

EXTRAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE GENIPINA A PARTIR DOS FRUTOS VERDES DE GENIPA AMERICANA L.

LEITE, B.F.¹; Cunha, R.B.²; Rodrigues, J.F.B.²; Medeiros, R.P.²; da Silva Neto, J.E.²; Pinto, M.R.O.¹; Amoah, S.K.S.²; Fook, M.V.²;

¹Departamento de Química, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande (PB), Brasil

²Dep. De Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande (PB), Brasil

E-mail: joao.emidio@certbio.ufcg.edu.br

Resumo. A genipina é uma substância incolor encontrada nos frutos de Jenipapo (*Genipa americana* Linnaeus) que, espontaneamente, reage com grupos aminos em presença de oxigênio formando um pigmento de coloração que pode variar do violeta ao azul escuro. Na forma não reagida, ela apresenta propriedades de agente natural de ativação ou reticulante, podendo associar-se covalentemente a diferentes materiais para aumentar sua estabilidade química e física, além de possibilitar a ocorrência de reações biofuncionais. No entanto, o preço elevado do padrão em pó desta substância dificulta os estudos de sua aplicação e, desta forma, surge a necessidade de extrair e purificar a genipina por meio de ensaios laboratoriais de modo a se obter uma melhor relação custo-benefício. Portanto, o objetivo deste trabalho foi promover a extração e purificação de genipina na forma sólida a partir de frutos verdes de Jenipapo (*Genipa americana* L.). Os frutos foram obtidos em um sítio localizado na Ilha de Itamaracá – PE. Para o preparo do extrato, três frutos verdes de tamanhos e pesos semelhantes, foram cortados ao meio e despolidos. O endocarpo e as sementes foram pesados juntos (200 g). A obtenção do produto com a maior qualidade foi alcançada pela extração líquida da polpa com clorofórmio em proporção 2:1 solvente/matriz, seguida da precipitação e purificação com diclorometano. Amostra de genipina purificada e padrão comercial foram analisados e comparados por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), espectrometria de massas (MS) e Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Também foi realizada a quantificação por análise gravimétrica da genipina. De acordo com os resultados a genipina extraída e purificada dos frutos de Jenipapo apresentou fragmentos de massa e bandas de vibração de infravermelho semelhantes ao do padrão comercial. Logo, foi possível obter a genipina com alto grau de pureza.

Palavras-chave: Genipina, *Genipa americana* Linnaeus, Frutos verdes de Jenipapo.

1. INTRODUÇÃO

O Jenipapo (do tupi-guarani “fruto que serve para pintar”) é o fruto do jenipapeiro, árvore da espécie *Genipa americana* Linnaeus originária do noroeste da América do Sul e distribuída de norte a sul do Brasil. Durante a fase imatura, o pH do fruto e o contato com o oxigênio possibilitam a reação de um metabólito secundário do tipo iridoide (o Metil (1S,2R,6S)-2-hidroxi-9-(hidroximetil)-3-oxabicyclo[4.3.0]nona-4,8-dieno-5-carboxilato, comercialmente conhecido como genipina) com grupos amino presentes em sua constituição, formando um pigmento azul. (Bentes, 2014; Bentes et al., 2015; Silva et al., 2016; Neves et al., 2017; Neves et al., 2018; Neves; Meireles, 2018).

A genipina apresenta atividade contra danos por oxidação e trombose, antimicrobiana, anti-inflamatória, protege o hipocampo dos neurônios, doenças hepáticas e diabetes, e gera corantes estáveis para indústria têxtil e alimentícia. Além disso, é um agente natural de ativação ou reticulante, que pode ser associada covalentemente a diversos materiais para elevar sua estabilidade física e química e prover a possibilidade de reações biofuncionais, sendo empregada na imobilização de enzimas, liberação gradativa de fármacos, bioadesivos na constituição de próteses para aumentar a resistência mecânica de ossos e cartilagens, no tratamentos de ferimentos cutâneos, etc. (Velásquez; Rivas; Ocanto, 2014; Ramos-de-La-Penã et al., 2016; Bellé, 2017; Neves; Meireles, 2018).

