



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112014010978-8 B1



(22) Data do Depósito: 07/11/2012

(45) Data de Concessão: 03/11/2020

(54) Título: MÉTODO PARA PREPARAR CORANTES VERMELHOS A PARTIR DE UM MATERIAL RICO EM GENIPINA DO FRUTO DE GENIPA AMERICANA

(51) Int.Cl.: A23L 5/43; A23L 2/04; A23L 5/20; A23P 10/30.

(30) Prioridade Unionista: 07/11/2011 US 61/556,441.

(73) Titular(es): WILD FLAVORS, INC..

(72) Inventor(es): SHAOWEN WU; GREGORY HORN.

(86) Pedido PCT: PCT US2012063836 de 07/11/2012

(87) Publicação PCT: WO 2013/070682 de 16/05/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 07/05/2014

(57) Resumo: MATERIAL RICO EM GENIPINA E SEU USO. A invenção refere-se a um método de preparar materiais ricos em genipinas a partir do fruto da fruta de Genipa americana para seu uso como um agente reticulante e como um material bruto para produzir cores. Os materiais ricos em genipina podem ser usados em uma faixa vasta de aplicações incluindo cuidado pessoal, cosméticos, suplementos dietéticos, embalagem, tecidos, bebidas, comestíveis, fármacos, e alimentações de animais.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"MÉTODO PARA PREPARAR CORANTES VERMELHOS A PARTIR
DE UM MATERIAL RICO EM GENIPINA DO FRUTO DE *GENIPA
AMERICANA*".**

CAMPO TÉCNICO

[001] Este pedido de patente se baseia e reivindica prioridade do Pedido provisório US 61/556.441, Wu e Horn, depositado em 7 de novembro de 2011, incorporado aqui por referência.

[002] Esta invenção refere-se aos novos materiais ricos em genipina branco-sujos e seus usos como reagentes reticulantes e para desenvolvimento de corantes. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a um método para produzir novos materiais ricos em genipina a partir da fruta *Genipa americana*; o material rico em genipina contém genipina até 97% p/p que permite seu uso como agentes para reticulação e como materiais brutos para produção de corante.

ANTECEDENTES

[003] Hoje, químicas sintéticas, tais como corantes ou reagentes reticulantes, tendem a ter aceitação diminuída nas indústrias de alimentos, cosméticos, rações e têxteis. Por razões de segurança, quer real ou observada, as pessoas tendem a favorecer o uso de ingredientes naturais ou orgânicos em produtos alimentícios, cosméticos, têxteis, e biomateriais.

[004] Genipina é um composto incolor. Pertence ao grupo iridoide. É quimicamente muito ativo e reage imediatamente quando combinado com compostos que têm grupos amina primária, tais como aminoácidos, colágeno, quitosana, compostos do tipo glicosamina e várias proteínas e enzimas. Quando oxigênio estiver presente, o produto pode ficar azul, verde, ou preto rapidamente. Portanto, genipina é um éster iridoide que pode ser hidrolisado para gerar ácido genipínico que pode também reagir com compostos diferentes para

gerar corantes vermelhos e marrons. Os corantes gerados de genipina são estáveis ao calor e pH. Uma vez que genipina normalmente vem de materiais vegetais, suas características de Kosher fornecem grande potencial para o uso de corantes derivados de genipina em aplicações de padaria e de alimentos em conserva.

[005] Quantidade grande de iridoídes, tais como geniposídeo, gardenosídeo, genipina-1-b-gentiobiosídeo, ácido geniposídico e genipina, pode ser encontrada na fruta de *Gardenia jasminoides* Ellis. Geniposídeo, um glicosídeo de iridoide, é um componente principal compreendendo 7-8% em peso da fruta, enquanto apenas quantidades de traço de genipina existem naturalmente na fruta de Gardênia. Historicamente, os iridoídes na fruta de Gardênia eram extraídos da fruta com metanol ou etanol, e depois separados como pigmento amarelo em carbono ativo, e tratados com enzimas tendo atividade beta-glucosídica ou atividade proteolítica para converter os iridoídes do glicosídeo para a forma de aglicona, genipina ou ácido genipínico. Depois, a genipina ou ácido genipínico podem ser reagidos com outros compostos para produzir corantes (KR1020010096213 A).

