



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**EXTRAÇÃO DE GENIPINA A PARTIR DO JENIPAPO (*Genipa americana*
Linnaeus) PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS**

Anelise Stein Bellé

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**EXTRAÇÃO DE GENIPINA A PARTIR DO JENIPAPO (*Genipa americana*
Linnaeus) PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS**

Anelise Stein Bellé

(Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia – UERGS)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, como um dos requisitos para a obtenção do grau de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Porto Alegre

CIP - Catalogação na Publicação

Bellé, Anelise Stein

EXTRAÇÃO DE GENIPINA A PARTIR DO JENIPAPO (Genipa americana Linnaeus) PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS / Anelise Stein Bellé. -- 2017.

171 f.

Orientador: Plinho Francisco Hertz.

Coorientador: Manuela Poletto Klein.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Genipina. 2. Jenipapo. 3. Glutaraldeído. 4. Propriedades texturais e reológicas. 5. Imobilização de enzimas. I. Hertz, Plinho Francisco, orient. II. Klein, Manuela Poletto, coorient. III. Título.

2017

Anelise Stein Bellé

Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia – UERGS

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em: ___/___/___

Pela Banca Examinadora:

Homologada em: ___/___/___

Por:

Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz
Orientador – PPGCTA/UFRGS (Porto Alegre, RS)

Prof. Dr. Adriano Brandelli
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA/UFRGS)

Prof.^a Dr.^a Manuela Poletto Klein
Coorientadora – UFCSPA (Porto Alegre, RS)

Prof. Dr. Vitor Manfroi
Diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA/UFRGS)

Prof.^a Dr.^a Claucia Fernanda Volken de Souza
Banca – UNIVATES (Lajeado, RS)

Prof.^a Dr.^a Poliana Deyse Gurak
Banca – UFCSPA (Porto Alegre, RS)

Prof.^a Dr.^a Simone Hickmann Flôres
Banca – PPGCTA/UFRGS (Porto Alegre/RS)

Porto Alegre, 31 de março de 2017.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Plinho Francisco Hertz, pelo ótimo recebimento, pela ótima harmonia com que mantém seu laboratório e pelos vários ensinamentos. Obrigada pelo companheirismo e pela disponibilidade e atenção para que a minha experiência no mestrado fosse a mais proveitosa possível.

Agradeço à minha coorientadora, Prof.^a Manuela Poletto Klein, com a qual possuo grande amizade. Foram dois anos e meio trabalhando direto juntas, pois além do mestrado tive oportunidade de ser sua aluna e sua orientada no desenvolvimento de meu trabalho de conclusão de curso na graduação. Obrigada por me incentivar a fazer o mestrado, pelos ensinamentos e pelos inúmeros encontros e correções para que tudo que eu produzisse até aqui ficasse pelo menos muito bom.

Agradeço à Gaby Renard, que apesar de não ser minha orientadora formalmente, foi incansável para que a parte de biologia molecular presente neste trabalho acontecesse. Obrigada pelo auxílio pelo companheirismo e por todo o conhecimento e confiança passado a mim. À Jocelei, proprietária da Quatro G, pelo recebimento, e toda a equipe, Tina, Márcia, Tamires, Bruna, Victoria e Mateus, que sempre propiciaram um ótimo ambiente de trabalho.

Ao Prof. Eliseu Rodrigues, agradeço pelos incansáveis ensinamentos de cromatografia, espectrofotometria de massas e também pela participação no artigo desenvolvido. Ao Prof. Rafael Costa Rodrigues, pelas indagações e complementações ao meu trabalho durante o mestrado.

Às bolsistas, Camila Hackenhaar e Luiza Spolidoro, ambas estudantes da Engenharia de Alimentos e muito competentes, que me acompanharam no início e no fim do mestrado, respectivamente. Agradeço muito, pois sem elas nem todos os resultados teriam sido alcançados, principalmente por causa das minhas idas e vindas ao ICTA, ocorridas devido ao trabalho paralelo em parceria com a Quatro G.

Agradeço também aos colegas do laboratório, Jéssie Schöffner, Lovaine Duarte, Gustavo Costa e Josué Martins, pela parceria, pelos materiais emprestados e pela comilança e risadas.

A todos os colegas do Grupo de Biotecnologia, Bioprocessos e Biocatálise.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em especial aos seus professores e funcionários, pela presteza, ao ICTA pelos equipamentos disponibilizados e à Capes pelo suporte financeiro.

E por último, não menos importante, gostaria de agradecer a minha família, meus pais, Carin e Alceu, e minha irmã, Pauline, por todo o carinho e apoio para que este trabalho fosse concluído com êxito. E em especial, gostaria de agradecer ao meu marido, Dieison, meu amor, que desde que casamos convive diariamente com os assuntos do meu mestrado, que sempre me deu forças e apoio para que eu pudesse terminá-lo, pelas palavras de encorajamento, pela paciência e por ser uma pessoa com quem posso contar para tudo.

