos de realización, el medicamento está en forma de jarabe.

Ciertos modos de realización apuntan a un producto nutracéutico (por ejemplo, vitaminas, suplementos vitamínicos, o mezclas y paquetes dietéticos) que comprende un nutracéutico y una composición de colorante indicada en el presente documento (por ejemplo, una composición de colorante que comprende un polímero purificado descrito en este documento, o una composición de colorante que comprende un dímero purificado descrito en este documento). En algunos modos de realización, el nutracéutico está en forma de dosificación líquida. En algunos modos de realización, el nutracéutico está en forma de dosificación sólida. En algunos modos de realización, el nutracéutico está en forma de dosificación seleccionada del grupo que consiste en comprimidos, cápsulas de gel, perlas, pellets, píldoras, grageas, pastillas, pomadas, cápsulas, polvos, líquidos, geles, jarabes, soluciones de cremas y suspensiones. En algunos modos de realización, el nutracéutico está en forma de comprimido, o una cápsula de gel.

Ciertos modos de realización apuntan a un producto cosmético que comprende un cosmético y una composición de colorante descrito en este documento (por ejemplo, una composición de colorante que comprende un polímero purificado descrito en este documento, o una composición de colorante que comprende un dímero purificado descrito en este documento). En algunos modos de realización, el cosmético es un producto de baño, como geles de ducha, geles de baño, o jabón. En algunos modos de realización, el cosmético puede ser un producto para los ojos y maquillaje facial, esmaltes de uñas, labiales, o tatuajes. En algunos modos de realización, el cosmético puede ser un producto para el cuidado oral (por ejemplo, enjuagues bucales, geles dentales, o pastas de dientes). En algunos modos de realización, el cosmético puede ser un producto para el cuidado de la piel (por ejemplo, acondicionadores de piel, geles (como un gel de mano), lociones y cremas, o mascarillas). En algunos modos de realización, el cosmético puede ser un producto para el afeitado (por ejemplo, una crema de afeitar). En algunos modos de realización, el cosmético puede ser un producto para el cuidado del cabello (por ejemplo, productos para teñir el cabello).

Ciertos modos de realización apuntan a un dispositivo médico teñido por una composición de colorante descrita en este documento (por ejemplo, una composición de colorante que comprende un polímero purificado descrito en este documento, o una composición de colorante que comprende un dímero purificado descrito en este documento). En algunos modos de realización, el dispositivo médico es un dispositivo quirúrgico (por ejemplo, hilos quirúrgicos, tijeras, guantes, etc.).

Ciertos modos de realización apuntan a un producto textil teñido mediante una composición de colorante descrito en este documento.

En ciertos modos de realización, la cantidad de una composición de colorante que será incorporada en un producto alimenticio, un producto cosmético, un producto farmacéutico, un dispositivo médico, o un producto textil depende del color final que se obtendrá. En algunos modos de realización, el producto alimenticio, el producto cosmético, el producto farmacéutico, el dispositivo médico, o el producto textil comprende una composición de colorante descrita en este documento en una cantidad eficaz, por su cuenta o con otro colorante, a fin de impartir al producto alimenticio, producto cosmético, producto farmacéutico, o dispositivo médico un color seleccionado del grupo que consiste en azul claro, azul de la Fuerza Aérea, Azul la Superioridad Aérea, azul Alicia, azur, azul bebé, Azul Francia, azul, azul-gris, azul Bondi, azul Brandeis, azul Cambridge, azul Carolina, celeste, cerúleo, azul Cobalto, azul Columbia, azul Aciano, Cian, azul oscuro, azul cielo profundo, dril de algodón, azul Dodger, azul duque, azul egipcio, azul eléctrico, azul Eton, azul Glauco, añil eléctrico, añil, azul Klein internacional, iris, azul claro, azul Majorelle, azul maya, azul medio, azul medianoche, azul marino, azul non-photo (indetectable en fotografías), azul Oxford, azul Palatinado, bigaro, azul persa, azul Phthalo, azul polvo, azul Prusia, azul real, azul cielo zafiro, azul Acero, azul del trullo, azul Tiffany, True Blue, azul Tufts, turquesa, azul UCLA, ultramarino, azul violeta, azul Yale, y zaffre. La

eficacia de la composición de colorante se puede determinar mediante la comparación (como la comparación visual) de un color que se obtiene (por ejemplo, azul claro) con el producto o dispositivo teñido con una cantidad de la composición de colorante.

Aunque la descripción presenta modos de realización preferidos de la presente invención, se podrían realizar cambios adicionales en la forma y la disposición de las partes sin desviarse de las ideas ni de los principios básicos abarcados en las reivindicaciones.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Aislamiento de la genipina a partir del zumo de *Genipa americana*

Un liofilizado sólido (liofilizado) (900 gramos) de 10 litros del zumo verde de *Genipa americana* fue extraído por Soxhlet con diclorometano; el disolvente generado se evaporó bajo presión reducida dando como resultado un residuo de color pardo (240 g); se separó una alícuota de 1 g mediante cromatografía de exclusión por tamaño, utilizando como fase móvil una mezcla de hexano/metanol/diclorometano (2:2:1) de donde hubieron cuatro fracciones resultantes; la genipina fue identificada en una de las fracciones mediante la cromatografía en capa fina y mediante la comparación con un patrón de genipina previamente conocido. La fracción que contenía la genipina se purificó múltiples veces con una columna cromatográfica de gel de sílice y una fase móvil de hexano/acetato de etilo hasta que se obtuvo un producto puro (200 mg de genipina) de acuerdo con los espectros de RMN.

Ejemplo 2. Reacción de la genipina y la glicina

Se calentó a 70 ° la glicina (2 g) disuelta en agua (200 ml). Luego, se añadió la genipina (5 g) en metanol (10 ml) y se agitó la mezcla durante cuatro horas. La mezcla de reacción se liofilizó (liofilizado) y se extrajo el polvo azul con acetato de etilo con la finalidad de eliminar el exceso de genipina y otros componentes polares bajos.

Ejemplo 3. Fraccionamiento de componentes

El polvo azul (5,7 g) se extrajo con metanol (5 x 100 ml), el disolvente generado se evaporó bajo presión reducida y se obtuvo una resina azul (2,2 g). La resina azul disuelta en metanol de 90 % se separó con Sephadex® LH 20 (fase móvil de metanol), que dio como resultado cuatro fracciones que fueron denominadas (para fines de esta solicitud de patente) S1 (1,5 g), S2 (0,3 g), S3 (100 mg) y S4 (5 mg).

La fracción S1 se separó con el uso de una resina de adsorción (Amberlite® XAD-7) utilizando inicialmente el etanol de 15 % y terminando con agua pura. Tres fracciones fueron separadas con

espectros de IR y RMN idénticos. Las tres fracciones se combinaron y se determinó que se trataba de un polímero.

