www.saber.ula.ve/avancesenquimica
Avances en Química, 9(2), 75-86 (2014)
Artículo científico

Obtención de Genipina a partir de frutos de caruto (*Genipa americana* L.) del llano venezolano

Cristóbal Lárez Velásquez[1], Andrea Rivas[1], Iris Santos Ocanto[2]

1) Grupo de Polímeros, Departamento de Química, Facultad de Ciencias. Mérida 5101, Venezuela.

2) Laboratorio de Orgánica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias. Mérida 5101, Venezuela.

(*) clarez@ula.ve

Recibido: 17/07/2014 **Revisado**: 19/08/2014 **Aceptado**: 27/08/2014
https://doi.org/10.53766/AVANQUIM/2014.09.02.02

Resumen

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos durante el estudio de los frutos de *Genipa americana* L. procedentes de una región del llano venezolano con la finalidad de extraer, caracterizar y cuantificar su contenido del iridoide conocido como genipina. Se logró establecer un procedimiento sencillo para la obtención del compuesto buscado partiendo de los frutos verdes y su maceración en $CHCl_3$ aunque el rendimiento obtenido fue bajo (0,030 ± 0,005 %, respecto a la masa inicial de fruto empleada); sin embargo, los mismos frutos conservados bajo refrigeración por 41 días produjeron un mejor rendimiento (0,44 ± 0,06 %). El sólido obtenido fue caracterizado por su punto de fusión, rotación específica, espectroscopia de FTIR y RMN (1H-RMN y 13C-RMN uni y bidimensional) y preparación del derivado mono 10-(3,5-dinitrobenzoato) de genipina (monoéster del hidroxilo primario en la genipina).

Palabras claves: *Genipa americana*; caracterización de genipina; 10-(3,5-dinitrobenzoato) de genipina; iridoides; mutarrotación

Abstract

Obtaining of genipin from caruto fruits (*Genipa merican* L.) of the Venezuelan plains Results obtained during the study of *American Genipa* L. fruits from the Venezuelan plains region in order to extract, characterize and quantify its content on the iridoid known as genipin are presented. It was possible to outline a simple procedure for obtaining the intended compound starting from the green fruits and maceration in $CHCl_3$ although the yield was low (0.030 ± 0.005 % with respect to the initial mass of fruit); however, the same fruits stored under refrigeration for 41 days produced a higher yield (0.44 ± 0.06 %). The solid obtained was characterized by its melting point, specific rotation, FTIR and NMR spectroscopy (1H-NMR and 13C-NMR, uni- and bidimensional) and preparation of the mono 10-genipin mono (3,5-dinitrobenzoate) derivative (monoéster of the primary hydroxyl group in genipin).

Keywords: *Genipa americana*; Genipin characterization; 10-Genipin mono (3,5-dinitrobenzoate); Iridoids; Mutarotation

Introducción

La primera referencia al colorante violeta oscuro que se produce a partir del jugo del fruto del árbol de *Genipa american* L., conocido por los nombres comunes de huito, jagua, caruto, tapaculo, etc.(español), genipa (inglés), bois de fer (francés) y genipapo (portugués), parece ser la de Oviedo[1] en el año 1.535 quien, entre otras cosas, dejó escrito "… *Cuando los Indios de Tierra-Firme se preparan para la batalla pintan sus cuerpos con Xagua y con Bixa, el cual es un colorante rojo. Y las mujeres Indias también cuando ellas quieren lucir bien adornadas con uno o ambos colores; pero a mis ojos ellas lucen un poco mejor que demonios cuando se adornan así*". Posteriormente, Standley[2] en 1.926 indica que el copioso jugo de los frutos "*colorea cada cosa que éste toca de marrón-violeta o negro-violeta*". Un poco más adelante, en 1.960, Djerassi y colaboradores reportaron la separación y elucidación de la estructura del principio "activo" de dicho colorante a partir de los frutos maduros de *Genipa americana* L., llamándolo por ello genipina (genipin en inglés)[3]. Por otro lado, en 1.969 Inouye y colaboradores aislaron y caracterizaron la genipina a partir de los frutos de *Gardenia jaisminoides* Ellis f. *grandiflora* (Lou R.) Makino (Rubiaceae)[4], constituyéndose éstos en la fuente de prácticamente todo el producto ofertado comercialmente en la actualidad.

Debido a su origen natural, y especialmente debido al uso ancestral de los frutos de *Genipa americana* y *Gardenia jasminoides*, la genipina ha sido estudiada desde diversas perspectivas, incluyendo la formulación de pigmentos de diversos colores (amarillos, azules, rojos, etc.) para la

industria alimentaria[5] y de cosméticos decorativos[6], como entrecruzante atóxico para la formulación de hidrogeles basados en biopolímeros con grupos amina[7], para la preparación de bioadhesivos usados en el tratamiento heridas[8] y como soporte basados en proteínas para la regeneración de nervios[9], como reactivo forense para el levantamiento de huellas dactilares latentes en productos de papel[10], etc. De la misma manera, muy recientemente se ha comenzado a vislumbrar también su potencial aplicación en el tratamiento de enfermedades hepáticas[11], entre ellas la diabetes tipo II[12].

El objetivo del presente trabajo es explorar la posibilidad de obtener este iridoide a partir de los frutos de *Genipa americana* L. procedentes de la región llanera de Venezuela. Igualmente, caracterizar y cuantificar su contenido en dichos frutos, así como proponer un proceso sencillo y económico para su obtención.

Parte experimental

Material vegetal

Los frutos de *Genipa americana* L. fueron colectados el 19 de marzo de 2.013 en la Parroquia Dominga Ortíz de Páez, Sector "El Pagüey", Municipio Barinas del Estado Barinas-Venezuela. Latitud: 8.42162, Longitud: -70.4208 (tomado de http://mapasamerica.dices.net/venezuela/mapa.php?nombre=Paguey&id=24726). El material vegetal fue identificado como *Genipa americana* L. por la profesora Susana Rodríguez, adscrita a la asignatura Botánica Sistemática, mediante comparación con la especie voucher depositada en el Herbario MER "Carlos Liscano" perteneciente a la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela, y codificada con los siguientes datos: N° de herbario: 24.746; colector: Prof. Luis Ruíz Terán; N° de colección: 4007; lugar de colección: estado Barinas-Venezuela, alrededores de la población de Barinitas, distrito Bolívar; Altitud: 500 m.

Reactivos y solventes

Los reactivos y solventes se utilizaron tal como son recibidos del proveedor: cloroformo (Fisher Scientific), acetona (99,5 %; Sigma-Aldrich), diclorometano (99,9 %; Fischer Scientific), acetato de etilo (99,5 %; ZQE), n-hexano (96, 0%; Merck), ciclo hexano (100 %; J.T.Baker).

Métodos instrumentales

Los espectros de infrarrojo fueron obtenidos en un equipo de IR-TF (Perkin-Elmer RX1, Modelo 1605) preparando las muestras como pastillas de KBr. Los análisis de espectroscopia de RMN se hicieron en un aparato Bruker, Modelo Advance DRX-500). Por su parte, los estudios de espectroscopia de UV-visible se realizaron en un equipo Shimadzu, Modelo UVmini 1240. Para los estudios de difracción de rayos X (polvo) se usó un difractómetro Philips PW1250 que utiliza una geometría Bragg-Brentano en modo de barrido θ:θ y radiación de CuKα (longitud de onda, λ= 1,54056 Å), mientras que la rotación óptica se midió en un equipo Autopol™ III.

Procedimientos

Estudios preliminares del fruto:

Pesos y dimensiones: los frutos fueron medidos previamente a su pesada (con y sin concha) para establecer sus dimensiones y masas promedio así como también las masas de las conchas.

Porcentaje de humedad: se tomó una muestra de frutos verdes (10 unidades) y maduros (3 unidades), se pelaron hasta exponer completamente la pulpa; a continuación, los frutos verdes se rallaron en forma manual empleando para ello un rallo doméstico, mientras que los maduros fueron rebanados (lo más delgado posible) con un cuchillo doméstico y se sometieron a un proceso de deshidratación en una estufa a una temperatura de 45 ^{o}C, para determinar el porcentaje de humedad.