"There is a greater gift than the trust of others. That is trust in oneself. Some might call it confidence, others name it faith. But if it makes us brave, the label doesn't matter for it's the thing that frees us, to embrace life itself."

(Jennifer Worth)

EXTRAÇÃO DE GENIPINA A PARTIR DO JENIPAPO (*Genipa americana* Linnaeus) PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS¹

Autor: Anelise Stein Bellé

Orientador: Plinho Francisco Hertz

RESUMO

O consumo e a utilização de produtos naturais, tanto para a alimentação quanto para utilização industrial é cada vez mais frequente. Assim, este trabalho teve como objetivo principal extrair um iridoide natural a partir do jenipapo, a genipina, a fim de empregá-la como agente de ativação em suportes de quitosana para imobilização de enzimas. Já que, dentre os agentes conhecidos este é o menos tóxico para este tipo de aplicação. Adicionalmente, foi iniciado um estudo para a construção de uma lactase recombinante visando a sua imobilização e síntese de prebióticos. Inicialmente, o jenipapo (*Genipa americana* L.), que pode possuir até 3 % de genipina disponível em seu fruto, foi submetido a diferentes condições de extração enzimática em um sistema aquoso bifásico (SAB). Com o intuito de compará-la com seu possível substituinte, o glutaraldeído, géis de quitosana foram produzidos e reticulados tanto com genipina quanto com glutaraldeído para avaliação das suas propriedades texturais e reológicas. Após, duas β -galactosidases modelos, de *Kluyveromyces lactis* e de *Aspergillus oryzae*, foram imobilizadas nos suportes de quitosana preparados a fim de avaliar a capacidade catalítica das enzimas imobilizadas. O tratamento com a enzima comercial Celluclast à 10 % (v/v), a 36 °C e pH 3,7, promoveu a obtenção de 196 mg de genipina por grama de jenipapo – a maior concentração descrita na literatura. Quanto aos géis de quitosana reticulados, a utilização de 0,5 % de genipina (m/v) resultou em géis com propriedades texturais superiores e propriedades reológicas similares aos géis reticulados com 3 % de glutaraldeído (v/v). No geral, a hidrólise da lactose com a β -galactosidase de *K. lactis* imobilizada em quitosana ativada com 0,5 % de genipina (m/v) foi superior ao grau de hidrólise alcançada com as β -galactosidases imobilizadas em quitosana ativada com 3 % de glutaraldeído (v/v) (87 % e 9 %, respectivamente). Assim, a genipina extraída mostrou ser uma excelente substituta do glutaraldeído na ativação da quitosana e para

¹Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos (Área de Bioquímica), Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

utilização na imobilização de enzimas. Por fim, foi realizado o estudo para obtenção de uma β -galactosidase recombinante visando a síntese de galacto-oligossacarídeos (GOS).

Palavras-chave: genipina, jenipapo, glutaraldeído, propriedades texturais e reológicas, imobilização de enzimas.

EXTRACTION OF GENIPIN FROM GENIPAP (*Genipa americana* Linnaeus) FOR ENZYMES IMMOBILIZATION²

Author: Anelise Stein Bellé

Advisor: Plinho Francisco Hertz

ABSTRACT

The consumption and use of natural products, both for food or for industrial use is increasingly common. Thus, the main objective of this work was to extract a natural iridoid from genipap, genipin, in order to use it as a crosslinking agent in chitosan supports for immobilization of enzymes. Since, among the known agents, it is the least toxic for this type of application. In addition, a study was started for a construction of a recombinant lactase aiming at its immobilization and synthesis of prebiotics. Initially, which may have up to 3% genipin available in its fruit, was submitted to different enzyme-assisted extractions in an aqueous biphasic system (ABS). Moreover, in order to compare it with its possible substituent, glutaraldehyde, chitosan gels were prepared and crosslinked with genipin and glutaraldehyde for evaluation of their textural and rheological properties. Lastly, the crosslinked chitosan was used as support for the immobilization of two model β -galactosidases from *Kluyveromyces lactis* and *Aspergillus oryzae*, in order to evaluate their catalytic capacities. The treatment carried out with Celluclast 10 % (v/v), at 36 °C and pH 3.7, provided an extraction of 196 mg of genipin per gram of genipap - the highest genipin concentration found in literature until now. Chitosan gels crosslinked with genipin 0.5 % (w/v) showed better textural and similar rheological properties when compared to the chitosan crosslinked with glutaraldehyde 3 % (v/v). In general, the percentage of lactose hydrolysis by the β -galactosidases from *K. lactis* immobilized using genipin as a crosslinker was higher than when glutaraldehyde was used (87 % and 9 %, respectively). Therefore, genipin proves to be an excellent alternative for the use of glutaraldehyde in chitosan crosslinking studies. Finally, a study was carried out to obtain a recombinant β -galactosidase for the synthesis of galactooligosaccharides (GOS).