La fracción S2 se separó con el uso de una resina de adsorción (Amberlite® XAD-7) utilizando inicialmente el etanol de 15 % y terminando con el etanol de 95 %. Cuatro subfracciones se generaron a partir de la fracción S2. Estas subfracciones de S2 fueron denominadas (para fines de esta solicitud de patente) M2S1R, M2S2R, M2S3R y M2S4R. La M2S1R era RP-C18 separada varias veces con diferentes fases móviles (mezclas de etanol-agua y metanol-agua) hasta que se obtuvo dos compuestos; uno de dichos compuestos se denominó compuesto n.º 1 (7 mg). Las características espectroscópicas del compuesto n.º 1 (**FIGURA 5**) son las siguientes:

RMN de ^1H (400 MHz, D_2O). δ 8,77; 8,53; 7,54; 5,30 - 4,95; 3,94; 2,25; 1,66 ppm.

RMN de ^{13}C (100 MHz). δ 170,0; 164,16; 157,80; 157,44; 148,29; 146,41; 139,76; 137,83; 124,16; 63,35; 62,6; 56,19; 53,89; 17,43; 14,93 ppm.

Un análisis más detallado del compuesto n.º 1 mostró lo siguiente:

La RMN de ^1H mostró algunas señales: dos protones aromáticos como singletes a δ 8,77 y 8,53, un protón vinílico a 7,54, un singlete δ 4,95, (2H) y tres singletes integrando el 3H, cada uno a 3,94 (OCH_3), 2,25 (grupo vinilo metilo), y 1,66.

El experimento de JMOD mostró las siguientes señales: tres grupos metilo a 14,93, 17,43 y 53,89, un metileno a 62,68, asignable a un metileno derivado de la glicina, tres metinos a 157,44, 146,41, 137,83 y finalmente, siete átomos de carbono cuaternarios a 170,00 (carboxílico), 164,16 (carbonilo de éster metílico), 157,80, 148,29, 139,76, 124,16 y 53,89. Así, se ha conservado la fracción de genipina y el residuo de glicina, pero la molécula se vuelve aromática con un residuo de piridilo, debido a la posición de los protones y a los átomos de carbono en los espectros de RMN. Sin embargo, un nuevo grupo metilo apareció en la estructura y su posición era asignable sobre la base de los experimentos de JMOD, HMQC y HMBC. Así, COSY ^1H - ^1H mostró una conectividad alílica entre el grupo metilo a 2,25 con el protón vinílico a 7,54; en el experimento de HMBC este protón mostró un acoplamiento 3J a éstos metilos (157,44 en RMN de ^{13}C) y el grupo metilo alifático a 14,93 (1,66 en RMN de ^1H), que a su vez, estableció una correlación con el átomo de carbono cuaternario a 53,89 y aromático a 157,80 y 148,29. Otras conectividades de largo alcance detectadas fueron: N- CH_2 (62,68) a ambos protones aromáticos a 8,77 y 8,53, y el primero al carbonilo de éster metílico. Finalmente, MS mostró un m/z 522 [$\text{M}^+ + \text{H}$] que indica una molécula dimérica simétrica, como se puede ver en las **FIGURAS 1A-1B** y **2A-2B**. El puente de conexión entre los monómeros se dedujo a átomos de carbono de C-8 y C-8', pues la aparición de un grupo metilo como singlete, que está

acoplado mutuamente con el otro grupo metilo en el experimento de HMBC. Hay dos isómeros posibles, como los de la fórmula 1A o 1B (consulte las **FIGURAS 1A, 1B, 2A y 2B**).

La fracción S3 se separó mediante cromatografía con Sephadex[®] usando una fase móvil de metanol de 95 % generando cuatro fracciones S3 que, a efectos de esta solicitud de patente, se denominaron S31, S32, S33 y S34. La fracción S33 se separó varias veces mediante cromatografía inversa RP-C18 utilizando diferentes fases móviles (mezclas de etanol-agua y metanol-agua) hasta que se obtuvo un compuesto que se denominó compuesto n.º 3 (4 mg). Las características espectroscópicas del compuesto n.º 3 (**FIGURA 6**) son las siguientes:

RMN de ¹H (400 MHz, D₂O). δ 8,6; 8,0; 7,9; 6,7; 3,90; 1.8 ppm.

RMN de ¹³C (100 MHz). δ 172,2; 166,3; 138,8; 135,6; 135,1; 133,3; 131,4; 127,1; 120,46; 118,9; 61,0; 53,3; 11,2 ppm.

m/z 505 [M+H]

El análisis adicional del compuesto n.º 3 mostró lo siguiente:

Los espectros de masas del compuesto n.º 3 están representados m/z = 505 [M+H]⁺ en la espectrometría de masas, indicando así un isómero del compuesto descrito anteriormente. Sin embargo, los espectros de ¹H y ¹³CNM fueron muy diferentes al mismo. En los espectros de protones, se detectaron los siguientes singletes: δ 8,0; δ 7,9; y δ 6,7 (2H cada uno) y un singlete adicional a δ 8,6 para la integración de 1H. Otras señales fueron un singlete a δ 4,7 (N-CH₂) y dos grupos metilo a δ 3,9 (OCH₃) y δ 1,8 (vinilo de CH₃). Según el experimento de JMOD, también se observó los siguientes átomos de carbono: un grupo carboxilo a δ 172,2, un éster de metilo a δ 166,3, (COOH), cinco átomos de carbono cuaternarios a δ 138,8; δ 135,1; δ 127,1; δ 120,4; δ 118,9, cuatro metinos a δ 135,6; δ 133,3; δ 131,4; δ 131,4; un metileno (N-CH₂) a δ 61,0 y dos grupos metilo a δ 53,3 (OCH₃) y δ 11,2 (vinilo de CH₃). La estructura de cada unidad de monómero fue asignada de acuerdo con el experimento de HMBC: señales a δ 7,9 y δ 8,0 fueron asignadas a protones del grupo piridil, pues se detectó una correlación de largo alcance con el grupo N-metileno a δ 61,0; asimismo, el último protón mostró un acoplamiento 3J al carbonilo del éster metílico a δ 172,2. Además, otro acoplamiento importante se mostró entre el singlete a δ 131,4 (C-7) y los protones del grupo metilo. Las bajas cantidades de protón aromático y de vinilo indicaron la presencia de una molécula dimérica simétrica, como se muestra en las **FIGURAS 3A-3B**. Se podría asignar dos estructuras a esta molécula, de acuerdo con la orientación relativa del grupo éster metílico (**FIGURAS 3A-3B**), pero la estructura B tiene una baja probabilidad debido al impedimento estérico.

Ejemplo 4. Purificación de fracción insoluble en metanol

Los componentes insolubles en metanol se separaron utilizando Sephadex LH-20, eluyendo con MeOH-agua, y se recogieron subfracciones i1 (3,1 g) e i2 (100 mg). La subfracción i2 se separó usando una columna RP-C18 repetida, eluyendo con MeOH/agua a fin de obtener el compuesto puro n.º 2 (25 mg). Se mostró que el compuesto n.º 2 cuenta con la estructura de Fórmula 2.

La subfracción i1 se separó en dos fracciones principales utilizando una columna RP-C18. Sin embargo, las dos fracciones cuentan con espectro de IR y RMN idénticos y se combinan para producir un polímero purificado. Una estructura esquemática del polímero purificado se muestra en la **FIGURA 8**.

El análisis de RMN, IR y espectroscopia de masas del polímero purificado muestra lo siguiente:

Los espectros de IR (**FIGURA 12**) mostraron bandas asignables al ácido carboxílico (3393 cm^{-1}), CH alifático (2949), éster (1726) y el sistema de piridinio aromático (1630, 1540).