Extracción y purificación de la genipina: se seleccionaron frutos verdes que fueron pesados, después de lo cual se les retiró la concha manualmente empleando un cuchillo doméstico; seguidamente se prepararon porciones similares en peso de los frutos (de aproximadamente 100 g c/u, por triplicado); los frutos se rallaron manualmente y se introdujeron en frascos de vidrio que contenían 100 ó 200 mL de $CHCl_3$, el sólido se maceró durante 3 horas a temperatura ambiente con agitación manual continua cada 10 min. Los extractos clorofórmicos resultantes fueron filtrados por gravedad y el solvente fue removido por destilación a presión reducida en un rotaevaporador (LABOROTA 4003). A los aceites resultantes de la remoción de solvente, de color amarillento, se les añade unas pocas gotas de acetona para inducir la precipitación de la genipina, luego de lo cual se añade n–hexano para disolver el aceite remanente y se filtra al vacío el sólido resultante, lavándolo varias veces con n-hexano. Para confirmar la separación del compuesto se usó cromatografía de capa fina (sobre placas de aluminio revestidas de sílica gel 60 F_{254} (Merck) empleando una mezcla $CHCl_3$:AcEt (7:3) como fase móvil; las placas fueron reveladas con una lámpara de UV marca Vacuubrand 9787 y posteriormente en una cámara de yodo). El producto sólido blanco verdoso obtenido en la parte anterior fue purificado por recristalización en CH_2Cl_2.

Caracterización de la genipina:

Punto de fusión: se determinó en un aparato Fisher-Johns dotado de plancha con intervalo de calentamiento entre 20-300 °C.

Rotación óptica específica: el valor se obtuvo como promedio de 5 medidas a una solución metanólica $6{,}45 \times 10^{-3}$ M de la genipina obtenida.

Espectros unidimensionales y bidimensionales de RMN: se utilizó $CDCl_3$ como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

Difracción de rayos-X de muestra policristalina: el estudio se realizó a temperatura ambiente de 25 °C (298 K) en el rango de medida de 5-50 ° en 2θ, cada 0,02 °, con un tiempo de 10 s por paso. La calibración del equipo se realizó con un estándar externo de silicio (Si).

Preparación del derivado éster 3,5-dinitrobenzoato de genipina: en un balón fondo redondo de 25 mL se mezclaron 2,0376 g (8,8 mmoles) de cloruro de 3,5-dinitrobenzoílo (pureza aproximada de 50 %) con 0,4968 g (2,2 mmoles) de genipina en 3 mL de tetrahidrofurano (THF), la mezcla de reacción se calentó suavemente sobre un baño de agua a 60 °C durante 30 minutos con agitación constante. Después de evaporar el THF, se añadieron 3 mL de agua destilada y la solución se enfrió en un baño de hielo, lo que permitió la separación de un aceite. La fase acuosa se lavó 3 veces con 5 mL de éter etílico empleando para ello un embudo de extracción. Seguidamente la fase orgánica se lavó 3 veces con 5 mL de solución de carbonato de sodio al 2 %, luego la misma se secó con sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó, obteniéndose un aceite, el cual precipita cuando se adicionan unas gotas de metanol. El producto sólido obtenido fue purificado por recristalización en metanol caliente obteniéndose cristales de color amarillo pálido.

Discusión de resultados

Estudios preliminares del fruto

Debido a que la información sobre las principales características de los frutos de esta planta en Venezuela es escasa se presentan en la tabla 1 los resultados obtenidos durante la determinación de las dimensiones y masas promedio de los frutos de caruto utilizados en este estudio. Igualmente se determinó el porcentaje de humedad en los frutos mediante la realización de curvas de secado registrando la pérdida de peso de la muestra durante el proceso de deshidratación hasta completar las 103 horas en el caso de los frutos verdes y 84 horas para los frutos maduros. Los pesos obtenidos se convierten en términos de humedad empleando la ecuación 1.

$$X_t = (W - W_{ss})/W_{ss} \qquad (1)$$

donde W es el peso del sólido húmedo inicial (kg totales de agua más sólido), W_{ss} es el peso del sólido seco al tiempo t (kg sólido seco), y X_t es la relación entre el peso del agua y el peso del sólido seco a ese tiempo (kg de agua/kg de sólido seco)[13]. La masa de agua contenida en el fruto (m_{agua}), expresada en forma de porcentaje (%H), se calcula mediante la ecuación 2[14]:

$$\%H = 100.(W - W_f)/W \qquad (2)$$

donde W_f es el peso de la fruta seca al obtenerse valores constantes durante el proceso de deshidratación. En la tabla 2 se pueden apreciar los resultados obtenidos con los frutos estudiados, pudiéndose apreciar que los frutos verdes contienen, en promedio, un porcentaje ligeramente mayor (72 %) que los maduros (67 %).

Tabla 1: Dimensiones y masas promedios de los frutos de caruto (*Genipa americana* L.) utilizados en el proceso de deshidratación.

Fruto	N°	Ancho ± 0,05 (mm)	Largo ± 0,05 (mm)	Masa ± 0,0001 (g)		% de concha
				Fruto con concha	Concha	
Verdes	1	54,60	54,00	78,8311	15,1277	19,1900
	2	55,75	57,30	91,6773	16,9691	18,5096
	3	57,35	57,10	90,7002	15,9413	17,5758
	4	54,05	57,50	84,0848	15,2298	18,1124
	5	55,90	54,20	84,5792	14,7319	17,4179
	6	55,40	61,95	92,8140	15,6423	16,8534
	7	52,45	59,70	80,1420	14,2332	17,7600
	8	55,55	56,60	83,2720	15,2611	18,3268
	9	55,05	58,90	86,2179	15,1771	17,6032
	10	57,55	53,90	83,7728	14,7857	17,6498
	$\bar{X} \pm \Delta X$	**55 ± 2**	**57 ± 3**	**86 ± 5**	**15,3 ± 0,8**	**17,7 ± 0,6**
Maduros	1	54,10	57,50	86,4265	20,7789	24,0423
	2	55,35	54,20	81,1436	19,9520	24,5885
	3	54,40	53,90	76,7309	18,1271	23,6243
	$\bar{X} \pm \Delta X$	**55 ± 1**	**55 ± 2**	**81 ± 5**	**20 ± 1**	**24,1 ± 0,5**

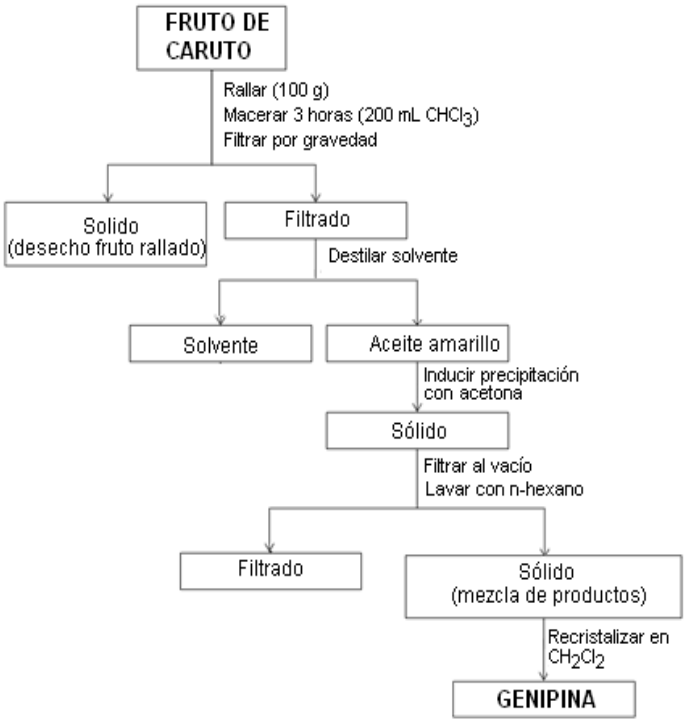
Tabla 2: Resultados obtenidos para el % de humedad en los frutos de *Genipa americana* L. luego de realizar el proceso de deshidratación.