Keywords: genipin, genipap, glutaraldehyde, textural and rheological characteristics, enzyme immobilization.

²Master of Science dissertation on Food Science and Technology (Area of Biochemistry), Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS - *Aqueous Biphasic System* (sistema aquoso bifásico)

BAG - Bancos Ativos de Germoplasma

CLECs - *Crosslinking Enzyme Crystals*

CLEAs - *Crosslinking Enzyme Aggregates*

EDTA - *Ethylenediaminetetraacetic Acid* (ácido etilenodiaminotetracético)

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FDA - *Food and Drug Administration*

G' - módulo elástico

G'' - módulo viscoso

G* - módulo de cisalhamento complexo

GOS - Galacto-oligossacarídeos

GP - Grau de Polimerização

GRAS - *Generally Recognized as Safe*

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography* (cromatografia líquida de alta performance)

INVIMA - *Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos*

IPTG - *Isopropyl- β -D⁻¹-thiogalactopyranoside* (isopropil- β -D-galactosídeo)

JECFA - *Joint Expert Committee on Food Additives*

LB - meio de cultura Luria-Bertani

MEP - *methylerythritol 4-phosphate* (2-metil-D-eritriol-4-fosfato)

MS - *Mass Spectrometry* (espectrometria de massa)

MVA - *mevalonate* (ácido mevalônico)

ONPG - *ortho-phnil- β -galactopiranoside* (orto-fenil- β -galactopiranosídeo)

pb - pares de bases

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

SAB - Sistema Aquoso Bifásico

SOC - *Super Optimal Proth* (caldo super ideal)

TPA - Textural Profile Analysis (análise do perfil da textura)

UCP - *Uncoupling Protein* (proteínas desacopladoras, localizadas na membrana interna das mitocôndrias)

UV - *Ultraviolet radiation* (radiação ultravioleta)

WHO - *World Health Organization*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura do geniposídeo (a) e da genipina (b).	21
Figura 2. Intermediários reacionais da biossíntese de iridoides presentes na <i>Gardenia jasminoides</i> . Fonte: adaptado de von Poser (1997), de Dewick (1997) e de Sampaio-Santos & Kaplan (2001).	22
Figura 3. Estrutura geral dos iridoides.....	23
Figura 4. Hidrólise do geniposídeo e formação da genipina por ação da β -glicosidase. Fonte: adaptado de Xu et al. (2015).	28
Figura 5. Possíveis reações da genipina com grupamentos amino. Fonte: Adaptado de Butler et al. (2003) por Bispo (2009).	32
Figura 6. Mecanismo de reticulação da quitosana com genipina. Fonte: Xu et al. (2015).	34
Figura 7. Roda de cores (<i>hue* angle</i> , saturação da cor) mostrando os possíveis candidatos à corantes alimentares, intensidade avaliada após 28 dias a 25 °C em diferentes pHs. Fonte: adaptado de Lavinia et al. (2015).	38
Figura 8. Jenipapeiro. Fonte: Francis (1993).	40
Figura 9. Distribuição geográfica do jenipapo (destacada em cinza). Fonte: Adaptado de Francis (1993).	40
Figura 10. Aspecto da polpa do jenipapo em diferentes fases de amadurecimento: verde (a), verde oxidado (b), “de vez” (c) e maduro (d). Fonte: adaptado de Bentes & Mercadante (2014), Rodrigues & Renhe (2008) e Queiroz et al. (2012).	42
Figura 11. Iridoides identificados no jenipapo. Fonte: Bentes (2014).	43
Figura 12. Hidrólise (I) e transgalactosilação (II) da lactose pela β -galactosidase. Fonte: Adaptado de Martins et al. (2009).	53
Figura 13. Domínios da β -galactosidase de <i>Bacillus circulans</i> e seus mutantes BgaD-A, BgaD-B, BgaD-C e BgaD-D construídos por deleção. Legenda: peptídeo sinal (Sp, 1-35 a.a.); a. domínio Glyco_hydro_2N (ligação-açúcar); b. domínio Glyco_hydro_2; c. domínio Glyco-hydro_2_C (TIM barrel); d. domínio BID_1; e. quatro repetições do domínio Big_4; f. domínio F5/8 tipo C (domínio DS). Fonte: Song et al. (2011).	56
Figura 14. Mecanismo de produção de GOS a partir de BgaD-D. Fonte: Ishikawa et al. (2015).	57