Se interpretó las huellas en la RMN de ^1H y ^{13}C de pequeñas moléculas azules, específicamente dímeros aislados e identificados previamente, y genipina. La RMN de ^1H (**FIGURA 9**) mostró las siguientes señales: δ 9,50 (protón de puente de doble enlace), δ 8,00 - 9,00 (derivados de piridina aromática o dobles enlaces conjugados), δ 5,0 - 7,0 (doble enlace en el anillo ciclopentano), δ 5,0 - 4,5 (CH_2 unido al nitrógeno cuaternario), δ 3,8 - 4,1 (OCH_3), δ 1,5 - 2,3 (CH_3). La RMN de ^{13}C mostró señales a δ 160 - 175 (grupos carboxílicos y ésteres), δ 150,0 - 120,0 (enlaces aromáticos y/o dobles), δ 60,0 - 62,0 (CH_2 unido al nitrógeno cuaternario), δ 50,0 - 55,0 (OCH_3), δ 42,0 - 48,0 (CH_2) y, finalmente, δ 10,0 - 15,0 (CH_3).

Posteriormente, se obtuvo espectros en estado sólido de RMN ^1H - ^{13}C (**FIGURA 10**) y no se detectó enlaces o picos característicos: enlaces carbonilo, aromático, doble, grupos N-metileno, metoxi y metileno. Hubo ausencia de los grupos metilo o de señales de metileno exocíclico, lo que indica que la participación de un metileno exocíclico original (o grupo hidrometil) en el proceso de polimerización.

El análisis de HPLC/MALDI mostró que el polímero purificado tiene un peso molecular de aproximadamente 6000, aproximadamente 12 unidades de un dímero. Se observó fragmentos de MS correspondientes a m/e de 701 y 475; consulte la estructura mostrada en la fórmula 9.

Ejemplo 5. Reacción del zumo de la *Genipa americana* y la glicina

El zumo líquido en crudo (100 ml) se mezcló con la glicina (0,8 g, la cantidad de glicina se puede ajustar en función del contenido de genipina en el zumo líquido en crudo, de manera que la relación

molar de glicina y genipina sea aproximadamente 1:1) y la temperatura de reacción se mantuvo a 70 °C durante 2 horas. Después de ello, el disolvente se evaporó y la presión se redujo, o se liofilizó para obtener una mezcla en polvo de color azul oscuro.

El polvo de color azul oscuro se extrajo primero con acetato de etilo y, luego, más exhaustivamente con metanol. El componente soluble en metanol (800 mg) se separó mediante cromatografía en columna con el uso de Sephadex LH-20 y metanol. En la primera fracción, la mayoría del producto de color azul profundo (600 mg) se obtuvo como polímero purificado después de la evaporación del metanol. Pequeñas cantidades de compuestos 1 (1 mg), compuesto 2 (1,5 mg) y compuesto 3 (1 mg) se obtuvieron también a partir de la fracción soluble en metanol.

La fracción insoluble en metanol (1,2 g) también se separó usando columnas con Sephadex LH-20, eluyendo con metanol:agua (9:1). Después, una fase inversa C-18 de separación se llevó a cabo para producir un polímero purificado. El polímero purificado a partir de la fracción insoluble en metanol se combinó con el polímero purificado a partir de la fracción soluble en metanol para dar 1,8 gramos de polímero en total. Los datos analíticos del polímero obtenido por reacción del zumo de la *Genipa americana* y la glicina son idénticos a los obtenidos a partir de la reacción de la genipina purificada con la glicina.

Ejemplo 6. Cuantificación del polímero

Se desarrolló un método de HPLC/PDA con el fin de evaluar la pureza del polímero azul y para cuantificar su contenido en el extracto de la Jagua (obtenido de la reacción del zumo de la *Genipa americana* y la glicina).

Una prominencia UFLC Shimadzu con un desgasificador en línea (DGU-20 A5), una bomba cuaternaria (LC 20AT), un muestreador automático (SIL 20A HT), un horno de columna (CTO 20A), y un detector de matriz de fotodiodos (SPD M20A) controlado por un módulo de bus de comunicación (CBM 20A) se utilizaron para estos estudios analíticos.

Se utilizaron varias columnas, como la fase inversa C18 Luna (Phenomenex) 150 x 4,6 mm 5 μm , Supelcosil (Sigma) C8, 150 x 4,6 mm 5 μm , y Luna PFP 150 x 4,6 mm 5 μm .

La naturaleza altamente polar del polímero en el extracto de la Jagua limitó el uso de columnas de fase normal.

El acetonitrilo y el metanol se utilizaron en un número de relaciones que oscilan de 100 % a 100 % de agua.

Se utilizó una velocidad de flujo de 1 ml/min y no se realizó modificaciones durante el proceso de desarrollo.

Se utilizó un detector PDA y se controló las longitudes de onda de 200 a 800 nm en el modo de gráfico máximo y a 590 nm para detectar el polímero azul.

Aunque se evaluaron varias columnas y temperaturas celulares del detector, los mejores resultados se obtuvieron usando la columna Luna PFP. Los resultados del análisis llevado a cabo con otras columnas no fueron satisfactorios, ya que solo se observaron picos un-retenidos independientemente del volumen de la mezcla disolvente; se utilizó la temperatura de la columna y del detector, la velocidad de flujo o el volumen de inyección.

Después de la selección de la columna se evaluó el gradiente del disolvente, los mejores resultados en la separación se obtuvieron con el metanol y agua como eluyentes, pero la forma del pico y la anchura necesarias para la mejora en esta etapa, varios ensayos con diferentes temperaturas de horno de columnas permitieron tener una buena forma y anchura sin un efecto sobre el tiempo de retención.

Un resumen de las mejores condiciones de separación incluyó lo siguiente:

Columna Luna PFP 100A (Phenomenex) con cartucho de agente de seguridad:

Longitud 150 mm

Diámetro interno 4,6 mm

Tamaño de partícula 5 μ m.

Fase móvil: Eluyente A: Agua y Eluyente B: Metanol

Gradiente lineal:

Gradiente lineal (minutes)	% A	% B
0	80	20
5	80	20
6	0	100

Gradiente lineal (minutes)	% A	% B
10	0	100
11	80	20
20	80	20

Velocidad de flujo: 1 ml/min

Temperaturas:

T muestras: Ambiente (20 – 24 °C)

T columna: 40 ° C

T célula del detector: 40 ° C

Detección: Gráfico máximo 230 - 800 nm (perfil del extracto);

Gráfico máximo 590 nm (cuantificación del polímero azul).

Preparación de la muestra: En un matraz volumétrico de 10 o 25 ml; pese 10 mg de muestra por lotes que se analizará y el volumen completo con agua desionizada. 10 µL de esta solución se inyecta usando un muestreador automático.

Rendimiento del sistema: En el método estándar del polímero azul se eluyó a 10,3 minutos.

Ejemplo 7 Purificación del polímero azul libre de azúcares

El polímero azul libre de azúcares se purificó mediante cromatografía en columnas utilizando Sephadex LH-20.