[006] Genipina e outros compostos de iridoide, tais como ácido genipínico, genipina-gentiobiosídeo, geniposídeo e ácido geniposídico, são encontrados também nas frutas e folhas de *Genipa americana*, também conhecida como Genipap, ou Huito, uma planta selvagem tropical. Genipina está naturalmente presente na fruta madura, e sua quantidade é de 0 a 3,0% em peso da fruta dependendo do grau de maturação. Genipina é estável na célula vegetal embora não seja estabelecido onde fica armazenada. Sempre que a célula é quebrada, a genipina reagirá espontaneamente com os aminoácidos que naturalmente existem na polpa da fruta e fica de cor azul ou preta em um ambiente arejado. No pedido de patente anterior (US20090246343A1), foi feito tingindo suco de fruta (azul) misturando a polpa da fruta *Genipa*

americana com sucos de outras frutas ou vegetais. O suco azul natural estável em ácido foi amplamente usado nas indústrias de alimentos e bebidas. Lopes et al. (US7927637B2) usaram suco bruto não processado obtido da polpa da fruta *Genipa americana*, e misturaram com glicina ou com glicina mais amido, para fazer corantes azuis. Patrice Andre e colaboradores (US20100196298A1) usaram materiais de coloração obtidos da extração de planta de *Genipa americana*, *Gardenia jasminoides*, *Rothmannia*, *Adenorandia* ou *Cremaspora*, ligados a um substrato sólido, para fazer composições cosméticas.

[007] Genipina não só pode gerar corantes, mas também pode agir como um agente reticulante bom. Campbell et al. descobriram um polímero de plástico biodegradável novo envolvendo genipina como agente reticulante (EP2093256A2). Tais plásticos são úteis em sistemas biológicos para cura de ferida, implantes, *stents*, encapsulação e liberação de fármacos, e outras aplicações. Fujikawa et al. reivindicaram (US4983524) o uso de aglicona de iridoide, genipina, como um agente reticulante para produzir enzima imobilizada em contos para indústria alimentícia. Quijano, R e Tu, H (US 20080195230A1) revelaram o uso de genipina para fixar tecidos inteiros, naturais para reduzir antigenicidade e imunogenicidade e impedir a degradação enzimática do tecido quando implantado em um hospedeiro.

[008] Porém, produção de genipina pura historicamente envolve muitas etapas, incluindo separação de HPLC, e correntemente seu custo é alto. Nenhuma descrição na técnica ensina a preparação de um extrato rico em genipina estável a partir da planta *Genipa americana*, e suas aplicações vastas como corantes naturais e agente reticulante em alimentos, fármacos, suplementos nutricionais, produtos de cuidado pessoal, cosméticos, ração, tecidos, polímeros, e nas indústrias de biomateriais.

SUMÁRIO

[009] A revelação presente fornece um método de produzir extratos ricos em genipina estáveis da planta *Genipa americana*. O processo envolve extração de solvente aquoso ou polar e extração de solvente orgânico não polar; o pó formado é um extrato rico em genipina com uma cor branco-suja e tem conteúdo de genipina até cerca de 97%.

[0010] A revelação presente ainda fornece aplicações dos extratos ricos em genipina na produção de corante natural e formação de polímeros para o uso em uma faixa vasta de áreas, tais como em comestíveis, fármacos, suplementos nutricionais, produtos de cuidado pessoal, cosméticos, ração, tecidos, polímeros biodegradáveis, e produção de biomateriais. Exemplos de tais usos serão encontrados em numerosos documentos de patente, incluindo US8283222, CN101899484, US20120189584, WO2012048188, CN102399370, CA2458821, DE602007013718, US20110082199, TW1334878, US20100183699, e tais documentos são incorporados aqui por referência.

[0011] Como aqui usado, todas as razões e proporções observadas são “em peso” a menos que do contrário especificado. Além disso, todas as patentes, pedidos de patente e publicações técnicas citadas são incorporadas aqui por referência.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0012] A figura 1 é uma representação de fluxograma de uma modalidade do processo para fazer extrato rico em genipina produzido da fruta *Genipa americana*.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0013] A revelação presente fornece um método de produzir extratos ricos em genipina estáveis da planta *Genipa americana*. O processo envolve extração de solvente aquoso ou polar e extração de

solvente orgânico não polar. A forma de pó resultante de extrato rico em genipina é de cor branco-suja e tem conteúdo de genipina até cerca de 97%. A revelação presente ainda fornece aplicações dos extratos ricos em genipina na produção de corantes naturais estáveis ao calor e como um agente reticulante novo para o uso em uma faixa vasta de áreas, tais como comestíveis, fármacos, suplementos nutricionais, produtos de cuidado pessoal, cosméticos, ração, tecidos, polímeros biodegradáveis, e produção de biomaterial.

MATERIAIS DE PARTIDA

[0014] Os materiais de partida usados neste processo são frutas ou folhas de uma planta de *Genipa americana* L. que é também conhecida por numerosos nomes informais: genipap, huito, jaguar, bilito, cafecillo denta, caruto, caruto rebalsero, confiture de singe, danipa, genipa, génipa, genipayer bitu, guaitil, guaricha, guayatil colorado, huitol, huitoc, huitu, irayol, jagua blanca, jagua amarilla, jagua colorado, jeipapeiro, junípero, maluco, mandipa, marmelada, nandipa, nandipa genipapo, tapaculo, tapoeripa, taproepa totumillo, yagua, yanupa-i, yenipa-i, yenipapa bi, genipapo, huitoc, vito, chipara, guanapay, ou outras variedades tais como jenipaporana, ou jenipapo-bravo, etc. A fruta é ótima para colheita quando amadurece em tamanho, firme e de cor verde a marrom esverdeado.