Fruto	N°	Masa ± 0,0001 (g)			% de humedad en los frutos ± 0,0002
		Inicial de fruto	Final de fruto	Total de agua perdida	
Verde	1	61,0444	18,0625	42,9819	70,4109
	2	72,0936	20,0908	52,0028	72,1323
	3	72,0265	20,9993	51,0272	70,8450
	4	66,1116	16,7254	49,3862	74,7013
	5	67,6232	18,9301	48,6931	72,0065
	6	74,2083	19,9332	54,2751	73,1389
	7	64,0270	16,9640	47,0630	73,5049
	8	66,7344	19,9915	46,7429	70,0432
	9	68,1654	18,3149	49,8505	73,1317
	10	66,9644	18,1144	48,8500	72,9492
	$\bar{X} \pm \Delta X$	**68 ± 4**	**19 ± 1**	**49 ± 3**	**72 ± 1**
Maduro	1	65,1333	22,1733	42,9600	66,0051
	2	60,6550	19,2155	41,4742	68,3772
	3	57,6810	19,2861	38,4141	66,5975
	$\bar{X} \pm \Delta X$	**61 ± 4**	**20 ± 2**	**41 ± 2**	**67 ± 1**

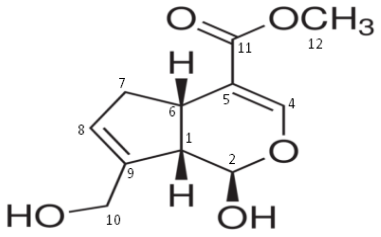
Extracción y purificación de la genipina

Luego de ensayar algunos de los métodos propuestos en la literatura se decidió modificar el método de extracción propuesto por Endo y Taguchi[15] por las siguientes razones: (a) al realizar la maceración del fruto verde rallado en $CHCl_3$ (para remover las grasas y aceites) a la solución resultante se le evaporó el solvente y se obtuvo un aceite amarillento, el cual mostró las bandas de absorción de los principales grupos funcionales contenidos en la estructura de la genipina; (b) el fruto verde rallado resultante del tratamiento previo con $CHCl_3$ fue extraído con metanol para obtener, según Endo y Taguchi[15], el genipósido; sin embargo, cuando se evaporó el solvente se obtuvo un sólido gris azulado que fue lavado haciéndole pasar 20 mL de metanol en un embudo de Büchner sometido al vacío; luego de este proceso el sólido no mostró bandas características de genipina y/o genipósido en su espectro infrarrojo, descartándose por ello que el compuesto de interés estuviese presente en él. Ahora, debido a que la referencia mencionada indica que el extracto metanólico debería contener el genipósido, se sospechó que éste se pudiera haber solubilizado en el lavado de MeOH realizado al producto sólido; para confirmar dicha suposición se extrajo una pequeña cantidad del lavado metanólico con una mezcla agua:acetato de etilo, se tomó una muestra de la fracción de acetato de etilo y el espectro infrarrojo mostró una banda ancha de vibración de tensión de hidroxilo (O-H) y las vibraciones de los principales grupos funcionales presentes en la estructura del genipósido, lo que llevó a presumir su presencia en el extracto. Sin embargo, fue necesario concentrar toda la muestra para lograr un espectro infrarrojo de bandas definidas, infiriéndose por ello que la cantidad de genipósido allí presente era muy baja.

Por lo anteriormente expuesto, y dado que la revisión bibliográfica no mostró ningún reporte para la extracción de genipina de los frutos de *Genipa americana* L. mediante una simple extracción sólido-líquido empleando como solvente el cloroformo y que, además, en Venezuela no se han realizado trabajos de investigación que involucren alguna técnica de extracción de genipina a partir de dichos frutos (a pesar de la planta estar distribuida prácticamente en todo el territorio nacional), se plantea el esquema de la figura 1(a) como método para aislar genipina (figura 1(b))a partir de frutos verdes de *Genipa americana* L.



(a)



(b)

Fig. 1: (a) Procedimiento propuesto para el aislamiento y purificación de genipina a partir de frutos verdes de *Genipa americana* L. (b) Estructura química de la genipina (nombre IUPAC (1R,2R,6S)-2-Hidroxi-9-(hidroximetil)-3-oxabiciclo [4.3.0] nona-4,8-dieno-5-carboxilato de metilo).

El estudio del proceso de extracción se realizó empleando relaciones masa de fruto/volumen de solvente 1:1 (experiencia 1, E1) y 1:2 (experiencia 2, E2). Mediante E1 no fue posible una obtención cuantificable de genipina, pues al inducir la precipitación de ésta desde el aceite amarillo que se obtiene al evaporar el solvente del extracto clorofórmico no se observó la formación de sólido; por ello, el procedimiento de extracción se completó sólo para el extracto seco resultante de E2.

El proceso de extracción fue monitoreado mediante cromatografía en capa fina, evidenciándose la necesidad de purificar los productos obtenidos, lo cual se hizo por recristalización. En ese sentido, se seleccionó como solvente para la recristalización el diclorometano, aunque las mezclas de disolventes cloroformo:hexano (7:1) y acetato de etilo:ciclo hexano (7:1) también resultaron ser buenas para tal fin. La cromatografía de capa fina confirmó la efectividad de la purificación, obteniéndose un valor de Rf = 0,51 para el compuesto recristalizado cuando se usó la misma placa pero acetato de etilo como fase móvil.

La extracción de genipina a partir de los frutos verdes de *Genipa americana* L. mediante E2 arrojó un Rendimiento = 0,030 ± 0,005 %, respecto a la masa inicial de fruto empleada. Este rendimiento está muy por debajo de los valores de 1 % y 0,52 % reportados por Djerassi *et al.*[3] y Guilherme[16], respectivamente.

Tabla 3: Cantidades de producto crudo extraído de las diferentes relaciones masa de fruto/solvente.

Relación masa/volumen (g fruto/mL solvente)	Experiencia	Masa ± 0,0001 (g)				Rendimiento (%)
		Fruto macerado	Extracto seco	Producto crudo	Producto puro	
1:1	E1.a	119,1600	0,4510	-	-	
	E1.b	120,2306	0,4843	-	-	
	E1.c	105,7114	0,4404	-	-	
	$\bar{X} \pm \Delta X$	**115 ± 8**	**0,46 ± 0,02**	**-**	**-**	**-**
1:2	E2.a	99,3748	0,4373	0,1170	0,0311	0,0313
	E2.b	102,8386	0,4915	0,2575	0,0255	0,0248
	E2.c	102,9317	0,4891	0,1991	0,0358	0,0348
	$\bar{X} \pm \Delta X$	**102 ± 2**	**0,47 ± 0,03**	**0,19 ± 0,07**	**0,031 ± 0,005**	**0,030 ± 0,005**
1:2*	E2.a*	105,0466	1,0645	0,7317	0,4227	0,4023
	E2.b*	90,1963	0,9198	0,7205	0,4545	0,5039
	E2.c*	74,2858	0,8258	0,5992	0,3074	0,4138
	$\bar{X} \pm \Delta X$	**90 ± 15**	**0,9 ± 0,1**	**0,68 ± 0,07**	**0,39 ± 0,08**	**0,44 ± 0,06**

* Usando frutos almacenados en un congelador (T < 0 °C) por 41 días después de colectados.

Posteriormente, 41 días después de colectados los frutos, se realizó una experiencia adicional con éstos. En este caso, los frutos fueron conservados en un refrigerador doméstico a una temperatura menor a 0 °C y se repitió el mismo procedimiento de extracción (experiencia 2*, E2*), obteniéndose un Rendimiento = 0,44 ± 0,06 %, el cual es casi 15 veces mayor al resultado en E2. Este último resultado no es fácil de explicar pues son muchos los factores a tomar en cuenta para poder lograr una explicación razonable, incluyendo las reacciones químicas que pueden ocurrir dentro del fruto y que se evidenciaron en su cambio de color durante dicho periodo, ya que en la primera extracción los frutos eran de color blanco verdoso mientras que después de 41 días guardados en el refrigerador se tornaron de color azul. Lamentablemente al tratarse de un fruto estacional se deberá esperar a una nueva temporada para confirmar estos resultados comparativos entre frutos verdes recién colectados y los mismos frutos conservados en el refrigerador durante 41 días.