Se disolvieron 10 g del extracto liofilizado de la Jagua (obtenido de la reacción del zumo de la *Genipa americana* y la glicina) en 10 ml de agua desionizada y se filtró. Posteriormente, la solución del colorante se aplicó a la parte superior de la columna. La composición de la fase móvil era 100 % metanol, 80 % metanol, 50 % metanol y 100 % agua. Se recopilaron un total de 14 fracciones y se verificó mediante cromatografía en capa fina para identificar el contenido de azúcar eluyendo con una solución de isopropanol: agua: ácido acético (2: 0,5: 0,5). La placa se roció con ácido sulfúrico (5 %) y se calentó a 105 °C. Primero, las fracciones eluyentes y sin azúcares se mezclaron y se secaron en condiciones de vacío y, luego, fueron sometidas a una etapa de purificación utilizando las mismas condiciones de elución descritas anteriormente hasta detectar la pureza deseada mediante la HPLC.

Una alícuota de las fracciones se diluyó y se filtró a través de 0,45 µm usando un filtro de membrana de nylon (Acrodisc, Pall) antes del análisis mediante HPLC usando el método del Ejemplo 6.

Los criterios de selección para la pureza deseada del polímero azul obtenido del extracto de la Jagua utilizaron los estándares de UV-vis y HPLC, es decir, las fracciones de la columna de Sephadex

estaba libre de azúcar bajo el método de TLC, y la absorbancia del pico principal detectado a 590 nm era igual o mayor que la absorbancia a 240 nm, respectivamente.

Las **FIGURAS 13A-D** muestran las trazas de HPLC (espectros) del lote de materia prima y tres fracciones con diferente pureza. La **FIGURA 13C** representa una traza de HPLC del polímero azul puro (utilizado como “estándar de referencia”) libre de azúcares.

Ejemplo 8. Cuantificación del contenido de polímero azul en las muestras del extracto de Jagua

Estándar de referencia del polímero azul libre de azúcares elaborado en el Ejemplo 7 fue utilizado como un estándar externo para cuantificar el contenido del polímero azul en muestras del extracto de Jagua utilizando el método analítico descrito en el Ejemplo 6.

Curvas de calibración

Las soluciones del estándar de referencia se prepararon a partir del estándar de referencia del polímero azul. Cada área bajo la curva (ABC) del estándar de referencia se representó gráficamente frente a la concentración y se aplicó la regresión lineal para obtener la ecuación de la curva de calibración.

Las soluciones del estándar de referencia se inyectaron por triplicado para cinco concentraciones y en algunos casos se realizaron más inyecciones.

Se obtuvo que el método era lineal en el rango de 20 - 100 µg/mL.

Se obtuvo seis curvas de calibración diferentes. Las curvas de calibración 1 - 6 se muestran en las **FIGURAS 14A-F**, respectivamente.

Límites de detección y cuantificación

El método desarrollado para medir la concentración del polímero azul en el extracto de Jagua fue capaz de detectar señales a 10,2 min monitorizados a 590 nm a una concentración límite inferior de 2 µg/mL. De acuerdo con la fórmula $2H/h$, donde H es la altura del pico del estándar de referencia y h es la altura en el tiempo de retención en un cromatograma en blanco (se inyectó 10 µL de metanol o agua). El valor $(2 \times 3423 / 2.836 = 2,4)$ es el límite inferior que se aceptará como límite de detección. Los valores medios de la altura pico del estándar de referencia y los cromatogramas en blanco se utilizaron para los cálculos.

Se determinó que el límite de cuantificación para el polímero azul era 20 µg/ml.

Cuantificación de los polímeros azules en las muestras del extracto de Jagua

El polímero azul del extracto de Jagua se cuantificó como porcentaje usando el método estándar externo.

Cada lote se pesó por triplicado para obtener tres mediciones por separado de la dilución a 10 ml en dos días; la dilución a 25 mL se realizó por triplicado en un solo día. Para el lote 5312005 solo se analizó la dilución de 10 mL, ya que el propósito de los dos volúmenes de la dilución de la muestra era evaluar si la concentración era un parámetro a tener en cuenta al analizar el extracto de Jagua. En la **Tabla 1**, los resultados de los lotes 5312001 a 5312004 se muestran para las diluciones de 25 y 10 mL donde los valores medios pueden compararse.

La siguiente fórmula se utilizó para calcular la concentración del polímero azul cuando la muestra se diluye a 10 ml:

$$\% = \frac{y-b}{a} \times \frac{10}{1000} \times \frac{100}{w},$$

$$\% = \frac{y-b}{a} \times \frac{25}{1000} \times \frac{100}{w},$$

cuando la muestra se diluye a 25 ml; y = área de pico del ensayo del polímero azul a 590 nm; b = intersección de la línea de regresión; a = pendiente de la línea de regresión; w = peso (mg) de la muestra.

Se calculó los porcentajes de las muestras para cada curva de calibración generada. Se excluyó los datos de curva de calibración 1. Cuando los datos de las seis ecuaciones de la curva de calibración se obtuvieron para cada lote analizado, los resultados de la curva de calibración 1 fueron diferentes de otros valores, y si se promediaban, el % RSD aumentaba, probablemente por errores en la preparación de la dilución y la muestra o en la etapa de pesaje.

Tabla 1. Porcentaje del polímero azul en el extracto de Jagua

Lote	Volumen de dilución (mL)	Porcentaje % (n = 5)	SD	% RSD
5312001	10	27.88	1.48	5.32
	25	29.44	1.65	5.61
5312002	10	31.59	2.22	7.04
	25	31.24	1.90	6.08
5312003	10	31.00	2.67	8.63
	25	30.93	1.85	5.98

5312004	10	24.43	1.54	6.34
	25	22.97	1.19	5.20
5312005	10	32.29	2.32	7.19

Ejemplo 9. Extracción de azúcar por fermentación

El extracto de Jagua (4,5 L, obtenido de la reacción del zumo de la *Genipa americana* y la Glicina, Lote 5113003) se esterilizó en un Tuttnauer de autoclave vertical 3870 ELV (85 litros) (Tuttnauer Europe BV, Países Bajos) a 121 °C, 15 psi durante 20 m. Se permitió que el extracto de Jagua esterilizado se enfríe dentro del autoclave. El caldo resultante se inoculó con 25 g de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) de grado comercial (Levapan, Colombia), que se activó previamente en el mismo caldo estéril a 30 °C. La fermentación se llevó a cabo en un biorreactor de 7 L con un volumen de trabajo de 5 L.

La mezcla se incubó durante 24 horas en el biorreactor BioFlo 110 (New Brunswick Scientific, EE.UU.), utilizando el software Biocommand 6.1.7601 Variables de control de lotes para el monitoreo. Cuatro muestras de 500 ml se pusieron a prueba (cada 3 horas durante las primeras 12 horas de incubación). Después de ello, el volumen de operación fue de aproximadamente 2,5 L de caldo.

La Tabla 2 muestra las condiciones de operación para el proceso de fermentación. El sistema comenzó en anaerobiosis y no se añadió nada de oxígeno externo durante el proceso de fermentación. El porcentaje detectado de oxígeno (DO₂ (%)) muestra el oxígeno presente en la muestra sin adición de oxígeno externo. Durante el proceso de fermentación, la temperatura se mantuvo constante a 30 ± 2 °C.