[0015] Materiais podem ser fruta inteira, polpa de fruta, suco de fruta, purê de fruta, concentrado de suco de fruta, pó secado das frutas ou suco, parte insolúvel em água de fruta, e folhas de *Genipa americana* L.

PROCESSO PARA EXTRAÇÃO RICA EM GENIPINA

[0016] Para produzir os extratos ricos em genipina da presente invenção, as frutas maduras de *Genipa americana* são processadas com água ou solvente polar em razões de cerca de 1:0,5-5,0 (em peso) dependendo da eficiência de extração, preferivelmente razões

de cerca de 1:1-1,5. Após lavar e/ou branquear, a fruta é descascada e cortada em pedaços; depois moída ou misturada com água ou solventes polares; extraída com ou sem aquecimento, a polpa, sementes e pele são separadas através de filtração; e o líquido é colhido. Extração pode acontecer por até cerca de 1 hora, preferivelmente cerca de 15-30 min, em uma temperatura de cerca de 15-40°C. A extração em água ou solvente polar da polpa de fruta de *Genipa americana* pode ser repetida 1-3 vezes. Depois, o pH dos extratos de solvente polar são medidos e ajustados para cerca de 3,8-4,0 usando ácidos. Concentração pode ser executada em um evaporador rotativo com vácuo e a temperatura ajustada para cerca de 40-46°C. O conteúdo sólido no concentrado pode ser maior que 15% p/p, preferivelmente cerca de 40-70% p/p.

[0017] Em seguida, o extrato aquoso ou o extrato aquoso rico em genipina concentrado pode ser ainda extraído com solventes orgânicos não polares envolvendo mistura adequada (sacudidela ou agitação) em uma razão de cerca de 1:1. Aqueles solventes orgânicos não polares têm um índice de polaridade de cerca de 0 a 5,0 e a solubilidade em água menos que cerca de 30%. A fase de solvente orgânico é depois separada da fase aquosa mediante repouso e remoção com sifão da camada orgânica de cima ou usando uma centrífuga de velocidade alta. Extração de solvente não polar pode ser repetida 2-3 vezes dependendo da eficiência da extração. Os extratos ricos em genipina podem ser subsequentemente secados por evaporação e o solvente orgânico pode ser reciclado e reusado para extração de genipina. O sólido amarelo ou branco-sujo restante é um extrato rico em genipina em que conteúdo de genipina é pelo menos cerca de 70% p/p dos sólidos.

[0018] Alternativamente, as frutas maduras de *Genipa americana* são processadas diretamente com solventes orgânicos em uma razão

de cerca de 1:1-2. Após lavar e/ou branquear, a fruta é descascada e cortada em pedaços, depois moída ou misturada, extraída diretamente com solvente orgânico não polar, com ou sem aquecimento, a polpa, sementes e pele são separadas e o extrato de solvente é colhido. Extração pode acontecer até cerca de 1 hora, preferivelmente cerca de 15-30 min em temperatura de cerca de 18-25°C. A extração de solvente orgânico pode ser repetida 2-3 vezes dependendo da eficiência da extração. Os extratos ricos em genipina podem ser subsequentemente secados usando um evaporador e condensador, e o solvente orgânico pode ser reciclado e reusado. Os sólidos branco-sujos ou amarelos resultantes são extrato rico em genipina que contém genipina maior que cerca de 40% p/p de sólido.

[0019] Extratos ricos em genipina podem ser extratos de solvente aquoso ou polar obtidos das fontes de material de partida descritas. Solventes polares incluem aqueles com solubilidade em água até 100% e índice de polaridade maior que cerca de 5,0, tal como água, ácido acético, metanol, etanol, n-propanol, iso-propanol, sulfóxido de dimetila, formamida de dimetila, acetonitrila, acetona, tetra-hidrofurano de dioxano, etc., ou soluções de tampão de ácido acético, cítrico, fosfato, ou suas misturas em razões diferentes. Esta lista não é intencionada a limitar o solvente usado, porém, considerando a segurança, água, etanol, n-propanol, iso-propanol, metanol e acético, soluções de tampão de ácido cítrico e fosfato são preferidos para os usos de alimento do extrato.

[0020] Extratos ricos em genipina podem ser alternativamente extratos de solvente orgânico obtidos de extratos de solvente aquoso ou polar descritos acima. Solventes orgânicos não polares incluem aqueles com menos que cerca de 30% de solubilidade em água e um índice de polaridade de 0 a cerca de 5,0, tal como acetato de etila, acetato de butila, n-butanol, éter dietílico, hexano, 2-butanona,

cloroformiza, 1,2-dicloroetano, benzeno, xileno, éter metil-t-butílico, tolueno, tetracloreto de carbono, tricloroetileno, ciclo-hexano, pentano, e heptano, ou misturas dos mesmos em razões diferentes. Esta lista não é intencionada a limitar o solvente usado, porém, considerando a segurança alimentícia, acetato de etila, acetato de butila, e n-butanol são preferidos.