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo extração da genipina sólida a partir do endocarpo e das sementes de frutos verdes de Jenipapo armazenados sob congelamento e análise de sua identidade, pureza e rendimento. A metodologia aplicada será baseada na adaptação do trabalho de Velásquez et al. (2014).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os frutos verdes de Jenipapo (*Genipa americana* L.) foram obtidos em um sítio localizado na Ilha de Itamaracá – PE. Os reagentes utilizados na extração foram: HCl (37%; Neon); Acetona P.A. (P.A.; Dinâmica); n-Hexano (95%; Dinâmica); Clorofórmio (99,8%; Neon); Diclorometano (99,5%; Vetec); Acetato de Etila (P.A.; Química Moderna).

O processo de extração da genipina dos frutos verdes de *Genipa americana* L. ocorreu de acordo com as etapas ilustradas pela Fig. 1.

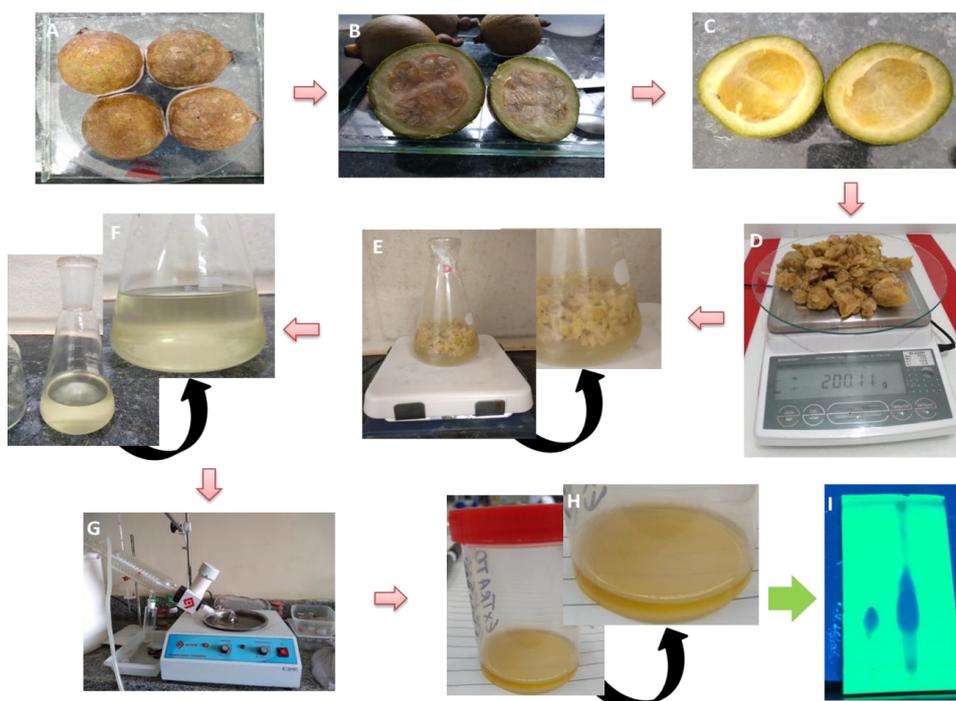


Figura 1. Fluxograma de extração da genipina. (fonte: Própria)

Três frutos verdes, de tamanhos e pesos semelhantes, foram cortados ao meio e despolpados. O endocarpo e as sementes foram misturados para serem pesadas (amostra com 200g). A amostra da polpa pesada foi então colocada em um béquer de plástico, onde foi acidificada. Em seguida, foi acrescido 400 mL de clorofórmio à mistura, com maceração contínua até que as sementes estivessem o mais separadas possível da polpa. Esta foi então colocada sob agitação moderada por um tempo total de 2h e 30min.

A amostra foi então filtrada por gravidade com papel de filtro qualitativo e o extrato foi armazenado e colocado sob refrigeração até o momento da evaporação do solvente.

O extrato foi concentrado por meio da remoção do solvente em um rotaevaporador à temperatura ambiente por 2 horas. O líquido resultante (cor de mel, odor agudo de jenipapo e consistência oleaginosa) foi armazenado em um frasco coletor com tampa e colocado sob refrigeração até a etapa de precipitação. Antes de realizar o procedimento de precipitação da substância, uma CCD do extrato foi realizada para confirmação de sua presença.