Tabla 2. Condiciones de operación de los biorreactores

Tiempo (HH:MM:SS)	Agitación (rpm)	DO ₂ (%)	pH	Temperatura (°C)
0:00:06	149.80	11.55	5.61	32.59
26:19:07	150	9.13	5.53	29.99

Después de 23 horas y 19 minutos, el proceso de fermentación terminó. Se refrigeró la mezcla de la reacción y fue sometida a centrifugación en Labouge Thermo Scientific a 200 - 4800 rpm durante 20 minutos (Thermo Fischer Scientific, NJ, EUA). A continuación, se retiró la levadura.

Las muestras centrifugadas fueron analizadas para determinar la existencia de sólidos solubles (°Brix) usando un refractómetro digital Atago PAL-3 (Atago Co. Ltd. Tokio, Japón) y el contenido de humedad usando MA35M Brand Sartorius (The Sartorius Group, Goettingen, Alemania). Se analizó el contenido de azúcar de las muestras usando el método TLC con placas de aluminio recubiertas con gel de sílice 60 F254 4x5 cm, eluyéndolo con una mezcla de isopropano: ácido acético: agua (2:0,5:0,5). Se roció ácido sulfúrico en etanol al 10 % a las placas de TLC, luego fueron calentadas a 110 °C. Se usó glucosa pura, fructosa y sacarosa como estándares. El análisis de las mezclas de reacción a las 3, 6, 9, y 12 horas mostró que 6 horas de fermentación fueron suficientes para eliminar todos los azúcares. No se observó azúcar mediante el método de TLC descrito anteriormente en la mezcla de reacción después de 6 horas de la fermentación.

Ejemplo 10. Comparación de las características de los productos fermentados y los productos no fermentados

Preparación de la muestra

El extracto de jagua fermentado preparado en el Ejemplo 9 (centrifugado y filtrado) se concentró en un evaporador rotatorio, y luego se le secó por atomización usando Büchi B-290 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Suiza), con o sin un vehículo transportador (almidón alimenticio modificado (Capsul®)). Las condiciones de secado fueron: 150 °C de temperatura interna y 103-110 °C de temperatura externa; con un bombeo de 25 % (290 mL/h), con una tasa de flujo aéreo de 400 y una aspiración de 85 %.

El extracto de Jagua no fermentado (del mismo lote usado para la preparación de los productos fermentados) se secó en las mismas condiciones descritas en el presente para los productos fermentados.

En resumen, se preparó tres productos:

- (1) **PF**: un producto fermentado, centrifugado y concentrado, sin vehículo;
- (2) **FC**: un producto fermentado, centrifugado y concentrado, con vehículo (Capsul®) como vehículo (60 % de sólidos totales del producto - 40% de sólidos totales del vehículo);
- (3) **PC**: un producto no fermentado, con vehículo (Capsul®) (60 % de sólidos totales del producto – 40 % de sólidos totales del vehículo);

Se analizó las características los tres productos en polvo (**PF**, **FC** y **PC**) para determinar el contenido de humedad, el contenido del polímero, la intensidad del color y la estabilidad en una solución amortiguadora a pH 3. También se probará la estabilidad microbiológica de los productos.

Contenido del polímero

Se midió el contenido de polímero de **PF**, **FC** y **PC** usando el método de la HPLC según se describe en los Ejemplos 6 - 8. Los resultados de la HPLC se muestran en la Tabla 3. Las cromatografías de HPLC se muestran en la **FIGURA 15**.

Tabla 3. Resultados de cuantificación del polímero

Muestra	Peso	AUC	% Polímero	Media	Desviación
E1-PFR1	10	2173179	74,36	74,01	0,38
E1-PFR2	10	2164260	74,06		
E1-PFR3	10	2151113	73,61		
E2-FCR1	10,2	1280814	43,16	42,26	0,81
E2-FCR2	10,2	1247237	42,04		
E2-FCR3	10,2	1233766	41,59		
E3-PcR1	10	1089373	37,51	37,09	0,39
E3-PcR1	10	1074862	37,02		
E3-PcR1	10	1066861	36,75		

Intensidad del color

Parámetros de color

Se analizó las soluciones de colorantes acuosos (0,015 g en polvo/40 mL) de **PF**, **FC** y **PC** en tres ejemplares usando la espectrofotometría GENESYS 10S UV-VIS con el software VISIONlite para determinar los parámetros CIELab. Los parámetros de color de las tres muestras se muestran en la **FIGURA 16**.

Los parámetros CIELab mostraron que los productos fermentados (**PF** y **FC**) tuvieron un color azul más intenso que el producto no fermentado. Tanto el **PF** como el **FC** tuvieron valores de L más bajos (menos brillo), menos valores *a* negativos (lo que podría significar un color más violeta), pero valores *b* similares en comparación con **PC**. La **FIGURA 16** también muestra que el **PF** tuvo la mayor absorbencia, dos veces más que la de **PC**; y el **FC** tuvo una absorbencia 1.6 más fuerte en comparación con la del **PC**.

Estabilidad de los productos en solución amortiguadora a pH 3

Se evaluó la estabilidad de **PF**, **FC** y **PC** en una solución amortiguadora a pH 3.0 bajo tres condiciones de almacenamiento: refrigerador (6 °C), temperatura (20 °C) y cámara (45 °C) durante 19 días.

Se probó cada uno de los productos (**PF**, **FC** y **PC**) en tres ejemplares en una concentración de 15 mg de la muestra en 40 mL del amortiguador. Se supervisó las muestras en la misma espectrofotometría de 350 a 800 nm (medidos en intervalos de 2 nm). Se determinó los cambios de color mediante los parámetros CIELab usando el software VISIONlite versión 2 con D₆₅ y un ángulo de observación de 10 °. Se calculó los cambios de color usando la ecuación [1] (mostrada posteriormente) usando los parámetros L (luz, blanco 0/negro 100), a (- verde / rojo +), y b (- azul / amarillo +).

$$\Delta E_{ab} = \sqrt{(L_i - L_o)^2 + (a_i - a_o)^2 + (b_i - b_o)^2} \quad [1]$$

Se supervisó los parámetros relacionados con el color, A (absorbencia), L, a, b, y ΔE_{ab} de **PF**, **FC** y **PC** con el paso del tiempo.

Se calculó la semivida de acuerdo con la cinética de primer orden a partir de la tasa constante de reacción (la inclinación se obtuvo del gráfico de $\ln(\text{área azul})_t / (\text{área azul})_0$ vs tiempo). Se realizó un análisis estadístico usando Statgraphics Centurion XV de prueba. Se utilizó la diferencia mínima significativa de Fischer (LSD, por sus siglas en inglés) para diferenciar las medias.

La Tabla 4 muestra los resultados de la semivida del **PF**, **FC** y **PC** en días.