[0021] Extratos ricos em genipina podem ser alternativamente extratos de solvente orgânico obtidos das fontes de material de partida descritas. Solventes orgânicos incluem aqueles com índice de polaridade menor que cerca de 6,0, e misturas dos mesmos em razões diferentes. O solvente ou mistura de solventes com baixa solubilidade em água é preferido a fim de se obter extratos ricos em genipina incolores.

[0022] Métodos usados para a separação de sólido-líquido podem ser, por exemplo, filtração regular, centrifugação, filtração em prensa, e filtração em cartucho de membrana. A separação de líquido-líquido pode ser feita, por exemplo, usando centrífuga de velocidade alta, ou repouso e remoção com sifão da camada líquida requerida.

[0023] Ácidos usados para ajuste de pH podem ser quaisquer ácidos orgânicos ou inorgânicos, selecionados para serem adequados para o uso do fim intencionado.

[0024] Concentração pode ser executada por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, por evaporação usando um evaporador rotativo a vácuo, um evaporador instantâneo, um dispositivo de filtração de osmose, ou um dispositivo de ultrafiltração com uma membrana adequada.

PROPRIEDADES DO EXTRATO RICO EM GENIPINA

[0025] Extrato rico em genipina é um pó branco-sujo ou cristais. Algumas bateladas podem ter um matiz ligeiramente amarelada ou esverdeada se a pureza for relativamente baixa. O conteúdo de

genipina pode ser até cerca de 97% (p/p) dependendo do método de extração. Nenhum geniposídeo, ácido geniposídico, ou outros compostos de iridoide foram encontrados no extrato rico em genipina quando analisados por HPLC. O restante da composição do extrato rico em genipina é principalmente umidade, gordura, e também quantidades pequenas de ácidos e compostos contendo nitrogênio, com o equilíbrio sendo carboidratos, como observado na tabela seguinte.

ESPECIFICAÇÃO DO MATERIAL RICO EM GENIPINA

| | |
|------------------|--------|
| Genipina | 30-97% |
| Ácidos graxos | <1,0% |
| Gordura | <5,0% |
| Proteína | <1,0% |
| Ácidos orgânicos | <0,5% |

[0026] Métodos de HPLC podem ser usados para determinar o conteúdo de genipina e executar outra análise de iridoide.

[0027] Conteúdo de genipina do pó rico em genipina branco-sujo é estável quando armazenado em temperaturas refrigeradas. Nível de genipina diminuiu para menos que cerca de 5% após 3 meses de armazenamento. Porém, ao misturar extrato rico em genipina com os compostos tendo um grupo amina primária, a genipina reagirá rapidamente e gerará corantes e/ou polímeros.

[0028] Extrato de conteúdo de genipina alto dissolve-se facilmente em álcool, misturas de álcool-água, ou água quente. Sua solubilidade em água fria é limitada.

PRODUÇÃO DE CORANTE

[0029] A presente invenção também fornece um método de fabricar um corante azul usando a reação de extrato rico em genipina e misturando com água e aminoácidos, por exemplo (mas não limitado), lisina, histidina, arginina, glutamina, asparagina, metionina,

glicina, ácidos glutâmicos, tirosina, valina, alanina, serina, leucina, taurino, carnitina, ornitina e citrulina, na presença de oxigênio. Aquecimento poder ser usado para acelerar a velocidade de reação. As razões molares do extrato rico em genipina para aminoácidos são de cerca de 1:0,5 a cerca de 1:10. Os tons azuis gerados são variáveis entre azul forte, azul-violeta, azul brilhante, e azul esverdeado dependendo do aminoácido usado. O corante azul gerado do extrato rico em genipina é um pigmento estável ao calor e ácido.

[0030] Corantes azuis similares também podem ser gerados por reação do extrato rico em genipina com outros extratos, fruta e sucos vegetais, materiais vegetais e animais, incluindo produtos de laticínios e de ovo, que contêm aminoácidos, polipeptídeos, proteínas, e compostos com um ou mais grupos amina primária. A cor azul também pode ser gerada mediante reação do extrato rico em genipina com colágeno, gelatina, quitosana, enzimas, e micróbios. O corante produzido pode ser ainda concentrado ou depositado em argila ou outros veículos e usado em alimentos, cosméticos (pasta de dentes, maquiagem, tintura de cabelo, etc), e aplicações têxteis (roupas).