Figura 15. Ilustração dos métodos de imobilização enzimática físicos, químicos e combinados. Fonte: adaptado de (Y.-H. P. Zhang et al. 2011; Guisan 2006).	59
Figura 16. Fluxograma da metodologia utilizada para extração da genipina e comparação da mesma com o glutaraldeído. Fonte: elaborado pela autora.....	68
Figura 19. Influência do pH e da temperatura na extração de genipina empregando 10 % de Celluclast (v/v) por 150 min. Fonte: elaborado pela autora.	10330
Figura 20. Molde de Teflon® dentro de uma tampa de tubo <i>Falcon</i> de 50 mL, envolvido com parafilme e preso por atilho (a); Molde contendo quitosana e submerso em solução coagulante (b); Molde após a retirada do coagulante e acréscimo da solução de genipina (c). Fonte: elaborado pela autora.	102
Figura 21. Curvas típicas da TPA e equações das características texturais avaliadas neste estudo. Fonte: adaptado de Pons & Fiszman (1996).....	1023
Figure A1. Extraction of genipin at 36 °C with pH 3.7 (tube on the left) and at 64 °C with pH 7.3 (tube on the right).	139
Figure A2. Fragmentation mechanism of the compounds identified in the organic phase from the enzyme-assisted extraction in TPAS and from the direct extraction.	63139
Figure A3. Schematic illustration of chitosan gels crosslinked with genipin (a) and with glutaraldehyde (b).	63140
Figure A4. Repeated batch of lactose hydrolysis using lactose 5 % (w/v) at 40 °C during 90 min using β -galactosidases immobilized on chitosan activated with genipin or glutaraldehyde.	140
Figura B1. Mapa do <i>pCR-Blunt</i> ®. Fonte: Invitrogen®.....	63
Figura B2. Vetor pET-30a-c(+). Fonte: Novagen®.	63
Figura C1. Curva de calibração utilizando glicina para quantificação de genipina. Fonte: elaborado pela autora.	11547
Figura D1. Exemplificação do anelamento dos primers forward e reverse 1 ao DNA de <i>B. circulans</i> . Fonte: elaborado pela autora.....	11549
Figura D2. Amplificação com os <i>primers forward</i> e <i>reverse 1</i> (a); reamplificação (b). Fonte: elaborado pela autora.	115
Figura D3. Características das colônias da cepa utilizada neste trabalho (a) e sua análise microscópica (b). Fonte: elaborado pela autora.	11551

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Possíveis fontes vegetais para a extração de genipina/geniposídeo.	24
Tabela 2. Melhores metodologias de extração de genipina (em relação a concentração) encontradas atualmente na literatura partindo diretamente de vegetais. .	27
Tabela 3. Composição centesimal do jenipapo (<i>Genipa americana</i> L.) nos estágios de maturação verde, “de vez” e maduro.....	44
Tabela 4. Parâmetros físico-químicos do jenipapo (<i>Genipa americana</i> L.) em diferentes estágios de maturação.....	45
Tabela 5. Exemplos de minerais presentes na composição do jenipapo (<i>Genipa americana</i> L.) em diferentes estágios de maturação.....	46
Tabela 6. Índice de doçura relativa à sacarose.	54
Tabela 7. Estruturas de alguns oligossacarídeos formados durante a ação da β -galactosidase em altas concentrações de lactose.....	54
Tabela B1. Sequência dos <i>primers</i> desenhados e seus sítios de restrições, no sentido 5'-3'.	63
Tabela B2. Condições da PCR.....	63
Tabela D1. <i>Primers</i> testados para amplificação da região BgaD-D da β -galactosidase de <i>Bacillus circulans</i> (sentido 5'-3').....	115

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	17
1.1 JUSTIFICATIVA	18
1.2 OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 GENIPINA.....	21
2.1.1 Rota biossintética da genipina.....	21
2.1.2 Fontes de extração da genipina.....	23
2.1.3 Técnicas para extração da genipina.....	26
1. 2.1.3.1 Extração por ação enzimática.....	28
2. 2.1.3.2 Extração com solventes.....	30
3. 2.1.3.3 Extração com ultrassom	31
2.1.4 Mecanismo de reação da genipina com aminas primárias.....	31
2.1.5 Aplicações da genipina.....	32
4. 2.1.5.1 Genipina como agente de ativação natural.....	32
2.1.5.2 Outras aplicações da genipina.....	35
2.1.5.2.1 Genipina como corante	35
2.1.5.2.2 Genipina como agente medicinal natural	39
2.2 JENIPAPO (<i>GENIPA AMERICANA</i> LINNAEUS)	39
2.2.1 O estágio de maturação do jenipapo e sua composição	41
2.2.2 Uso popular e propriedades farmacológicas	47
2.2.3 Importância econômica, ecológica e prospecção tecnológica.....	48
2.3 ENZIMAS.....	49
2.3.1 Celulases.....	50
2.3.2 Pectinases	51