Tabla 4. Semivida promedio en días

Condición	Valor P	Método: LSD de 95,0 por ciento			
		Muestra	Réplica	Media	
Cámara (45 °C)	0,0002	PF	3	25,4233	X
		FC	3	25,7067	X
		PC	3	29,7767	X
Ambiente (20 °)	0,0122	FC	3	63,5767	X
		PF	3	66,6967	X
		PC	3	95,8833	X
Refrigerador (6 °C)	0,0004	FC	3	121,697	X
		PF	3	146,747	X
		PC	3	169,267	X

El contenido de humedad del **PF**, **FC** y **PC**, determinado por un analizador de humedad (Sartorius Brand MA35M), fue de 4,12 %, 3,24 % y 3,15 % respectivamente.

El proceso de fermentación eliminó de manera eficiente todos los azúcares de los extractos de jagua en seis horas. Los productos fermentados resultantes (**PF** y **PC**) tuvieron un color azul más intenso. El **PF** tuvo un color azul dos veces más intenso que el del producto no fermentado PC.

El producto fermentado **PF** estuvo estable cuando se le secó por atomización sin la adición de un encapsulante de vehículo (p. ej. el almidón).

Se probará la estabilidad microbiológica de los productos fermentados añadiendo una cantidad conocida de un microorganismo (p. ej. una bacteria, un hongo o una levadura) a los productos fermentados y midiendo posteriormente (p. ej. después de 7 días) la estabilidad microbiológica de los productos fermentados (p. ej. midiendo la actividad del microorganismo añadido).

Ejemplo 11. Eliminación de azúcar del extracto de Jagua por medio de XAD-7

El zumo en crudo del fruto de la *Genipa Americana* (150 mL) reaccionó con la glicina (1,5 g) durante 2 horas a 70 °C. Luego, se procedió a enfriar la mezcla de la reacción a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió resina XAD-7 (100 g) a la mezcla de reacción enfriada. Luego de 24 horas, se filtró la resina XAD-7.

Primero, se eluyó con agua la resina resultante para generar una fracción acuosa, y luego se eluyó con una mezcla de agua y etanol para generar una fracción de polímero. Se confirmó la identidad del polímero en la fracción del polímero mediante un análisis de la HPLC usando un método del Ejemplo 6. Se determinó el contenido de azúcar de la fracción del polímero usando el método TLC descrito en el Ejemplo 9. El análisis por TLC mostró una ausencia de azúcares en la fracción del polímero. Por otra parte, la fracción acuosa estaba rica en azúcares. Además, el análisis de la HPLC mostró que la fracción acuosa contenía un poco de polímero. La **FIGURA 17** muestra los espectros de la HPLC de la fracción del polímero y de la fracción acuosa.

La **Tabla 5** muestra las características espectrofotométricas de las fracciones obtenidas por medio de la purificación con resina HP XAD7.

Tabla 5. Características espectrofotométricas de las fracciones obtenidas por medio de la purificación con resina HP XAD7

Muestra	L	a	b	Absorbencia 590 nm
POL	6,3	6,7	-27,2	9,9999
H₂O	95	-0,6	-2,9	0,0768
RN	93	-2,8	-6,2	0,1267

RN: Reacción del zumo del fruto de *Genipa americana* con la glicina.

POL: Fracción del polímero, eluida con etanol, que contiene la mayoría de polímero

H₂O: Fracción acuosa, eluida con agua, rica en azúcares

Ejemplo 12. Reacción del zumo del fruto de la *Genipa Americana* con diferentes aminoácidos

El zumo del fruto de la *Genipa Americana* se sometió a reacción con diferentes aminoácidos para determinar los perfiles de color resultantes. El zumo del fruto de la *Genipa americana* (50 mL) en un matraz Erlenmeyer (se determinó un contenido de genipina de 2,42% mediante una HPLC en un sistema Shimadzu Prominence - Cromatógrafo Líquido Ultra Rápido (UFLC, por sus siglas en inglés) (Japón) junto con un detector de haz de diodos y una Matriz de fotodiodos, PDA) fue mezclado con cantidades equimolares de glicina (GLY), valina (VAL), lisina (LYS), prolina (PRO), metionina (MET), tirosina (TYR), o triptófano (TRP). Se movió el zumo resultante + las mezclas de aminoácidos durante 2 horas a 70 °C. Se supervisó las reacciones usando una cromatografía de capa fina en placas de aluminio recubiertas con gel de sílice F254 4x5 cm, eluyendo con una mezcla de metanol con agua 4:1. Los productos de reacción se analizaron por la HPLC mediante un método descrito en el Ejemplo 6. Se realizó la caracterización espectrofotométrica de los productos de reacción usando el software de espectrofotometría GENESYS 10S UV-VIS con VISIONlite versión 2.0. Para los experimentos de caracterización, se preparó muestras diluyendo 20 uL de la solución de reacción en 5 mL de agua desionizada, salvo que en el caso de las reacciones con triptófano y prolina, las muestras se prepararon diluyendo 100 y 200 uL de la solución de reacción en 5 mL de agua desionizada, respectivamente.

Se evaluó la estabilidad de los productos de reacción producidos de manera similar al método descrito en el Ejemplo 10 usando una solución amortiguadora a pH 3.0, salvo que en el Ejemplo actual, los productos de reacción también fueron sometidos a radiación con una lámpara ultravioleta UVGL-58 Handheld UV (Ultra-Violet Products Ltd., Cambridge, RU) a 254 nm por 7.46 horas. Los productos de reacción fueron probados en tres ejemplares en una concentración de 40 uL del producto de reacción por 10 mL de solución amortiguadora a pH 3.0.

La **FIGURA 18** muestra los espectros de absorción de los productos de reacción del zumo del fruto de la *Genipa americana* con diferentes aminoácidos. Los parámetros de color de estos productos se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros de color de los productos de reacción del zumo del fruto de la *Genipa americana* con diferentes aminoácidos

Aminoácido	L*	a*	b*	$\lambda_{\max}$	Absorbencia $\lambda_{\max}$
GLY	56,5	-9,5	-22,1	594	0.9217
LYS	67,6	-10,4	-9,7	596	0.5907
VAL	72,9	-12,4	-7,6	598	0.5205
MET	72,3	-14,7	-11,1	602	0.575
PRO	88,6	-0,7	3,4	350	0.3902
TYR	78,4	-12,1	-9	602	0.4272
TRP	93,1	-2,9	1,4	350	0.2582
PRO 200*	34,2	0,9	11,1	350	3.1127
TRP 100*	72,1	-10,4	4,3	350	1.1678

*Para el PRO200, se usó 200 microlitros de mezcla de reacción en crudo, en cambio, para el PRO, se usó 20 microlitros. Para el TRP100, se usó 100 microlitros de mezcla de reacción en crudo, en cambio, para el TRP, se usó 20 microlitros.

La **FIGURA 19A-C** muestra el análisis de la HPLC de los productos de reacción del zumo del fruto de la *Genipa americana* con diferentes aminoácidos, categorizados según el aminoácido. La **FIGURA 19A-C** muestra, para cada aminoácido, los espectros de la HPLC de los productos de reacción del zumo del fruto de la *Genipa americana* con el aminoácido usando un método del Ejemplo 6; una visión ampliada de la región de la HPLC donde se identifica un polímero; y unos espectros UV-vis de la señal seleccionada.