Purificação da genipina sólida

Ao extrato foi adicionado algumas gotas de acetona P.A. para induzir a precipitação da genipina, seguida da mistura com n-hexano e filtrado a vácuo. O procedimento foi repetido no filtrado e ambos os sólidos retidos foram misturados. Uma pequena quantidade de amostra foi retirada e uma nova CCD realizada para mapear a remoção das impurezas.

O sólido foi raspado do papel de filtro e colocado em um novo frasco coletor, onde foi misturado ao diclorometano. Um banho-maria foi preparado e o frasco foi submetido à aquecimento brando (~ 70°C). Uma vez solubilizado por completo o sólido no solvente, o frasco foi colocado em um banho de gelo até total precipitação da genipina. Realizou-se então uma filtração a vácuo e o resíduo resultante foi armazenado em novo frasco coletor. A Fig.2 representa o fluxograma de recuperação da genipina

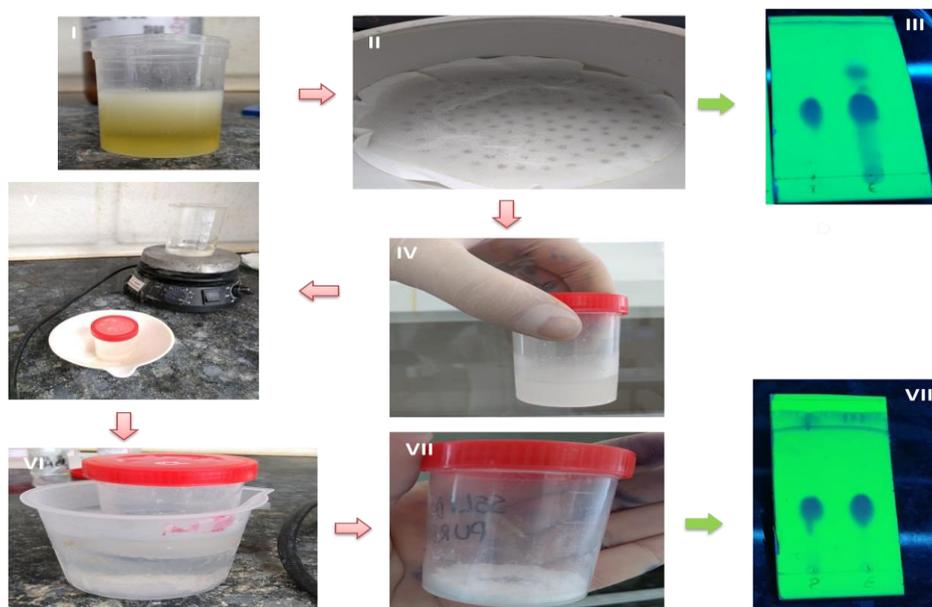


Figura 2. Fluxograma de recuperação da genipina. (fonte: Própria)

O extrato obtido foi comparado com a genipina comercial e submetido a cromatografia em camada delgada (CCD). Quantificação por análise gravimétrica, com a massa média de dois frascos coletores vazios e idênticos aos que armazenam a substância purificada e o conjunto. Espectrometria de massas (MS), em um Espectrômetro de Massa da Perkin-Elmer modelo AxION 2 TOF em ambos, a genipina comercial e no sólido obtido do processo extrativo. E Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cromatografia em camada delgada (CCD).

Por CCD, foi observado grande quantidade de genipina - fato reforçado pela altura do padrão, no entanto, ainda foi observado a presença de impurezas. Com a purificação foi observado que o sólido branco obtido demonstrou excelente correspondência com o padrão e ausência de impurezas.

