

COMPOSICIÓN COLORANTE DERIVADA GENIPINA Y/O GENIPÓSIDO, MATERIALES QUE LO CONTIENEN Y MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LAS COMPOSICIONES COLORANTES

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Declaración de acceso y distribución de beneficios (ABS)

De conformidad con los principios de acceso y distribución de beneficios (ABS) del Convenio de Diversidad Biológica y su Protocolo de Nagoya, el acceso a los recursos genéticos se obtuvo a través de acuerdos con las comunidades étnicas y las autoridades encargadas por la legislación colombiana de administrar sus territorios colectivos. El cesionario también ha firmado acuerdos con varias iniciativas empresariales comunitarias que coordinan las dinámicas locales de producción y suministro con socios comerciales. A través de un acuerdo de participación, estos proveedores de propiedad comunitaria comparten los beneficios financieros de la comercialización de los recursos genéticos. La Fundación Espavé, una organización sin fines de lucro que es miembro de la Unión Ética de Biocomercio y que capacita a los productores locales sobre abastecimiento sostenible en la selva del Pacífico, brinda beneficios adicionales.

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 ¹³C-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

En este documento se proporcionan composiciones de colorantes y métodos de aplicación de composiciones de colorante.

Ciertos modos de realización apuntan a composiciones de colorante y a métodos de aislamiento de las composiciones de colorante derivados de una reacción de genipina y glicina. En algunos modos de realización, las composiciones de colorante se derivan de una reacción de glicina y un zumo que contiene genipina. En algunos modos de realización, las composiciones de colorante se derivan de una reacción de glicina y un zumo de fruto derivado de *Genipa americana*. En algunos modos de realización, las composiciones 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, las composiciones

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 un 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, borojó, 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, las composiciones de colorante se derivan de una reacción de un zumo derivado de la sandía y un zumo derivado de la *Genipa americana*.

En algunos modos de realización, un método de impartir color 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.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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 un 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 **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 madurez 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 mesocarpio (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 Genipósido (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).

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, un “dímero” o un “compuesto dimérico” se refiere a un compuesto que consta esencialmente de dos monómeros.

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, CH_3CN , MeOH , EtOH , etc.)).

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 composiciones de colorantes, así como los métodos de aislamiento de las composiciones de colorante derivados de una reacción de la *Genipa americana*, la genipina y la glicina. En algunos modos de realización, las composiciones 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 ($^1\text{HNMR}$), J-Modulación (JMOD), Espectroscopia de Correlación H-H (COSY ^1H - ^1H), y otros análisis de herramientas estructurales moleculares.

Composición de colorante sustancialmente libre de carbohidratos

Ciertos modos de realización apuntan a una composición de colorante que comprende un polímero purificado, 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. 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. 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, 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. 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, 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 una composición de colorante sustancialmente libre de carbohidratos con un compuesto adicional (por ejemplo, un colorante adicional (como un aditivo de color aprobado por la FDA)) que está sustancialmente libre de carbohidratos.

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 lo 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).

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.

En algunas realizaciones, la glicina es una glicina purificada. En algunas realizaciones, la glicina es una mezcla que contiene glicina (por ejemplo, un jugo que contiene glicina o una mezcla seca que contiene glicina tal como un concentrado de jugo que contiene glicina). En algunas realizaciones, la glicina es un jugo que contiene glicina (por ejemplo, un jugo de fruta tal como un jugo derivado de sandía, uva blanca, piña, lichi, melón, plátano, naranja, manzana, pera, limón, maracuyá, uva roja, arándano, tamarindo, durazno, papaya, acai, ciruela, guayaba, mandarina, borojo, cupuacu, goji o kiwi). En algunas realizaciones, la glicina es un jugo que contiene glicina, en donde el jugo se deriva de la sandía. En algunas realizaciones, la glicina es un jugo que contiene glicina, en donde el jugo se deriva de la sandía fresca.

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 lo 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 genipósido (+)- o un precursor iridoide B-glicósido de la genipina, que se deriva del mesocarpio (cáscara) del fruto de la *Genipa americana*.

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

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 genipósido 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 genipósido del mesocarpio; (c) la mezcla de la genipósido 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 genipósido 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 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 Glaucó, 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, bígaro, 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. 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)	DO₂ (%)	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 2. 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 (λ_{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 3. 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 ppm 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 (+)- Genipósido:

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 4. 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**.