[0031] A presente invenção fornece um método de fabricar um corante vermelho usando o extrato rico em genipina. O extrato rico em genipina é hidrolisado para remover um grupo metila e converter a genipina para ácido genipínico, que ainda reage com os compostos contendo amina, com o ácido orgânico extra presente e sob condições anaeróbias, para gerar o pigmento vermelho. Aquecimento pode ser usado para acelerar a formação do pigmento vermelho. A solução vermelha pode ser ainda purificada em uma coluna de permuta de íons e o material eluído pode ser concentrado em um evaporador rotativo a vácuo. O vermelho de genipa é um pigmento estável ao calor, e é também estável em um pH alto.

[0032] Extrato rico em genipina pode ser dispersado ou dissolvido

em cerca de 5-50% de etanol, preferivelmente cerca de 5-15% de etanol, e cerca de 0,5-1,5 N de hidróxido de sódio ou solução de hidróxido de potássio, para uma concentração de extrato de cerca de 5-10% p/p. Hidrólise pode ser executada com ou sem aquecimento para de cerca de 30 min por 24 horas, preferivelmente cerca de 2-10 horas sob temperatura ambiente (~20°C).

[0033] Extrato rico em genipina hidrolisado pode ser neutralizado em pH usando ácidos, preferivelmente ácidos orgânicos, tais como ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido adípico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido fumárico, e ácido málico, preferivelmente ácido acético e/ou ácido tartárico. O pH da solução hidrolisada pode ser ajustado para a faixa de cerca de 3,5-5,0.

[0034] A solução acidificada é depois aquecida para cerca de 65-85°C, e preferivelmente cerca de 70-75°C, durante cerca de 5-120 minutos, preferivelmente cerca de 10-20 minutos. Os subprodutos marrons insolúveis são removidos uma vez que eles não contribuirão para a formação da cor vermelha. Separação do precipitado pode ser realizada por quaisquer dos métodos de filtração ou centrifugação conhecidos na técnica, por exemplo, usando filtração regular, centrífuga, filtração em prensa, ou filtração de fluxo tangencial ou métodos de filtração em cartucho de membrana. Formação dos subprodutos marrons insolúveis pode ser ainda intensificada pela adição de carbonato de cálcio para ajustar o pH para cerca de 5-7,5 e misturando durante cerca de 5-30 minutos. Separação da precipitação pode ser realizada pelos métodos descritos acima.

[0035] A solução clara descrita acima pode ser ajustada para pH cerca de 4,0-4,6 com ácido orgânico ou sal, preferivelmente ácido acético e/ou acetato de sódio. É gerada cor vermelha após misturar com os compostos tendo grupos amina primária e aquecendo para cerca de 70-95°C, preferivelmente cerca de 80-85°C, durante cerca de

2 horas, ou cerca de 90-95°C, durante cerca de 1 hora. Os compostos com grupos amina primária podem ser selecionados de aminoácidos, tais como alanina, arginina, lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, histidina, valina, leucina, e serina. Esta lista não é intencionada a limitar os compostos úteis com os grupos amina primária.

[0036] Além disso, a presente invenção fornece um método de fabricar corante verde usando o extrato rico em genipina. Extrato rico em genipina pode reagir com certos aminoácidos, tais como isoleucina, treonina, cisteína, e triptofano, para gerar cor verde. Este também pode reagir com compostos contendo amina primária e misturar com pigmentos carotenóides, anato, e turméricos para gerar cor verde. Considerando que o verde da genipa pode fornecer um tom verde resistente ao calor, é muito útil na indústria alimentícia por causa da instabilidade de calor do pigmento verde natural, a clorofila.

[0037] Corantes verdes similares também podem ser gerados por reação do extrato rico em genipina com outros extratos, fruta e suco vegetal, planta e materiais animais, incluindo produtos de leiteria e de ovo que são ricos em aminoácidos por exemplo, isoleucina, treonina, cisteína, e triptofano. A cor verde também pode ser gerada por reação do extrato rico em genipina com colágeno, gelatina, quitosana, enzimas e micróbios e misturando com pigmentos carotenoides, anato, e turméricos para gerar cor verde. O corante produzido pode ser ainda concentrado ou depositado em argila ou outros veículos e usado em alimentos, cosméticos (pasta de dentes, maquiagem, tintura de cabelo, etc), e aplicações têxteis (roupas).

[0038] Além disso, a presente invenção fornece um meio para gerar outros corantes, como roxo, vermelho, amarelo, laranja, marrom, e preto usando o extrato rico em genipina. Roxos e vermelhos podem ser criados misturando o extrato rico em genipina com carmim, suco de beterraba, e corantes de antocianina e solução com compostos

contendo amina. Laranjas e amarelos podem ser criados reagindo o extrato rico em genipina com pentoses, tais como xilose, ribose, ou vitamina C. Tom de cor preta pode ser gerado quando metais alcalinoterrosos (por exemplo magnésio ou cálcio), ou metais com multivalências estão envolvidos durante a reação de genipina com os compostos contendo grupo amina primária.