Quantificação da genipina

A massa média do frasco foi de 5,2602g e o conjunto pesou 5,4475g. Logo a massa de genipina obtida foi de:

$$M_{\text{genipina}} = 5,4475\text{g} - 5,2602\text{g} = 0,1873\text{g}$$

O rendimento em massa da extração é dado por:

$$R(\%) = (M_{\text{genipina}} / M_{\text{polpa}}) * 100 = (200,11\text{g} / 0,1873\text{g}) * 100 = 0,0936\%$$

Realizando um procedimento de secagem por liofilização com a mesma massa de polpa, foi possível determinar que o fruto apresentou cerca de 70% (m/m) de água em sua composição. Logo, a estimativa para o rendimento do processo extrativo em base seca foi de:

$$M_{\text{polpa seca}} = 30\% \cdot 200,11\text{g} = 60,033\text{g}$$

$$M_{\text{genipina}} = 5,4475\text{g} - 5,2602\text{g} = 0,1873\text{g}$$

O rendimento em massa seca da extração é dado por:

$$R(\%) = (M_{\text{genipina}} / M_{\text{polpa}}) * 100 = (0,1873 / 60,033\text{g}) * 100 = \mathbf{0,3120\%}.$$

Espectrometria de Massa

A Fig. 3 representa os espectros obtidos:

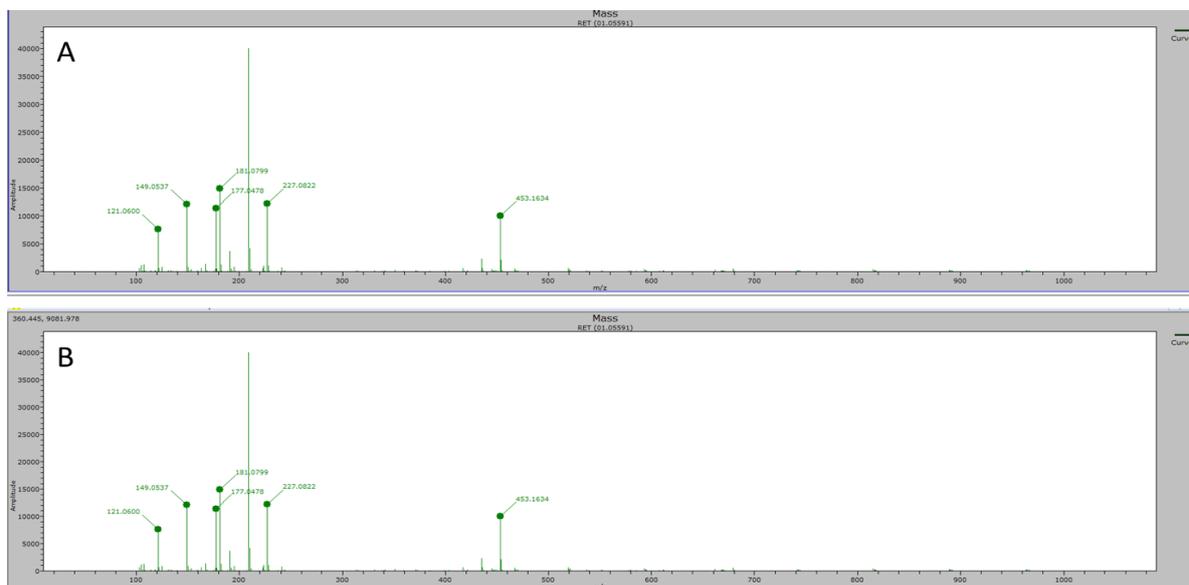


Figura 3. Espectros de massa da A) Genipina Padrão e B) Genipina isolada da *Genipa americana* L

Nenhuma diferença significativa foi observada entre os espectros, corroborando os resultados com a identificação realizada pela CCD. E foi comprovando a ausência de quaisquer outras substâncias que poderiam estar contaminando o sólido.

Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As bandas de absorção do FTIR para o padrão comercial e a *Genipa americana* L. estão ilustradas na Fig. 4.