2.3.3 β -galactosidases	51
5. 2.3.3.1 β -galactosidase de <i>Bacillus circulans</i>	55
2.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	57
2.4.1 Métodos e suportes para imobilização de enzimas	58
6. 2.4.1.1 Adsorção física à suportes insolúveis (não covalente).....	60
7. 2.4.1.2 Aprisionamento e encapsulação	60
8. 2.4.1.3 Adsorção iônica à suportes insolúveis	60
9. 2.4.1.4 Ligação covalente.....	61
10. 2.4.1.5 Agentes de ativação e reticulação	61
11. 2.4.1.6 Ligação cruzada	62
2.4.2 Imobilização de enzimas em suportes à base de quitosana.....	63
2.4.3 Benefícios e restrições da imobilização de enzimas.....	64
CAPITULO 3: METODOLOGIA	66
3.1 EXTRAÇÃO DE GENIPINA	66
3.2 GENIPINA COMO AGENTE DE ATIVAÇÃO DA QUITOSANA E SUA COMPARAÇÃO COM O GLUTARALDEÍDO	67
3.3 ESTUDO DA CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE <i>BGAD-D</i> DE B- GALACTOSIDASE DE <i>BACILLUS CIRCULANS</i> VISANDO A SÍNTESE DE GOS	68
CAPÍTULO 4: Efficient Enzyme-Assisted Extraction of Genipin from Genipap (<i>Genipa americana</i> L.) and its Application as a Crosslinker for Chitosan Gels.....	70
CAPÍTULO 5: PLANT SOURCES, EXTRACTION METHODS AND APPLICATIONS OF GENIPIN	102
CAPÍTULO 6: CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
CONCLUSÃO	114
DESDOBRAMENTOS	63
PERSPECTIVAS.....	63
APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO 4	63

APÊNDICE B – METODOLOGIA DO ESTUDO DA CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE BGAD-D DE B-GALACTOSIDASE DE <i>bacillus circulans</i> VISANDO A SÍNTESE DE GOS.....	63
APÊNDICE C – QUANTIFICAÇÃO DE GENIPINA UTILIZANDO GLICINA	115
APÊNDICE D – RESULTADOS PARCIAIS DO ESTUDO DA CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE BGAD-D DE B-GALACTOSIDASE DE <i>bacillus circulans</i> VISANDO A SÍNTESE DE GOS.....	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

A humanidade tem se beneficiado da ação de enzimas há muitos séculos, mais precisamente, desde 5.000 a.C., quando os primeiros queijos, vinhos e derivados de leite eram produzidos através da fermentação. Após isto, em 4.000 a.C., evidências apontam que os egípcios já formulavam uma bebida fermentada que chamamos hoje de cerveja, obtida a partir da fermentação da cevada, que também era utilizada naquela época como fonte de leveduras para a panificação (Ward 1991). Em 2.000 a.C., por oxidação microbiológica se produzia o vinagre. Logo depois, em 1930, iniciou-se a utilização de pectinases para clarificação de sucos. Já, durante a Segunda Guerra Mundial, outra aplicação podia ser visualizada, a indústria açucareira começava a utilizar invertases a fim de produzir o açúcar invertido, conhecido por apresentar um maior poder adoçante do que a sacarose e não sofrer cristalização (Aider et al. 2007). Mais tarde, em 1980, foi desenvolvida a produção de bioetanol a partir da fermentação de biomassas e, atualmente, essas e muitas outras enzimas são empregadas em diferentes indústrias mundialmente (Yang et al. 2014).

As indústrias que mais utilizam enzimas para produção e processamento de produtos são as indústrias farmacêutica, de combustíveis, mas principalmente a indústria de alimentos. Este mercado de *food enzymes*, nos anos de 2016 a 2021, projeta arrecadar cerca de 2,94 bilhões de dólares, crescimento este devido a um maior interesse, tanto da indústria como dos consumidores, com relação ao uso de enzimas em processos para o benefício da saúde e da qualidade nutricional dos alimentos. Atualmente, o maior mercado de aplicação de enzimas voltadas para alimentos está localizado no Norte da América (45 %), seguido pela Europa (25 %), Ásia/Pacífico (18 %) e América Latina e outros continentes (12 %) (Markets 2016).

Diferentes enzimas comerciais são encontradas e utilizadas por diversas indústrias, sejam elas produzidas por microrganismos alterados geneticamente, através de ferramentas de biologia molecular, ou não. As já utilizadas industrialmente são fortemente empregadas na forma livre (solúvel) em bioprocessos, porém, as vantagens acarretadas pela utilização de biocatalisadores imobilizados são relevantes e não deveriam ser uma hipótese descartada (Dicosimo, Robert; McAuliffe & Bohlmannb 2013). Após a imobilização, as enzimas tornam-se coadjuvantes de tecnologia ainda