AGENTE RETICULANTE

[0039] A presente invenção fornece materiais novos contendo até cerca de 97% de conteúdo de genipina. Extrato rico em genipina pode reagir com qualquer composto contendo um grupo amina primária, tal como colágeno, gelatina, quitosana, glicosamina, e várias enzimas e proteínas, para formar novos materiais de textura usados, por exemplo, nas indústrias de alimentos, cosméticos, biomateriais, e de polímeros.

[0040] A presente invenção também fornece um agente reticulante obtido da planta natural, *Genipa americana*, que pode substituir as químicas sintetizadas tais como glutaraldeído, formaldeído, glioxal, malonaldeído, succinaldeído, compostos epóxi, etc. Extrato rico em genipina usado como um agente reticulante tem uma toxicidade muito inferior que aqueles reagentes de reticulação sintéticos comumente usados.

[0041] Extrato rico em genipina pode trabalhar como um agente reticulante natural para a produção de encapsulação nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Materiais encapsulados podem ser ingredientes nutricionais, tais como óleo de ômega-3, vitamina A, óleo linolênico conjugado, ou medicinas. Gelatina, colágeno, proteínas de soro, caseína, quitosana, proteínas de soja, e outras proteínas vegetais ou animais, são materiais de partida bons junto com o extrato rico em genipina para usar para fazer um invólucro de encapsulação, filme ou micromembrana. Os produtos têm corrente térmica e

estabilidade mecânica boas, como também sua propriedade biocompatível.

[0042] Os exemplos a seguir são fornecidos para o propósito de adicionalmente ilustrar a revelação presente, mas em hipótese alguma devem ser considerados como limitativos.

EXEMPLO 1

[0043] Um extrato rico em genipina foi gerado com base no processo seguinte:

frutas de Huito foram descascadas para render 866,0 g de fruta descascada. A fruta descascada foi cortada em pedaços e misturada com 1300 g de água deionizada (DI) e feita purê com um misturador para produzir um purê;

o purê foi deixado repousar 15 min em temperatura ambiente; e o sólido insolúvel foi separado do extrato aquoso através de filtração. Depois, 1212,4 g de água DI foram acrescentados ao filtrado e misturados durante 15 minutos seguidos por uma segunda etapa de filtração;

o filtrado foi ajustado para pH < 4,0 usando ácido cítrico, e concentrado para 25-55% (p/p) de conteúdo sólido em um rotoevaporador;

depois, o extrato aquoso concentrado foi extraído usando acetato de etila em uma razão de 1:1. A camada de acetato de etila clara incolor ou ligeiramente amarela foi colhida. Esta extração de líquido-líquido foi repetida 2 vezes;

próximo, as camadas de extrato de acetato de etila combinadas foram evaporadas em um rotoevaporador em uma temperatura de 40°C e vácuo de 35 mm de Hg para remover o solvente. Acetato de etila condensado pode ser usado de novo para a extração de genipina. Após evaporar o acetato de etila, um pó branco-sujo ou ligeiramente amarelo foi obtido. O pó continha 74,4% p/p de

genipina.

EXEMPLO 2

[0044] Um extrato rico em genipina foi gerado com base no processo seguinte:

fruta Huito, 462 g, foi descascada e misturada com água DI 537 g para produzir purê;

o purê foi deixado repousar 15 min em temperatura ambiente, e o sólido insolúvel foi separado de extrato aquoso através de filtração. Depois, a mesma quantidade de água DI foi acrescentada à parte sólida, e a etapa de extração foi repetida 2 vezes;

o extrato aquoso combinado foi ajustado para pH < 4,0 usando ácido cítrico e concentrado a 24,92% (p/p) de conteúdo sólido por meio de um rotoevaporador;

depois, o extrato aquoso concentrado foi extraído usando acetato de butila em razão 1:1. A camada de acetato de butila clara incolor ou ligeiramente amarela foi colhida. Esta extração de líquido-líquido foi repetida 2 vezes;

a seguir, o extrato de acetato de butila combinado foi evaporado em um rotoevaporador em uma temperatura de 55°C e vácuo de 35 mm de Hg para remover o solvente. Acetato de butila condensado pode ser usado de novo para extração de genipina. Após evaporar o acetato de butila, um pó branco-sujo ou ligeiramente amarelo foi obtido. O pó contém 90,9% p/p de genipina.

EXEMPLO 3

[0045] O extrato rico em genipina feito pelo método no Exemplo 2 foi testado quanto à estabilidade. Pó rico em genipina, 0,20 g cada, foi vedado em frascos e armazenados a 4°C. As amostras foram puxadas em 0, 4 semanas, 6 semanas, e 12 semanas, e conteúdo de genipina foi testado usando o método de HPLC. Os resultados estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Estabilidade do extrato rico em genipina

| Tempo de armazenamento(semanas) | Genipina, % p/p |
|---------------------------------|-----------------|
| 0 | 83,9 |
| 4 | 86,0 |
| 6 | 85,3 |
| 12 | 84,7 |

[0046] O material de genipina manteve-se estável no período do teste.