Caracterización de la genipina

En la figura 2 se muestra el espectro de FTIR obtenido para el sólido recristalizado obtenido en el proceso de extracción y purificación descrito previamente, siendo éste muy similar a otros espectros reportados para la genipina obtenida de los frutos de la *Gardenia jasminoide* Ellis[17,18] y de la *Genipa americana*[16].

Por su parte, en la figura 3 se muestra el patrón de difracción en polvo de la genipina obtenida en el presente trabajo. Al compararlo con los dos únicos patrones de difracción que se tienen para este compuesto en la base de datos de Cambridge[19] se puede apreciar que éste coincide perfectamente con el patrón generado por una de las formas polimórficas (polimofo I) reportada por Trevor *et al.*[20] para el isómero configuracional 1S,2R,6S (ó 1R,2S,6R), el cual ha sido propuesto como el más estable de los posibles isómeros de la genipina relacionados a las configuraciones de sus tres centros quirales[21].

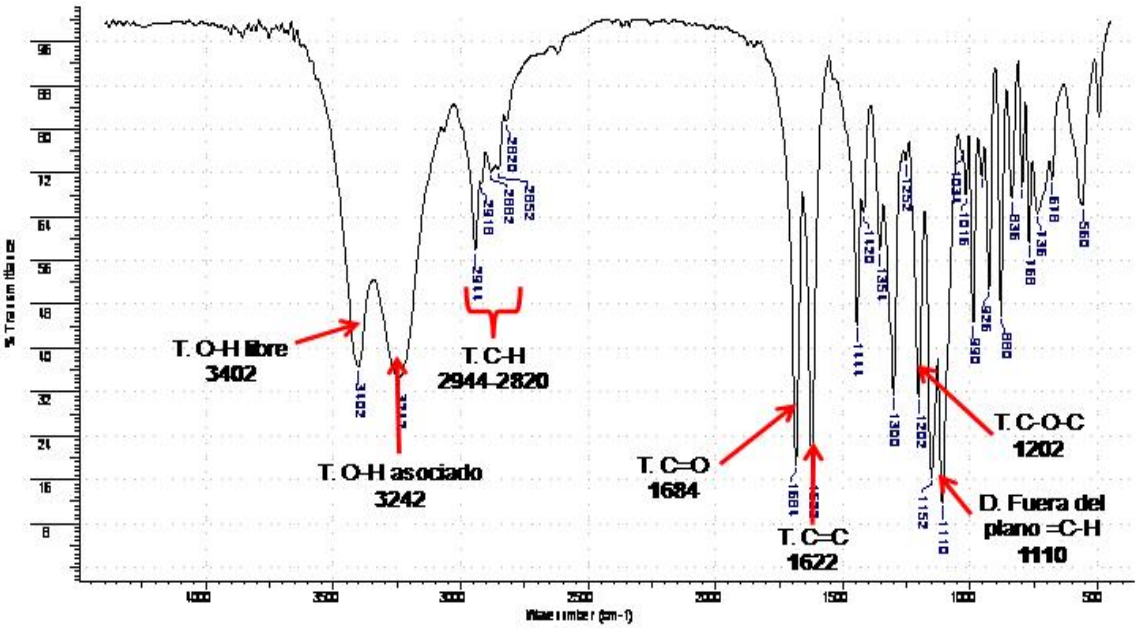


Fig. 2: Espectro infrarrojo del producto extraído de los frutos verdes de *Genipa americana* L. en pastilla de KBr. T = tensión, D = deformación ó flexión.

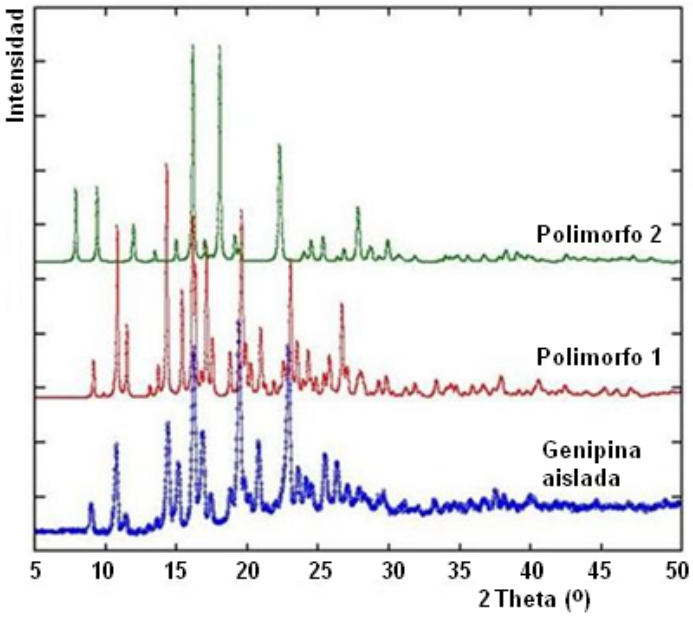


Fig. 3: Comparación del patrón de difracción de polvo experimental de la genipina aislada en este estudio con los patrones de los dos polimorfos reportados en la literatura para el isómero configuracional 1S,2R,6S (ó 1R,2S,6R)[20].

A pesar de la perfecta coincidencia del espectro de FTIR y del patrón de difracción de polvo del material aislado con los reportados, existen diferencias en algunas propiedades como el punto de fusión (medido = 117-118 ºC, reportado = 119-120,5 ºC) y la rotación específica $[\alpha]_D^{20}$ (medida = 154 ± 4º, reportada = 136,5º; solvente metanol)[15]. Tales diferencias pudieran ser debidas a la presencia de impurezas en el caso del punto de fusión o al uso de un equipo con una apreciación muy alta para la determinación del valor de la rotación específica; por ello, se ha realizado una caracterización más exhaustiva del material obtenido. En ese sentido, se realizaron estudios espectroscópicos de ^{1}H-RMN y ^{13}C-RMN, tanto unidimensionales como bidimensionales, y la preparación del derivado 3,5-dinitro-benzoato de la genipina.

Estudios de resonancia magnética nuclear de la genipina obtenida: la figura 4 muestra el espectro de ^{1}H-RMN para la genipina recristalizada, el cual se obtuvo usando $CDCl_3$ como solvente. La primera característica notable de éste son las réplicas de menor tamaño de prácticamente todas las señales que aparecen en el espectro (alrededor de 20 % de la señal grande), mostrándose también las asignaciones realizadas para las señales de mayor intensidad. Esta característica del espectro, observada también en los espectros de ^{1}H-RMN (solvente CD_3OD) de la genipina obtenida de frutos de *Genipa americana* L. en Brasil[16] pero con réplicas de menor intensidad, apunta directamente a la presencia de dos isómeros configuracionales del compuesto en la solución de $CDCl_3$, lo que parece contradecir los resultados del patrón de difracción mostrado en la parte anterior. Sin embargo, la ocurrencia de la reacción de mutarrotación parcial del isómero 1S,2R,6S (ó 1R,2S,6R) al isómero 1S,2S,6S (ó 1R,2R,6R) luego de su disolución en $CDCl_3$, la cual puede ser catalizada por trazas de HCl en este solvente, como ha sido propuesto recientemente[21]. Esta pudiera ser una explicación perfectamente válida para la aparición de tales réplicas cuando se parte de un compuesto que inicialmente no es una mezcla de estos dos isómeros.