Los productos de reacción de los aminoácidos LYS, VAL, MET y PRO y el zumo del fruto de la *Genipa americana* tienen tiempos de retención en un rango de 10,3 minutos (10,3 minutos $\pm$ 5 %). Este tiempo de retención es similar al tiempo de retención observado en el polímero derivado del zumo del fruto de la *Genipa americana* con la glicina, no obstante, las señales de los productos de la reacción del zumo del fruto de la *Genipa americana* con los aminoácidos LYS, VAL, MET y PRO fueron más complejas que las señales observadas en los productos de la reacción entre el zumo del fruto de la *Genipa americana* con la glicina (consultar **FIGURA 19A-B**). Sin regirse por la teoría, estos resultados podrían indicar la formación de un mayor número de componentes o cadenas de polímeros de diferentes tamaños con el uso de los aminoácidos LYS, VAL, MET, y PRO.

La reacción del zumo del fruto de la *Genipa americana* con la tirosina o el triptófano no formó productos con un tiempo de retención dentro del rango de 10.3 minutos (es decir, 10,3 minutos $\pm$ 5 %). La longitud de onda de absorción máxima ($\lambda_{\max}$) de estos productos superaba los 600 nm (ver **FIGURA 19C**).

La **FIGURA 20** muestra las estabilidades (expresadas en semividas) de los productos de reacción de los diferentes aminoácidos con el zumo del fruto de la *Genipa americana* en una solución amortiguadora a pH 3,0 con una radiación UV a 254 nm.

La reacción del zumo del fruto de la *Genipa americana* con diferentes aminoácidos originó productos de diferente color: azul (GLY y LYS), verde azulado (VAL, MET y TYR), verde (TRP), y negro (PRO).

El producto formado de la reacción entre la metionina (MET) con el zumo del fruto de la *Genipa americana* tuvo el doble de estabilidad de pH que un producto derivado de glicina (GLY) y zumo del fruto de la *Genipa americana*, cuando se sometió a prueba en una solución amortiguadora a pH 3,0 con una radiación UV a 254 nm por 7,46 horas.

El análisis de la HPLC mostró que la reacción del zumo del fruto de la *Genipa americana* con la tirosina (TYR) o el triptófano (TRP) formó componentes con una polaridad relativamente menor en comparación con el polímero derivado de la glicina (GLY) y el zumo del fruto de la *Genipa americana* (según se indicó por los mayores tiempos de retención de los productos de las reacciones con TYR y TRP en comparación con la GLY).

Ejemplo 13. Colores producidos por la reacción de los extractos del mesocarpio de la fruta *Genipa americana* con la glicina

Extractos acuosos del mesocarpio del fruto de la *Genipa americana*

Se preparó extractos acuosos del mesocarpio de la fruta *Genipa americana* con la glicina (es decir, de la cáscara de la fruta). Se utilizó frutas inmaduras, que eran duras y tenían una cáscara dura y uniforme en comparación con las frutas maduras, que son suaves y tienen una cáscara irregular. Se licuó los mesocarpios de los frutos frescos de *Genipa americana* (es decir, dentro de 1-2 días después de la cosecha) (76 g) con 300 mL de agua desionizada. Este zumo se filtró y analizó por medio de TLC y la HPLC (en un sistema Shimadzu Prominence UFLC junto con un detector de haz de diodos (DAD, por sus siglas en inglés)) para determinar el contenido de genipina y otros iridoides de genipina. Para la comparación, se dejó a temperatura ambiente frutas intactas de la misma edad por tres días (fruta no fresca) antes de la extracción con agua desionizada descrita anteriormente. Además, el zumo resultante fue analizado usando la TLC y la HPLC para determinar el contenido de genipina y otros iridoides de la genipina. Para la comparación, se dejó frutas intactas de la misma edad a temperatura ambiente durante tres días (fruta no fresca) antes de exprimirla con el agua desionizada según se describe anteriormente. El zumo resultante también fue analizado usando la LTC y la HPLC para determinar el contenido de genipina y otros iridoides de la genipina.

La **FIGURA 21A** muestra espectros de la HPLC de un extracto acuoso de mesocarpios de frutos frescos de *Genipa americana*, que tuvieron un pico con un tiempo de retención de 19 a 20 minutos, el cual estaba cerca al tiempo de retención de la genipina (22 - 23 minutos), con una longitud de onda de máxima absorción de 240 nm.

La **FIGURA 21B** muestra un espectro de la HPLC de un extracto acuoso de mesocarpios de frutas de *Genipa americana* de la misma edad que las de la **FIGURA 21A**, pero que se dejaron a temperatura ambiente por tres días (no frescas) antes de realizar el extracto. Los espectros tuvieron picos de tiempo de retención de 19 - 20 minutos y 22 - 23 minutos).

Reacción del extracto acuoso de los mesocarpios (cáscara) con la glicina

Un extracto acuoso de mesocarpios (zumo filtrado, 300 mL) preparado como se describió anteriormente fue mezclado con glicina (450 mg) en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Posteriormente, se movió la mezcla resultante durante 90 minutos a 4000 rpm y 75 °C en una placa caliente con un agitador magnético (VELP, Italia). Este método produjo un producto con un color púrpura oscuro.

El producto de reacción fue filtrado y analizado con la espectrofotometría GENESYS 10S UV-VIS con software VISIONlite versión 2.0. El producto de reacción crudo fue analizado mediante una espectroscopia de RMN de ^1H y una espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés). La **FIGURA 22** muestra una RMN de ^1H del producto púrpura obtenido por este método que mezcla el extracto acuoso con la glicina.

La Tabla 7 muestra algunas señales detectadas en la mezcla de colorante púrpura.

Tabla 7. Señales detectadas en la mezcla de colorante púrpura analizado

	Masa molecular	Masa promedio		Abundancia absoluta
A	15375.9	15375.9	[M+H] +	87.09
B	3619.7	3619.7	[M+H] +	72.58
C	2510.9	2510.9	[M+H] +	57.10
D	10512.7	10512.7	[M+H] +	100.00
E	11100.4	11100.4	[M+H] +	60.96
F	4617.0	4617.0	[M+H] +	77.03
G	6276.6	6276.6	[M+H] +	91.86
H	15503.8	15503.8	[M+H] +	61.33
I	2720.1	2720.1	[M+H] +	64.16

J	8447.5	8447.5	[M+H] ⁺	94.78
---	--------	--------	--------------------	-------

La deconvolución realizada en la Tabla 7 muestra la deconvolución de señales de los componentes en m/z 257,2.

De forma alternativa, se aplicó el método en el extracto acuoso que fue precalentado a 70 °C antes de añadir la glicina, el producto obtenido tuvo un color azul. El producto tenía el mismo color azul obtenido en la mezcla de la genipina y la glicina. La **FIGURA 23** muestra una RMN de ¹H del producto azul obtenido por este método que mezcla el extracto acuoso precalentado con la glicina.

Estos resultados muestran que el producto de reacción del zumo obtenido de los mesocarpios del fruto de la *Genipa americana* y la glicina dependía de si el extracto acuoso estaba precalentado antes de añadir la glicina. Después del procedimiento en donde la glicina se mezcló con el extracto acuoso (sin precalentar), el producto formado tuvo un color púrpura oscuro. Después del procedimiento en donde el extracto acuoso se precalentó a 70 °C antes de añadir la glicina, el producto formado tuvo un color azul.