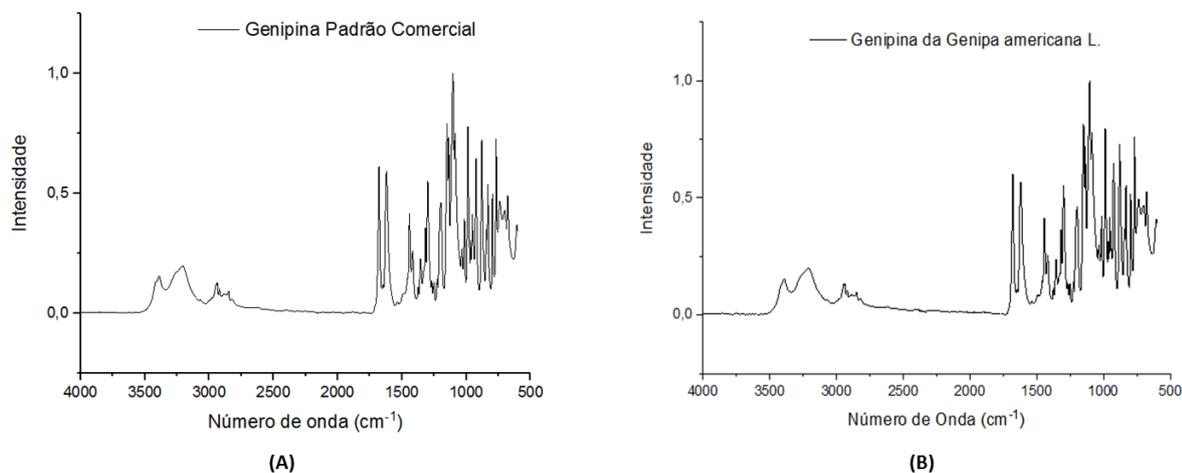


Figura 4. Espectro de FTIR do (A) Padrão Comercial e (B) Genipina da *Genipa americana* L.

Os picos de absorção nas bandas específicas do padrão de genipina comercial não apresentaram diferenças significativas do obtido com a análise do sólido purificado. Desta forma, é possível afirmar que o FTIR reforça a identidade do produto obtido - previamente atestada pela CCD - e a ausência de substâncias diferentes de genipina em sua constituição, ou seja, sua elevada pureza.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados foi possível a extração da genipina sólida a partir do endocarpo e das sementes de frutos verdes de Jenipapo. A CCD do sólido branco demonstrou excelente correspondência com o padrão comercial e ausência de impurezas. O FTIR e a espectrometria de massas reforçaram a identidade do produto obtido. Logo, foi possível obter uma genipina com alto grau de pureza.

AGRADECIMENTOS

A UFCG, Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO pela realização dos ensaios e o Ministério da Saúde pelo fomento.

REFERÊNCIAS

- BELLÉ, A. S. Extração de genipina a partir do jenipapo (*Genipa americana* Linnaeus) para imobilização de enzimas. 2017. 171 p. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.
- BENTES, A. S. Compostos bioativos de jenipapo, laranja e manga: Composição e desenvolvimento de métodos de extração. 2010. 130 p. Tese (Ciência dos Alimentos) — Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.
- BENTES, A. S. et al. Influence of the composition of unripe genipap (*Genipa americana* L.) fruit on the formation of blue pigment. *Food Science and Technology*. v. 52, n. 6, p. 3919 – 3924, 2015.

- NEVES, G. N. et al. Extraction of bioactive compounds from genipap (*Genipa americana* L.) by pressurized ethanol: Iridoids, phenolic content and antioxidant activity. *Food Research International*. v. 102, p. 595 – 604, 2017.
- NEVES, G. N. et al. Identification and quantification of genipin and geniposide from *Genipa americana* L by HPLC-DAD using a focused-core column. *Food Science and Technology*. v. 38, n. 1, p. 116 – 122, 2018.
- NEVES, G. N.; MEIRELES, M. A. A. Genipap: A new perspective on natural colorants for the food industry. *Food and Public Health*. v. 8, n. 1, p. 21 – 33, 2018.
- RAMOS-DE-LA-PENÃ, A. M. A review through recovery, purification and identification of genipin. *Phytochem Reviews*. v. 15, p. 37-49, 2016.
- SILVA, D. B. et al. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: Plantas para futuro – Região centro-oeste. Ministério do Meio Ambiente – Secretaria de Biodiversidade. Brasília, 2016, p.228-236.
- VESLÁSQUEZ, C. J.; RIVAS A; OCANTO, I. S. Obtención de genipina a partir de caruto (*Genipa americana* L.) dellano venezolano. *Avances en Química*. v. 9, n. 2, p. 75 – 86, 2014.