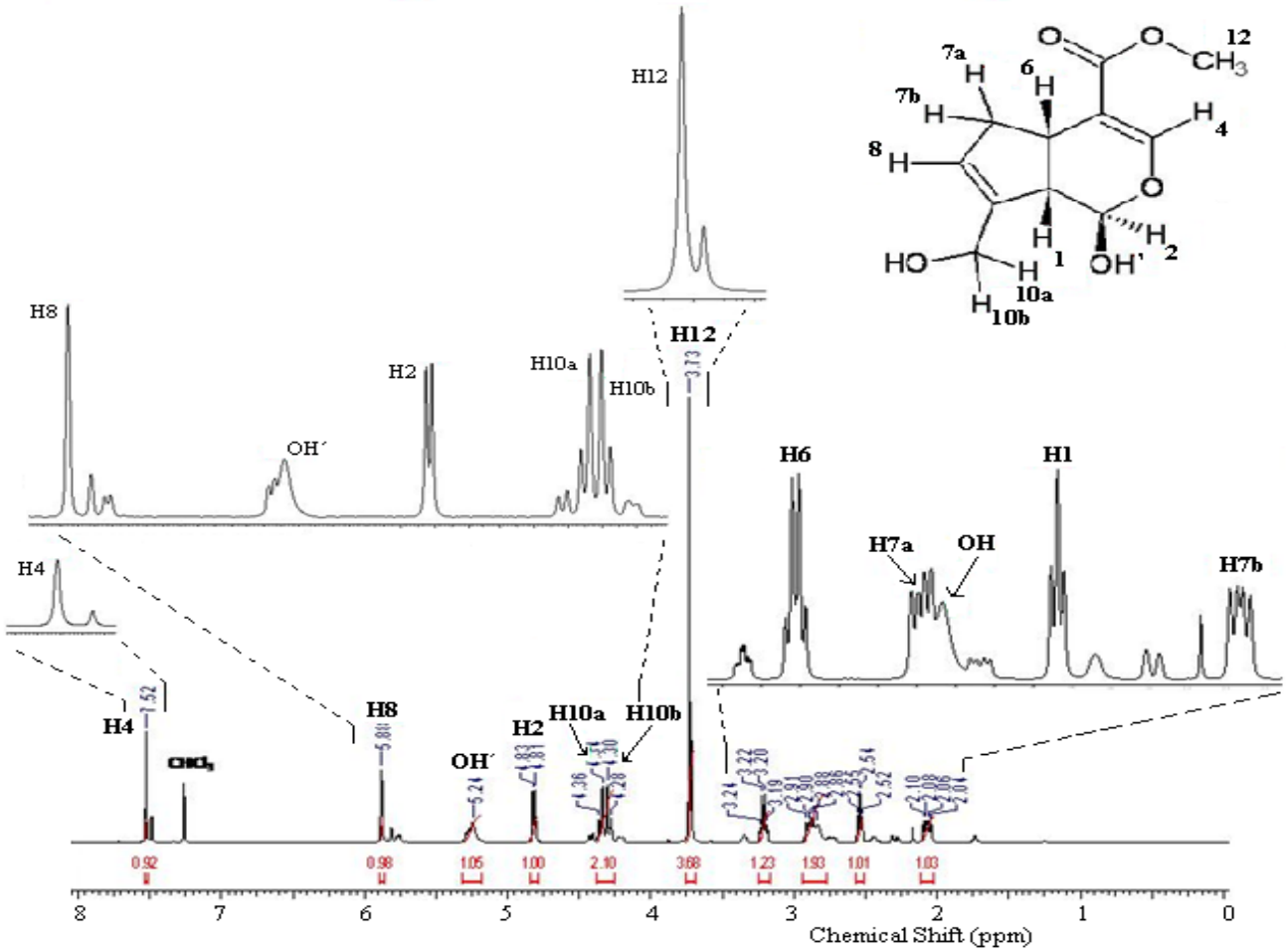


Fig. 4: Espectro de ^{1}H-RMN para la genipina obtenida (recristalizada en CH_2Cl_2). Solvente: $CDCl_3$.

Por su parte, en la figura 5 se muestran los espectros de ^{13}C-RMN y DEPT-135 obtenidos para la genipina recristalizada, los cuales fueron tomados en $CDCl_3$ como solvente. El espectro de ^{13}C-RMN muestra las señales correspondientes a los once carbonos magnéticamente diferentes presentes en la molécula. Así, la señal a δ = 167,88 ppm es asignada al C11; en la zona correspondiente a carbonos sp^2 se ubican cuatro señales: la señal a 152,44 ppm se asigna a C4 porque además de tener este átomo hibridación sp^2 se encuentra directamente unido a un heteroátomo lo que lo desapantalla aun más, la señal en 141,99 ppm corresponde a C9 por estar unido a un átomo de carbono con carácter electropositivo por encontrarse enlazado a un grupo hidroxilo que lo desapantalla, en 130,94 ppm se ubica C8 y la señal a 110,77 ppm corresponde a C5 pues este átomo se encuentra enlazado a un carbonilo conjugado. Las siguientes señales corresponden a los carbonos metínicos y se ubican entre 100 y 30 ppm: la señal en δ = 96,33 ppm se asigna a C2 debido a que este átomo está directamente enlazado a dos heteroátomos que lo desapantallan, la señal en δ= 48,25 ppm se asigna a C1 y δ = 36,69 ppm corresponde a C6, estos últimos están más apantallados que C2. Las señales de los carbonos metilénicos C10 y C7 se corresponden con las señales en δ = 61,37 y 39,03 ppm, respectivamente, mientras que el carbono metílico unido al oxígeno del grupo éster (C12) se ubica en δ = 51,31 ppm.

Las señales correspondientes a los carbonos cuaternarios (C11, C5 y C9) fueron rápidamente asignadas, dado que éstos no se observan en el espectro DEPT-135 al no tener átomos de hidrógeno enlazados a ellos. Las señales en fase negativa en el espectro DEPT-135, permitieron identificar los dos carbonos metilénicos (C7 y C10) presentes en la estructura, a C10 le corresponde la señal a campo más bajo pues este átomo se encuentra enlazado a un grupo hidroxilo y a un carbono sp^2, estando ambos desapantallados, mientras que C7 sólo está desapantallado por un carbono sp^2. Por su parte, las seis señales asociadas a los carbonos de grupos metinos y metilos, cuyos desplazamientos fueron asignados como se expuso anteriormente en el análisis del espectro ^{13}C-RMN, se observan en fase positiva.