mais úteis, pois podem ter seu poder catalítico aumentado, podem ser facilmente separadas do meio reacional e, ainda, serem reutilizadas (Tischer & Kasche 1999). A utilização de algumas enzimas imobilizadas, como as β -galactosidases, tem se tornado cada vez mais frequente em pesquisas científicas. Além disso, diversos materiais são conhecidos como bons constituintes para o desenvolvimento de suportes para a imobilização de enzimas, sendo que os biomateriais têm se destacado como alternativas mais sustentáveis. O biopolímero quitosana, por exemplo, oriundo da desacetilação da quitina, se destaca por possuir alta afinidade por proteínas, exibir propriedades antimicrobianas, apresentar grupos funcionais que podem tanto adsorver enzimas como reagir com agentes de ativação, entre outros. Por outro lado, o uso somente da quitosana para imobilização de enzimas é restrita, devido a sua baixa resistência mecânica. Porém, quando utilizada em conjunto com agentes reticulantes, a quitosana tem sua estrutura “aperfeiçoada”, formando redes de maior estabilidade. Entre os agentes reticulantes, o mais conhecido e amplamente utilizado é o glutaraldeído. No entanto, essa substância deve ser evitada por apresentar efeitos citotóxicos, podendo ser substituída por outros agentes reticulantes, como a genipina.

1.1 JUSTIFICATIVA

Este trabalho tem como objetivo atingir indústrias de alimentos que buscam conceitos de *green technology/environmentally friendly* tanto para agregar à empresa uma política ambiental honesta quanto para beneficiar colaboradores e consumidores finais, que entram diretamente em contato com os reagentes de diferentes processos e com o produto final. Além disso, tem-se como objetivo a obtenção de uma enzima recombinante que beneficie a indústria por apresentar alta eficiência para produção de ingredientes prebióticos (galacto-oligosacarídeos).

Apesar de a imobilização de enzimas ser uma tecnologia que muitas vezes necessita de adequação nas instalações industriais, o que não é bem visto por alguns investidores, uma crescente pressão da sociedade e adequação dos governos, através de incentivos fiscais, estimula a substituição de métodos que colocam em risco o meio ambiente e os seres humanos por processos mais amenos e reutilizáveis. Sendo assim, os estudos conduzidos neste trabalho tiveram a importância de não só descrever uma metodologia eficaz para extração de genipina (produto de relativo alto custo), produzida através de técnicas práticas e de baixo custo, mas, ainda, de fornecer informações

relevantes, como a possibilidade de substituir um agente de ativação tóxico por um natural, para aplicação na imobilização de enzimas.

1.2 OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O presente trabalho teve como objetivo geral desenvolver uma metodologia sustentável e de baixo custo para obtenção de genipina como agente de ativação em substituição ao glutaraldeído para uso na imobilização de enzimas. Desta forma, são ressaltados como objetivos específicos:

- Determinar as atividades totais de pectinase, celulase e β -glicosidase de quatro enzimas comerciais à serem utilizadas para a extração de genipina;
- Avaliar o potencial do jenipapo (*Genipa americana* L.) como fonte vegetal para a extração da genipina em um sistema aquoso bifásico (SAB) formado por acetato de etila e tampão e ação enzimática;
- Avaliar a eficiência da extração de genipina em diferentes condições, através da variação da concentração das enzimas comerciais aplicadas e do tempo, bem como avaliar o efeito do pH e da temperatura do sistema;
- Identificar e comparar os compostos obtidos em diferentes extrações de genipina;
- Avaliar as propriedades texturais e reológicas de géis de quitosana reticulados com a genipina extraída e com glutaraldeído;
- Avaliar a estabilidade de duas β -galactosidases modelos na presença de lactose para ambos os suportes, utilizando esferas de quitosana ativadas tanto com genipina quanto com glutaraldeído;
- Estudar uma lactase recombinante visando a síntese de prebióticos (galactooligossacarídeos).

Este trabalho encontra-se organizado na configuração de capítulos. No Capítulo 1 foram apresentadas a introdução, a justificativa e os objetivos do estudo. No Capítulo 2, uma revisão bibliográfica abordando os principais pontos do tema proposto é apresentada. No Capítulo 3, a metodologia empregada para obtenção da genipina e sua comparação com glutaraldeído está exposta em forma de fluxograma. No Capítulo 4 são apresentados os resultados obtidos na avaliação da genipina e no Capítulo 5 uma revisão sobre a genipina, ambos em forma de artigo científico, e, por fim, no Capítulo 6, estão

as considerações finais dos estudos. No item *Conclusão* os resultados mais relevantes estão destacados. Com relação aos experimentos e resultados atingidos no estudo do desenvolvimento da β -galactosidase recombinante, ambos estão apresentados de forma detalhada nos Apêndices B e D.

CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GENIPINA

A genipina foi descoberta em 1960 por Djerassi e colaboradores. É um composto orgânico, pertencente a superclasse dos lipídeos, e conhecida como a aglicona do geniposídeo. A diferença estrutural do geniposídeo em comparação com a genipina é encontrada no carbono 1 do hexano, onde o primeiro apresenta uma glicose e o segundo uma hidroxila, respectivamente (Figura 1). Com fórmula molecular $C_{11}H_{14}O_5$ e massa molar igual a $226,23 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, a genipina possui ponto de fusão entre $120 \text{ }^\circ\text{C}$ e $121 \text{ }^\circ\text{C}$ e absorção no espectro ultravioleta em aproximadamente 240 nm (Carrillo-Ocampo et al. 2013; Djerassi et al. 1960).