EXEMPLO 4

[0047] Quinze gramas de extrato rico em genipina feito pelo método no Exemplo 1 foram dissolvidos em 118,10 g de 10% de solução de etanol. 16,89 g de 0,9 N de solução de OH foram acrescentados à mistura acima e a genipina foi hidrolisada com agitação em temperatura ambiente (22°C) por 7,5 horas. O pH da solução hidrolisada foi ajustado para menos que 4,0 com ácido tartárico. A solução foi aquecida para 74°C por 15 min e esfriada. O precipitado foi filtrado através de papel de filtro #2. Em seguida, o pH do filtrado foi ajustado para ~6,5 usando carbonato de cálcio e a pasta foi misturada durante 10 minutos. O precipitado resultante foi filtrado e o pH do filtrado foi ajustado para 4,0-4,5 pela adição de ácido acético. Após alanina (4,50 g) ser adicionada, cor vermelha da genipina foi desenvolvida aquecendo a 82°C por 2 h. A cor foi analisada tirando 0,30 g de cor vermelha de genipina e diluindo a 30,0 g com água DI. Valores L, a e b foram medidos em um espectrômetro de Hunter Lab, e a curva de absorção medida em um espectrômetro de UV/VIS. Os resultados estão mostrados na tabela seguinte.

| Parâmetros | Valor |
|-------------------|-------|
| Valor L de Hunter | 27,86 |
| Valor a de Hunter | 10,21 |
| Valor b de Hunter | 2,26 |

| | |
|------------------------------|---------|
| Comprimento de onda (max,nm) | 550,09 |
| Absorção (max) | 0,67314 |

EXEMPLO 5

[0048] Três gramas de extrato rico em genipina feito pelo método no Exemplo 2 foram dissolvidos em 23,5g de 10% de solução de etanol. 3,78 g de 1,0 N de solução de KOH foram acrescentados à mistura acima e a genipina foi hidrolisada com agitação em temperatura ambiente (22°C) por 8,0 horas. O pH da solução hidrolisada foi ajustado para menos que 4,0 com ácido tartárico. A solução foi aquecida para 74°C durante 15 minutos e esfriada. O precipitado foi removido através de filtração em papel de filtro #2. Em seguida, o pH do filtrado foi ajustado para -7,0 usando carbonato de cálcio e a pasta foi misturada durante 15 minutos. O precipitado resultante foi filtrado e o pH do filtrado foi ajustado para 4,0-4,5 pela adição de ácido acético. Após a alanina (1,20g) ser adicionada, a cor vermelha da genipina foi desenvolvida aquecendo a 84°C por 2 horas. A cor foi analisada tirando 0,50 g de cor vermelha de genipina e diluindo a 30,0 g com água DI. Valores de L, a e b foram medidos em um espectrômetro de Hunter Lab, e a curva de absorção medida em um espectrômetro de UV/VIS. Os resultados estão mostrados na tabela seguinte.

| Parâmetros | Valor |
|------------------------------|---------|
| Valor L de Hunter | 27,42 |
| Valor a de Hunter | 9,46 |
| Valor b de Hunter | 2,32 |
| Comprimento de onda (max,nm) | 549,97 |
| Absorção (max) | 0,94423 |

EXEMPLO 6

[0049] Um grama e meio de extrato rico em genipina feito pelo método no Exemplo 2 foi dissolvido em 11,8 g de 10% de solução de

etanol. 1,97 g de 1,0 N de solução de KOH foi adicionado à mistura acima e a genipina foi hidrolisada com agitação em temperatura ambiente (22°C) por 8,0 horas. O pH da solução hidrolisada foi ajustado para menos que 4,0 com ácido tartárico. A solução foi aquecida a 74°C durante 15 minutos e esfriada. O precipitado foi removido por meio de filtração através de papel de filtro #2. Em seguida, o pH do filtrado foi ajustado para -7,0 usando carbonato de cálcio e a pasta foi misturada durante 15 minutos. O precipitado resultante foi filtrado e o pH de filtrado foi ajustado para 4,0-4,5 pela adição de ácido acético. Após alanina (0,60 g), taurina (0,60g), e cloreto de magnésio (0,4486g) serem adicionados, uma cor marrom-preta escura foi desenvolvida aquecendo a 84°C por 2 horas. A cor foi analisada tirando 1,0 g de cor de genipina e diluindo a 30,0 g com água DI. Valores L, a e b foram medidos em um espectrômetro de Hunter Lab, e a curva de absorção medida em um espectrômetro de UV/VIS. Os resultados estão mostrados na tabela seguinte.

| Parâmetros | Valor |
|----------------------------------|---------|
| Valor L de Hunter | 24,73 |
| Valor a de Hunter | 0,29 |
| Valor b de Hunter | 0,85 |
| Comprimento de onda (max,nm) | 542,83 |
| Absorção (max) | 0,0170 |
| Comprimento de onda (2º pico,nm) | 595,06 |
| Absorção (2º pico) | 0,88795 |