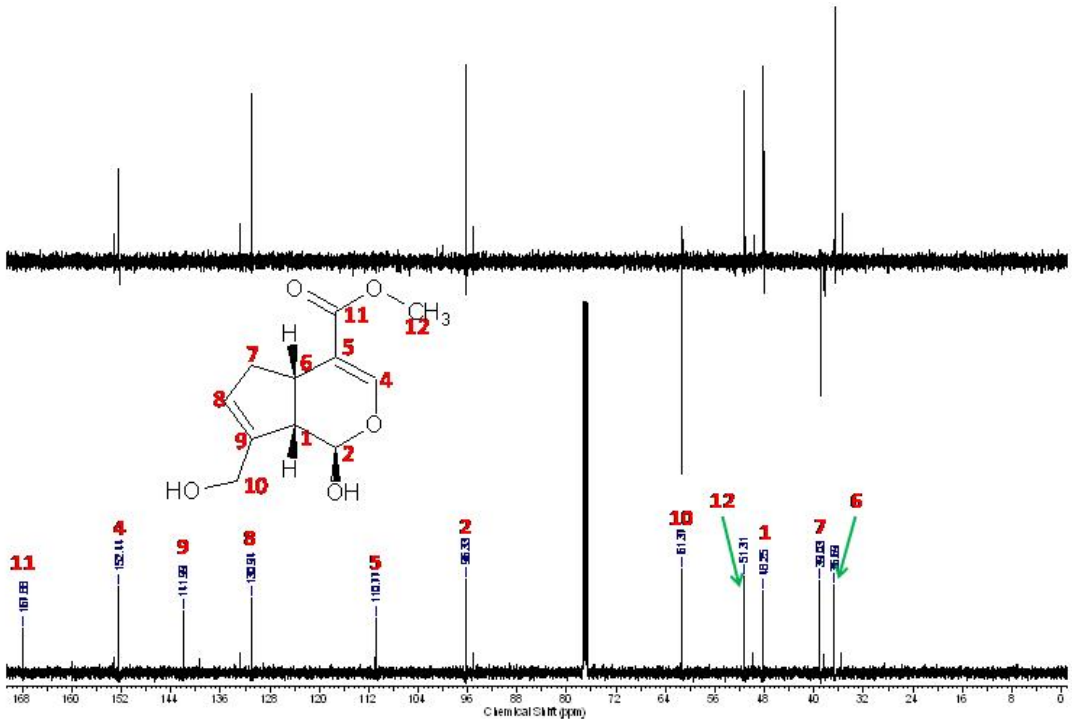
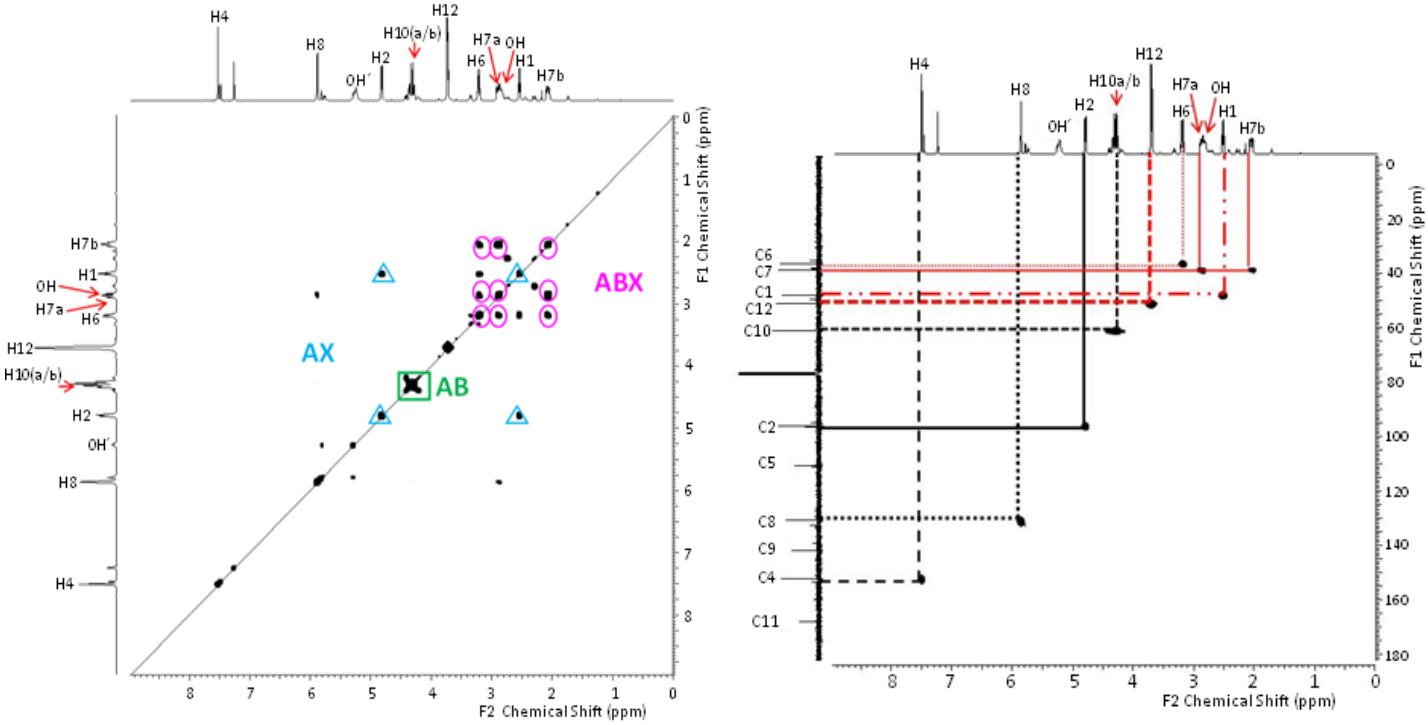


Fig. 5: Espectros de ^{13}C-RMN (inferior) y DEPT-135 (superior) de la genipina extraída. Solvente: $CDCl_3$.

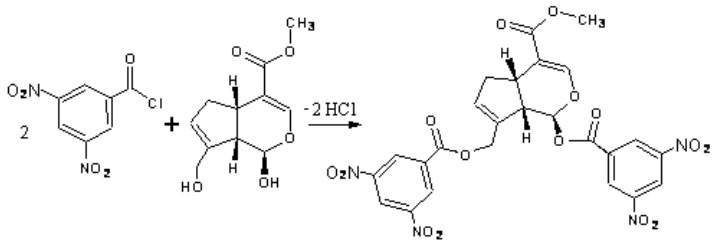
En el espectro COSY (figura 6a) se destaca el sistema ABX formado por los hidrógenos diasterotópicos H7a, H7b y el H6. También se puede observar la formación de un sistema AX entre los protones H2 y H1 además del sistema AB formado por los protones enantiotópicos H10a y H10b. Las correlaciones directas a un enlace entre los carbonos y sus respectivos hidrógenos permitieron confirmar las asignaciones realizadas (espectro HMQC, figura 6b); algunos ejemplos son el metino C1 ↔ H1, el metileno C7 ↔ H7a y H7b y el metilo C12 ↔ H12. De la misma manera, las correlaciones a varios enlaces también confirmaron estas asignaciones (espectro HMBC no mostrado).



(a) (b)

Fig. 6: Espectros bidimensionales COSY (a) y HMQC (b) para la genipina extraída. Solvente: $CDCl_3$.

Caracterización del 3,5-dinitro-benzoato de la genipina: una de las reacciones más comunes para preparar un derivado de alcohol es la formación de un éster empleando cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo[22]. La reacción de síntesis propuesta para la formación del derivado di-2,10-(3,5-dinitrobenzoato) de genipina es:



Para confirmar si se obtuvo el derivado propuesto se tomaron los espectros de ^{1}H-RMN y ^{13}C-RMN del producto de la reacción (un sólido amarillento, inodoro, que descompone a 104 ^{o}C). El espectro de ^{1}H-RMN se presenta en la figura 7 y muestra doce grupos de señales, las cuales se han asignado de la siguiente manera: dos aparecen en la zona de hidrógenos aromáticos (H18 y H16), dos en la región de hidrógenos unidos a carbonos sp^{2} (H4 y H8), cuatro en la zona de hidrógenos cuyos carbonos están unidos a heteroátomos (H10a, H10b, H2 y H12) y cuatro en la zona de hidrógenos unidos a carbonos sp^{3} que no se encuentran enlazados a átomos desapantallantes (H6, H7a, H1 y H7b).

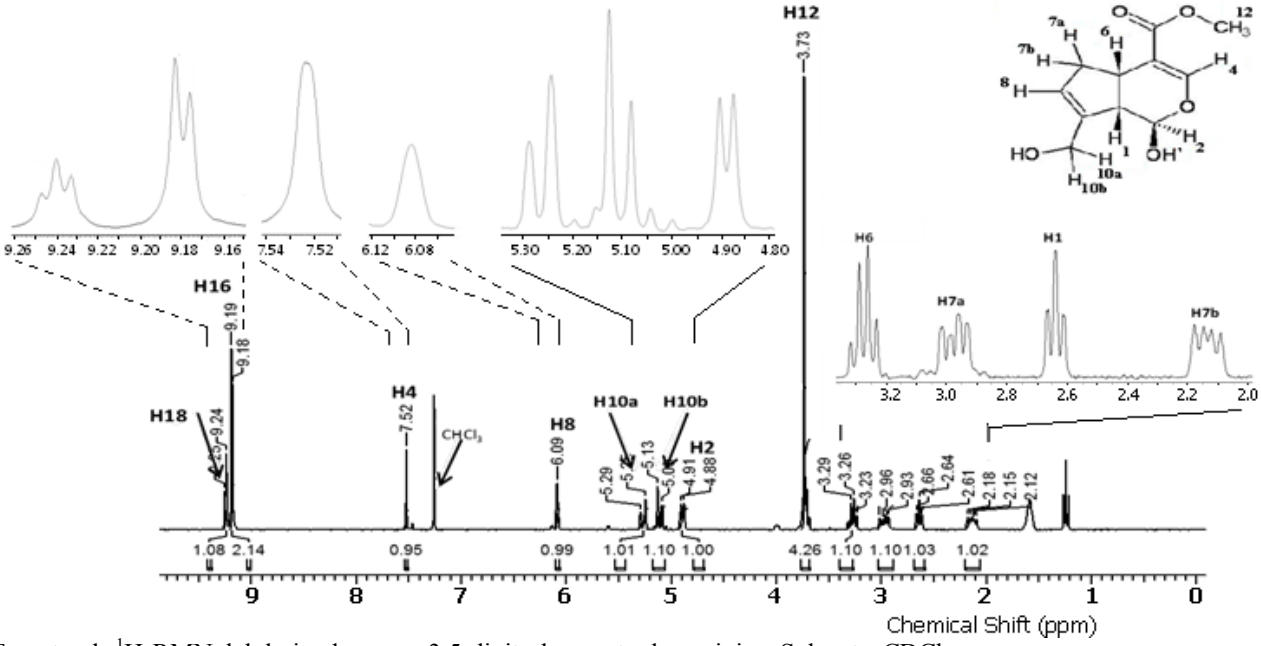


Fig. 7: Espectro de ^{1}H-RMN del derivado mono-3,5-dinitrobenzoato de genipina. Solvente: $CDCl_3$.