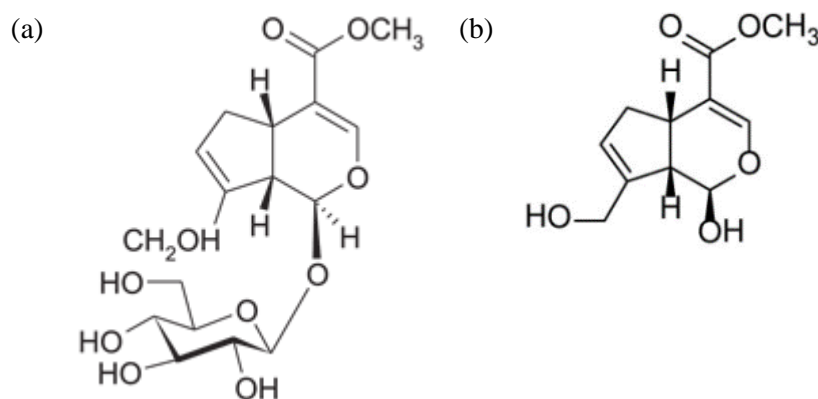


Figura 1. Estrutura do geniposídeo (a) e da genipina (b). Fonte: adaptado de Wang et al. (2015).

A genipina apresenta estabilidade entre os pHs 4 e 9 e ótima solubilização em solventes, principalmente em etanol, éter dietílico e propilenoglicol. Apesar de ser uma substância mais hidrofóbica que o geniposídeo, ela ainda possui capacidade de se solubilizar em meios aquosos, até aproximadamente $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (da Silva et al. 1998; Abreu 2008).

2.1.1 Rota biossintética da genipina

A genipina é um iridoide, pertencente à classe dos monoterpenos. Os iridoídeos são produzidos em plantas e sintetizados a partir do monoterpeno geraniol, o qual pode ser obtido através de duas vias biossintéticas, a via do ácido mevalônico (*mevalonate*, MVA) e a via do 2-metil-D-eritriol-4-fosfato (*methylerythritol 4-phosphate*, MEP)

(Dewick 1997; Liu & Lou 2007). Na Figura 2 podem ser visualizados os intermediários reacionais da biossíntese de iridoides presentes na *Gardenia jasminoides*, umas das possíveis fontes de extração da genipina.