Caracterización del precursor de genipina del extracto acuoso de mesocarpios

I. Método de extracción de agua y liofilización

Se cortó frutos frescos inmaduros (dos días después de la cosecha) de la *Genipa americana* en cuatro piezas y se separó los mesocarpios (cáscara) de los endocarpios (pulpa) y pericarpios (piel externa). En la **FIGURA 24** se muestra una imagen de la *Genipa americana* inmadura. Se exprimió 360 g de mesocarpios con 300 mL de agua desionizada en una licuadora y el zumo resultante se filtró mediante aspiración a través de algodón, y el zumo se liofilizó de forma inmediata toda la noche con un equipo LABCONCO.

Se extrajo 50 mg del producto liofilizado con 1 mL de CD₃OD mediante sonicación durante 5 minutos y se filtró. La solución fue analizada mediante una RMN de ¹H y ¹³C a 300 y 75 MHz, respectivamente, en un Bruker Fourier 300 con supresión de agua.

II. Método de congelación con nitrógeno líquido

Se exprimió los mesocarpios recién cortados después de congelarlos con nitrógeno líquido y se extrajo 50 mg del polvo resultante con 1 mL de CD₃OD mediante sonicación durante 5 minutos y se filtró, la solución fue analizada mediante una RMN de ¹H y ¹³C a 300 y 75 MHz, respectivamente, en un Bruker Fourier 300 con supresión de agua.

III. Resultados

Los resultados de la RMN de ^1H de los mesocarpios liofilizados y congelados con nitrógeno mostraron un espectro muy bien resuelto con un patrón similar de huellas de genipina (**FIGURA 25A-B**)

El extracto de agua de los mesocarpios de la Jagua tuvo un pico de HPLC (240 nm) a los 19 minutos que desapareció tras el calentamiento o la extracción con acetato de etilo. Se esperaba detectar el pico de genipina a los 21 - 22 minutos. La **FIGURA 26A-B** muestra los perfiles de la HPLC (240 nm) de la separación del agua del extracto de mesocarpios y el solvente de acetato de etilo, respectivamente.

La formación de genipina del precursor en el mesocarpio de las frutas de Jagua fue espontánea según lo determinaron los perfiles de la HPLC de los extractos de agua preparados con frutas mantenidas en condiciones de ambiente durante varios días después del análisis presentado en la **FIGURA 26A**. Se observó genipina a los 21 - 22 minutos, y se pudo detectar su precursor a los 19 minutos a 240 nm (**FIGURA 27**).

La rápida y espontánea formación de genipina de su precursores encontrado en los mesocarpios de Jagua indicó un cambio estructural (es decir, una formación del anillo hamiacetal) en el precursor activado por oxígeno o calor, provocando una división de genipina o enzimas de la molécula del precursores para liberar la genipina al endocarpio de la fruta. El experimento de RMN de ^1H para el extracto de agua del mesocarpio no muestra un protón de aldehído (12 ppm), consulte la **FIGURA 28**.

Se detectó dos ejemplares a 5,1 y 4,7 pm y señales de carbón a 100 y 70 - 80 ppm, los que no estuvieron presentes en la genipina y son característicos de los protones anoméricos y de las porciones de carbohidratos en los azúcares, admitiendo que el precursor fue un glicósido de genipina.

Datos del espectro de (+)- Geniposida:

RMN de ^1H : (300 MHz, CD_3OD): δ 7,53 (s, 1H), δ 5,81 (s, 1H), δ 5,17 (d, J = 7,6 Hz, 1H), δ 4,73 (d, J = 7,8 Hz, 1H), δ 4,33 (d, J = 14,6 Hz, 1H), δ 4,20 (d, J = 14,3 Hz, 1H), δ 3,83 (d, J = 11,7 Hz, 1H), δ 3,72 (s, 3H), δ 3,66 (dd, J = 12,2; 5,7 Hz, 1H), δ 3,39 - 3,42 (m, 1H), δ 3,15 - 3,28 (m, 3H), δ 2,83 (dd, 16,5; 8,4 Hz, 1H), δ 2,53 (dd, J = 7,95; 15,75 Hz, 1H), δ 2,05 - 2,14 (m, 1H)

RMN de ^{13}C : (75 MHz, CD_3OD): δ 168,71; 152,23; 142,98; 127,37; 111,15; 98,90; 96,99; 76,82, 76,34; 73,39; 71,43; 61,12; 60,00; 50,77; 45,58; 38,29; 35,03.

Ejemplo 14. Adición de Metionina y Glicina al zumo del fruto de la *Genipa americana*

El zumo del fruto de la *Genipa americana* fue sometido a reacción con la metionina y la glicina para determinar los perfiles de color resultantes. Se añadió zumo del fruto de la *Genipa americana* (50 mL) a una mezcla de 100 mg de metionina y 100 mg de glicina, y la reacción se mantuvo en 70 °C durante 2 horas.

En un segundo experimento, inicialmente se añadió zumo del fruto de la *Genipa americana* (50 mL) a 100 mg de metionina y luego de una hora de reacción, se añadió 100 mg de glicina adicionales, y la reacción se mantuvo durante una hora más.

El color resultante de cada una de esas reacciones se midió mediante soluciones acuosas de colorantes en polvo a 0,015 g/40 mL en una absorción UV-vis del espectrofotómetro GENESYS 10S en un rango de entre 400 y 700 de longitud de onda para determinar la absorción máxima y los parámetros CIELab.

Independientemente del orden de la adición de aminoácidos, el resultado es la formación de un color azul oscuro. Una cromatografía de capa fina (TLC, por sus siglas en inglés) mostró la formación de polímero, y muestra que el componente principal fue el mismo independientemente del orden de la adición de los reactivos y que el color fue el mismo se haya usado metionina o glicina de forma independiente o una mezcla de metionina y glicina. La TLC mostró una formación de colorante azul. Los productos de reacción fueron analizados mediante espectrofotometría tal como se muestra en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Parámetros CIELab de las reacciones entre el zumo del fruto de la *Genipa americana* y mezclas de metionina y glicina y la glicina

Muestra	L	a	b	Absorbencia 590 nm
M+G	87	-3.6	-11.2	0.2374
1+2	88.1	-4.2	-10.5	0.221
RN	93	-2.8	-6.2	0.1267

M+G: Reacción simultánea del zumo del fruto de la *Genipa americana* con la glicina y la metionina

1+2: Reacción de la metionina con el zumo del fruto de la *Genipa americana* seguida por glicina.

RN: Reacción del zumo del fruto de la *Genipa americana* con la glicina.

El tiempo de retención en la cromatografía HPLC del polímero que se identificó en la mayoría de la mezcla del zumo del fruto de la *Genipa americana* y el aminoácido y fue el mismo que el colorante producido mediante la reacción entre la glicina y el zumo del fruto de la *Genipa americana* únicamente. La absorción máxima fue 590 nm. La glicina y la metionina enriquecieron de manera simultánea al zumo del fruto de la *Genipa americana*. Los cromatogramas obtenidos mediante las reacciones entre el zumo del fruto de la *Genipa americana* y los aminoácidos glicina y metionina, así como la glicina de manera independiente se muestran en la **FIGURA 31**.