Tabla 4: Asignación de las señales en la estructura del derivado mono 3,5-dinitrobenzoato de genipina.

δ H (ppm)	Multiplicidad	Asignación	*J* (Hz)
9,24	Triplete	H18	$^{4}J = 2,0$
9,19	Doblete	H16	$^{4}J = 2,0$
7,52	Singulete (ancho)	H4	-
6,09	Singulete (ancho)	H8	-
5,27	Doblete	H10a	$^{2}J = 13,2$
5,11	Doblete	H10b	$^{2}J = 13,2$
4,90	Doblete	H2	$^{3}J_{21} = 8,5$
3,73	Singulete	H12	-
3,26	Doblete de doblete de doblete	H6	$^{3}J_{61} = 7,9$ $^{3}J = 8,7$
2,96	Multiplete	H7a	-
2,64	Triplete de doblete	H1	$^{3}J_{12} = 8,5$ $^{3}J_{16} = 7,9$
2,15	Multiplete	H7b	-

Las primeras dos señales en la zona aromática se asignan a H18 (9,24 ppm) y H16 (9,19 ppm) debido a que sus señales aparecen al campo más bajo en el espectro, integran para uno y dos protones y presentan patrones de acoplamiento de triplete y doblete, respectivamente; los singletes anchos con desplazamientos en δ_H=7,52 y 6,09 ppm integran cada uno para un protón y se asignan a los hidrógenos H4 y H8, respectivamente, estando enlazados a los carbonos sp^{2} de la estructura propuesta. En la zona media del espectro, se observan dos señales asignadas a los protones H10a y H10b (diasterotópicos) y cada una de ellas integra para un protón; seguidamente, en δ_H = 4,90 ppm aparece un doblete que corresponde a H2, desplazado a campo bajo por estar unido a un carbono sustituido con dos heteroátomos y presentando una constante de acoplamiento de vecinal de 8,5 Hz, la cual implica, por su magnitud, que H2 es paralelo (α = 0°) ó antiparalelo (α = 180°) al átomo con el cual acopla, es decir, H1.

La zona alifática del espectro presenta siete señales, asignándose la que aparece a campo más bajo (δ_H =3,26 ppm) a H12; luego aparece un doblete de doblete de doblete con valores de ^3J = 8,7 Hz y 7,9 Hz que se asigna al protón H6. Tal patrón de desdoblamiento se asocia a que este protón interacciona con los espines de tres protones vecinales no equivalentes (H1, H7a, H7b). Las señales de los hidrógenos diasterotópicos H7a y H7b se ubican en δ_H = 2,96 y 2,15 ppm, respectivamente; y la señal en medio de ellos corresponde a H1 cuya señal es un triplete de doblete, siendo sus constantes de acoplamiento vecinal ^3J = 8,5 Hz y 7,9 Hz, lo que indica que efectivamente se acopla con H2 en posición *trans* y con H6 formando un ángulo de 0° entre ellos, manteniendo la configuración inicial de la genipina de partida; es decir, la configuración relativa de los centros quirales C1, C6 y C2 es 1S,2R,6S ó 1R,2S,6R.

Todas las señales descritas hasta ahora corresponden a la esterificación del alcohol primario presente en la estructura de la genipina (ver estructura en ambos espectros de RMN). Las señales a δ_H = 1,23 y 1,58 ppm y la señal solapada en δ_H = 3,71 ppm, que muestran multiplicidades de triplete, singulete (ancho) y cuartete, respectivamente, se asocian a trazas de algún agente contaminante proveniente posiblemente de fuentes externas. Por ello, se puede aseverar que en la reacción ensayada solo se esterificó el grupo hidroxilo primario, generándose solo el derivado mono-3,5-dinitrobenzoato de genipina (nombre IUPAC: 2-hidroxi-9-(3,5-dinitrobenzoiloximetil)-3-oxa-biciclo [4.3.0] nona-4,8-dieno-5-carboxilato de metilo), permaneciendo inalterado el grupo O-H secundario en la posición 2 de la estructura.

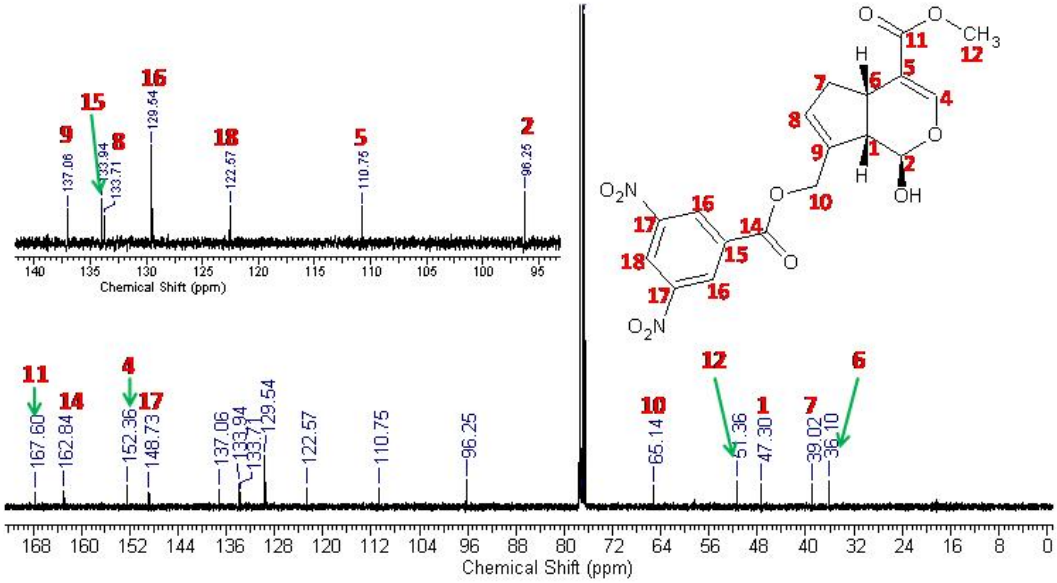


Fig. 8: Espectro de ^{13}C-RMN del monoéster 10-(3,5-dinitrobenzoato) de genipina. Solvente: $CDCl_3$.

En el espectro de ^{13}C-RMN (figura 8, tabla 5) se observaron claramente las 16 señales de átomos de carbono que se esperan para el derivado mono-10-(3,5-dinitrobenzoato) de genipina, debido a que éste compuesto contiene 16 carbonos magnéticamente diferentes al ser dos pares de carbonos del anillo aromático equivalentes (C16 y C17). A continuación se detalla el análisis realizado para la asignación de las señales.

A campo bajo (167,60 y 162,84 ppm) se ubican las señales correspondientes a los carbonilos de los ésteres, C11 y C14, respectivamente; también se aprecian cuatro señales de carbonos sp^2 en δ = 152,36; 137,06; 133,71 y 110,75 ppm, las cuales se asignan a los carbonos C4, C9, C8 y C5, en el orden mencionado. La diferencia en el desplazamiento químico de estos átomos de carbono, presentes en la estructura base de la genipina, se discutió en el análisis del espectro de ^{13}C-RMN de la genipina. La zona aromática forma parte de la región del espectro en donde se ubican los carbonos sp^2. Allí se encuentran cuatro señales que corresponden a los carbonos del anillo: la señal a 148,73 ppm se asigna a los dos C17 equivalentes, por ser el desplazamiento típico que presenta un átomo de carbono que forma parte de un anillo aromático y por estar enlazados a grupos NO_2; la absorción en 133,94 ppm se asocia al carbono C15 por estar fuertemente desapantallado por el grupo éster vecino y el anillo aromático al que pertenece (que además se encuentra sustituido por dos grupos nitro que también ejercen un efecto desapantallante). La señal a 129,54 ppm se asigna a los dos C16 equivalentes, por estar ligeramente más apantallados que C15, mientras que la señal a 122,57 ppm se asigna a C18 por ser el átomo de carbono más apantallado en el anillo. Por su parte, los carbonos metínicos se ubican en la zona del espectro entre 100 y 30 ppm: la señal en δ = 96,25 ppm se asigna a C2 por estar directamente enlazado a dos heteroátomos que lo desapantallan; las señales a 47,30 ppm y 36,10 ppm

corresponden a C1 y C6, respectivamente, debido a que están menos desapantallados que C2; las señales en 65,14 y 39,02 ppm se corresponden con los carbonos metilénicos C10 y C7, respectivamente mientras que el carbono metílico (C12) enlazado al oxígeno del grupo éster se ubica en δ = 51,36 ppm.