EXEMPLO 7

[0050] 0,108 g de extrato rico em genipina, feito pelo método no Exemplo 2, foi disperso em 8,6 g de 8% de solução aquosa de etanol em um tubo de teste. Os sólidos foram completamente dissolvidos aquecendo em um banho de água a ~50°C. Depois, alíquotas de 1,0 ml da solução de genipina acima foram postas separadamente em

tubos de teste e L-treonina 0,012 g, L-isoleucina 0,014 g, ou L-histidina 0,016 g, respectivamente, foram adicionadas. Todos os tubos de teste foram aquecidos em um banho de água a 80°C por 2 horas. A cor foi analisada tirando 0,30 g de cor de genipina produzida e diluindo a 30,0 g com água DI. Valores L, a e b foram medidos em um espectrômetro de Hunter Lab, e a curva de absorção medida em um espectrômetro de UV/VIS. Os resultados estão mostrados na tabela seguinte.

| Parâmetros | L-Treonina | L-isoleucina | L-histidina |
|------------------------------|------------|--------------|-------------|
| Diluição (g/ml) | 0,50/100 | 0,30/100 | 0,10/100 |
| Cor | Verde | Verde | Azul |
| Valor L de Hunter | 79,12 | 87,41 | 71,13 |
| Valor a de Hunter | -5,91 | -3,42 | -7,82 |
| Valor b de Hunter | -2,42 | -0,77 | -17,46 |
| Comprimento de onda (max,nm) | 596,32 | 600,12 | 592,2 |
| Absorção (max) | 0,11914 | 0,06746 | 0,2537 |

EXEMPLO 8

[0051] 0,37 g de extrato rico em genipina, feito pelo método no Exemplo 2, foi disperso em 34,63 g de 10% de solução aquosa de etanol em um béquer. Alanina 0,7 g, e xilose, 1,4 g, foram adicionadas e dissolvidas. A amostra aquecida a 92°C por 1 hora. Após esfriar, a cor foi analisada tirando 1,50 g da solução colorida e diluindo a 30,0 g com água DI. A cor foi observada ser laranja-vermelho em contraste com a cor vermelha observada quando a alanina foi misturada sozinha com o extrato rico em genipina. Valores L, a e b foram medidos em um espectrômetro de Hunter Lab, e a curva de absorção medida em um espectrômetro de UV/VIS. Os resultados estão mostrados na tabela seguinte.

| Parâmetros | L-Alanina e Xilose |
|------------|--------------------|
| Cor | Laranja-Vermelha |

| | |
|-------------------|-------|
| Valor L de Hunter | 25,12 |
| Valor a de Hunter | 2,48 |
| Valor b de Hunter | -0,22 |

REIVINDICAÇÕES

1. Método para preparar corantes vermelhos a partir de um material rico em genipina do fruto de *Genipa Americana*, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas:

(a) fornecer suco ou extrato de frutas de uma planta da *Genipa Americana*, que contém genipina suficiente ou derivados de genipina capazes de formar a aglicona genipina;

(b) extrair a genipina/derivados de genipina da fruta usando um solvente selecionado a partir de água, um solvente polar e misturas dos mesmos;

(c) ajustar o pH da etapa (b) extração para formar a aglicona genipina; usando ácidos;

(d) extrair a aglicona genipina da mistura da etapa (c) usando um solvente não polar;

(e) processar o extrato da etapa (d) para formar um material que contém pelo menos cerca de 70% de genipina usando pelo menos uma mistura e remoção de solvente, obtendo assim um material rico em genipina; e

(f) misturar o material rico em genipina obtido na etapa (e) após hidrólise sob condições alcalinas com um aminoácido, na presença de um ácido orgânico e sob condições anaeróbicas.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a genipina/derivados de genipina é selecionado a partir de genipina, genipina-gentiobiosídeo, geniposídeo, ácido geniposídico, gardenosídeo e misturas dos mesmos.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o solvente não polar é selecionado a partir de acetato de etila, acetato de butila, n-butanol, éter dietílico, hexano, 2-butanona, clorofórmio, 1,2-dicloroetano, benzeno, xileno, metil- éter t-butílico,

tolueno, tetracloreto de carbono, tricloroetileno, ciclo-hexano, pentano, heptanos e misturas dos mesmos.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a fonte de genipina é selecionada a partir de frutas inteiras, suco de frutas, purê de frutas, concentrado de suco de frutas, formas de frutas secas em pó ou suco, partes de frutas insolúveis em água e misturas dos mesmos, das frutas de Huito, *Genipa Americana* ou variedades das mesmas.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o aminoácido é selecionado a partir de alanina, arginina, lisina, ácido glutâmico e misturas dos mesmos.

FIG. 1