Tabla 5: Asignación de las señales de los carbonos presentes en la estructura del derivado 3,5-dinitrobenzoato de la genipina.

Carbono	Compuesto	
	Mono 10-(3,5-dinitrobenzoato) de genipina	**Genipina**
	δ C (ppm)	δ C (ppm)
11	167,60	167,87
14	162,84	-
4	152,36	152,43
17	148,73	-
9	137,06	141,98
15	133,94	-
8	133,71	130,93
16	129,54	-
18	122,57	-
5	110,75	110,76
2	96,25	96,32
10	65,14	61,36
12	51,36	51,31
1	47,30	48,24
7	39,02	39,03
6	36,10	36,69

Al comparar el espectro de ^{13}C-RMN con el de la genipina (tabla 4) se hace evidente que las señales de los carbonos que corresponden a la estructura base de la genipina sufren ligeras variaciones en sus desplazamientos por efecto de la sustitución del grupo hidroxilo primario por un grupo éster de mucho mayor tamaño (3,5-dinitrobenzoato). La información deducida a partir de los espectros de RMN (^{1}H y ^{13}C) indican que el derivado obtenido fue el éster monosustiuido en el hidroxilo primario. En ese sentido, es notorio que el desplazamiento químico del C2 en el espectro de ^{13}C-RMN del derivado permanece inalterado con relación al de la genipina de partida, mientras que el C10 muestra un ligero corrimiento a campo bajo.

Conclusiones

Se logró obtener la genipina a partir de frutos verdes de *Genipa americana* L. procedentes de la región llanera venezolana, con un rendimiento relativamente bajo (0,030 ± 0,005 %) en comparación a los valores hallados en la literatura, a pesar de que el proceso establecido en este trabajo resulta mucho más sencillo que los reportados. La conservación de los frutos verdes bajo refrigeración por 41 días generó un aumento sustancial en el rendimiento de la genipina (0,44 ± 0,06 %). Los estudios de optimización del tiempo de refrigeración están pendientes por tratarse de un fruto estacional.

La caracterización del compuesto mediante difracción de rayos X permitió establecer que el sólido obtenido es el isómero configuracional 1S,2R,6S (ó 1R,2S,6S) de la genipina mientras que el análisis por espectroscopia de ^{1}H-RMN apunta a que el compuesto sufre una mutarrotación parcial del carbono 2R en el solvente usado ($CDCl_3$).

Agradecimientos

Al Dr. G. Delgado, del Grupo de Cristalografía del Departamento de Química (ULA, Mérida, Venezuela), por el apoyo para el análisis de difracción de RX. Al Instituto de Investigaciones Científicas de Venezuela por el apoyo prestado para algunos de los estudios de RMN. A los doctores A. Bahsas y S. Koteich del Laboratorio de RMN del Departamento de Química y al doctor J.M. Amaro del Grupo de Productos Naturales del Depto. de Química (ULA) por su apoyo con los espectros de RMN.

Referencias

1. R Fernández de Oviedo y Valdez. *Historia natural y general de las Indias (*Libro VIII, capítulo V) Sevilla, España (1535).
2. P Stanley. Trees and Shrubs of Mexico. Contribution from the U.S. national Herbarium. Government Printing Office Washington DC. Vol. 23, pag. 1371-1373 (1926).
3. C Djerassi, J Gray, F Kincl. Naturally Occurring Oxygen Heterocyclics. IX. Isolation and Characterization of Genipin. **J. Organic Chemistry, 25(12)**, 2174-2177 (1960).
4. H Inouye, S Saito, H Taguchi, T Endo. Zwei neue iridoidglucoside aus gardenia jasminoides: gardenosid und geniposid. **Tetrahedron Letters, 10 (28)**, 2347-2350 (1969).
5. GAF Hendry, JD Houghton. Natural Food Colorants. 2nd. Ed. Chapman & Hall, London. pp 40-79, 310-341 (1996).
6. SM Tenesaca. Elaboración de cosméticos decorativos a partir de frutos verdes de Genipa americana L. Tesis de grado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador (2012).
7. M Grolik, K Szczubiałka, B Wowra, D Dobrowolski, B Orzechowska-Wylegala, E Wylegala, M Nowakowska. Hydrogel membranes based on genipin-cross-linked chitosan blends for corneal epithelium tissue engineering. **J. Mater. Sci.: Mater. Med., 23**, 1991–2000 (2012).
8. HW Sung, DM Huang, WH Chang, RN Huang, JC Hsu. Evaluation of Gelatin Hydrogel Crosslinked with Various Crosslinking Agents as Bioadhesives: In vitro Study. **J. Biomed. Mater. Res., 46**, 520-530 (1999).
9. S Hsiang, CC Tsai, FJ Tsai, TYun Ho, CH Yao, YS Chen. Novel use of biodegradable casein conduits for guided

peripheral nerve regeneration. **J. Royal Soc. Interface, 8(64)**, 1622-1634 (2011).

10. G Levinton-Shamuilov, Y Cohen, M Azoury, A Chaikovsky, J Almog. Genipin, a Novel Fingerprint reagent with Colorimetric and Fluorogenic Activity, Part II: Optimization, Scope, and Limitations. **J. Forensic Sci., 5**0, 1367-1371 (2005).

11. S Meng, J Peng, Q Feng, J Cao, Y Hu. The Role of Genipin and Geniposide in Liver Diseases: A Review. Altern. Integ. Med., 2(4), 117 (2013).

12. CY Zhang, LE Parton, CP Ye, S Krauss, R Shen, CT Lin, JA Porco, BB Lowell. Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced beta cell dysfunction in isolated pancreatic islets**. Cell Metab., 3(6)**, 417-427 (2006).

13. C Geankoplis. Transport Processes and Separation Process Principles. 4. Englewood Cliffs: Prentice Hall PTR, págs. 575-580 (2003).

14. H Zumbado. Análisis Químico de los Alimentos. Métodos Clásicos. La Habana: Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana, págs. 174-176 (2002).

15. T Endo, H Taguchi. The Constituents of *Gardenia jasminoides* Geniposide and Genipin-gentiobioside. **Chem. Pharm. Bull, 21(12)**, 2684-2688 (1973).

16. J Guilherme. Esferas de goma do cajueiro e quitosana para liberação de fármacos. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza- Brasil (2007).

17. M Fwu-Long. Characterization of Ring-Opening Polymerization of Genipin and pH- Dependent Cross-linking Reactions between Chitosan and Genipin. Buscar referencia completa

18. N Santoni, M Matos, C Müller-Karger, H Nicola, M Sabino, A Müller. Caracaterización de hidrogeles de quitosano entrecruzados covalentemente con genipina. **Rev. Iberoamer. Polím., 9(3)**, 326-330 (2008).

    Disponible en: http://www.ccdc.cam.ac.uk/Solutions/CSDSystem/Pages/CSD.aspx. Consultado: 12/12/2013

20. S Trevor, M Butler, S Adams, P Laity, J Burley, R Cameron. Structure and phase transition of genipin, an herbal medicine and naturally occurring cross-linker. **Crystal Growth & Design**, **8(5)**, 1748-1753 (2008).

21. S Di Tommaso, P David, K Picolet, M Gabant, H David, J Luc Morançais, J Gomar, F Leroy, C Adamo. Structure of genipin in solution: a combined experimental and theoretical study. RSC Adv., 3, 13764–13771 (2013).

22. H Durst, G Gokel. Química Orgánica Experimental. Editorial REVERTÉ, S.A., págs. 512-514 Barcelona, España (2007).