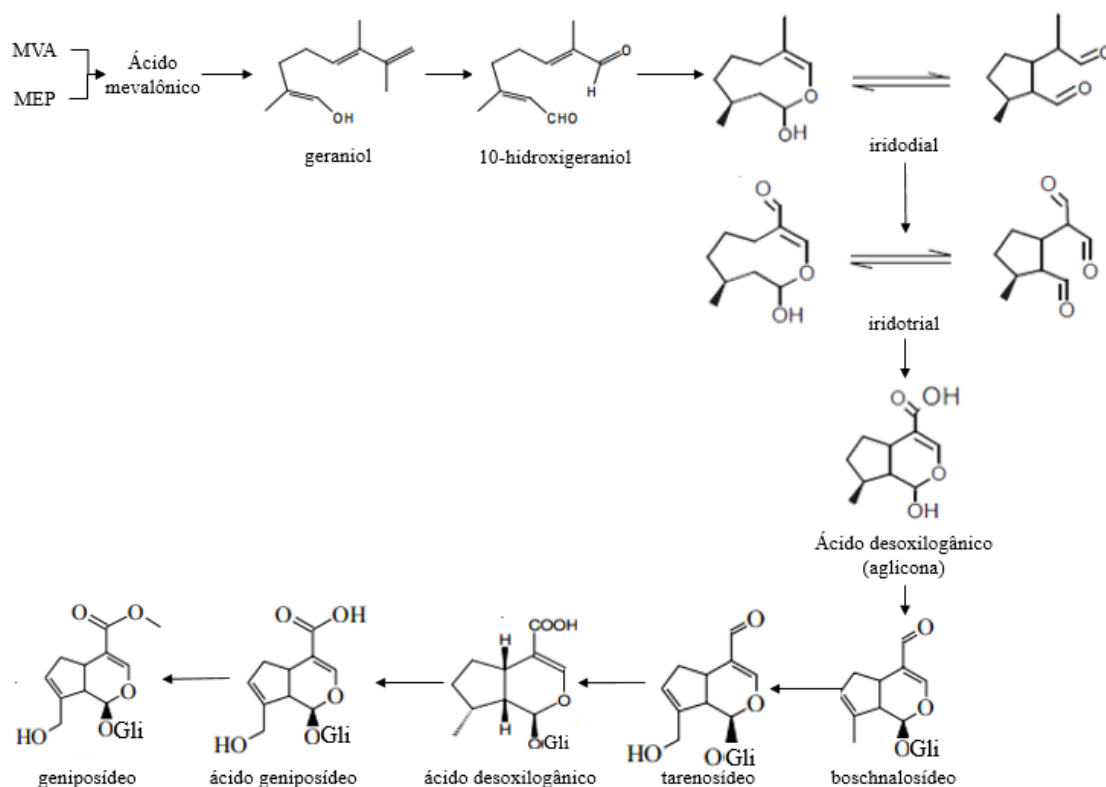


Figura 2. Intermediários reacionais da biossíntese de iridoides presentes na *Gardenia jasminoides*. Fonte: adaptado de von Poser (1997), de Dewick (1997) e de Sampaio-Santos & Kaplan (2001).

A rota inicia-se através de reações de oxidação e hidroxilação, na qual uma nova ligação carbono-carbono (adição nucleofílica de Michael) ocorre propiciando a ciclização do geraniol e a formação do núcleo do iridoide (Sampaio-Santos & Kaplan 2001; Simões et al. 2004). Através da oxidação do C⁻¹ do iridotrial, origina-se a aglicona do ácido α -desoxilogânico. Este ácido, por sua vez, sofre uma glicosilação, formando o ácido α -desoxilogânico, conhecido como o precursor de iridoides de estereoquímica 8α (C⁻¹⁰ com conformação α) (Jensen 1991), que possui como intermediários o boschnalósídeo e o tarenosídeo. Então, na sequência, serão formados o ácido geniposídico e o geniposídeo (Uesato et al. 1984). Já a genipina, será formada após a metilação e a deglicosilação do ácido geniposídico (Inouye et al. 1969).

A estrutura básica dos iridoides, composta basicamente por um sistema de anel de ciclopentanodihidropirano (Sampaio-Santos & Kaplan 2001), é mostrada na Figura 3.

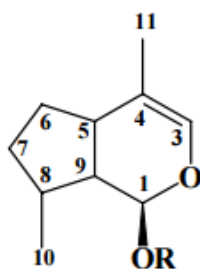


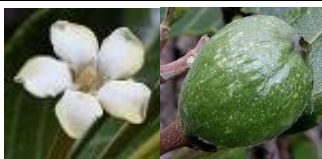

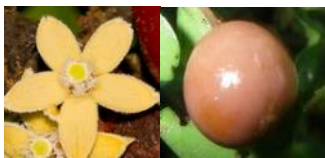






Figura 3. Estrutura geral dos iridoides. Fonte: adaptado de Sampaio-Santos & Kaplan (2001).

2.1.2 Fontes de extração da genipina

A genipina pode ser extraída de diferentes fontes vegetais. A relação dessas espécies e o segmento da planta onde já foram identificados a genipina ou o geniposídeo estão na Tabela 1.

Tabela 1. Possíveis fontes vegetais para a extração de genipina/geniposídeo.

Espécie	Família	Imagens da espécie	Distribuição geográfica	Localização	Referência
<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis	Rubiaceae		Ásia	Fruto e flores	(Ramos-de-la-Peña et al. 2016)
<i>Genipa americana</i> L.	Rubiaceae		América Central e América do Sul	Endocarpo e mesocarpo de frutos verdes	(Renhe et al. 2009; Bentes & Mercadante 2014)
<i>Tocoyena formosa</i>	Rubiaceae		Américas	Caule e folhas	(Coelho et al. 2006)
<i>Randia spinosa</i>	Rubiaceae		Ásia	Caule	(Hamerski et al. 2003; Singh et al. 2010)
<i>Canthium Multiflorum</i>	Rubiaceae		Burkina Faso (África)	Folhas, flores e frutos	(Kouam et al. 2013; Traoré et al. 2008)
<i>Eucommia ulmoides</i>	Eucommiaceae		China	Casca	(Li et al. 2015)
<i>Castilleja tenuiflora</i>	Orobanchaceae		América do Norte	Flores	(Carrillo-Ocampo et al. 2013)
<i>Bellardia trixago</i>	Orobanchaceae		Região do Mediterrâneo	Flores	(Venditti et al. 2013)
<i>Apodytes dimidiata</i>	Icacinaceae		África do Sul	Casca	(Drewes et al. 1996; Kayonga 1996)

Fonte: elaborado pela autora.

A patente US 20100196298 A1 (Andre et al. 2010) ainda relata a formação de pigmentos por extratos de plantas da família Rubiaceae, os quais possuem inúmeros iridoides, entre eles o geniposídeo. São mencionadas as seguintes espécies, *Gardenia*

lucida, *Gardenia erubescens*, *Rothmannia capensis*, *Rothmannia longiflora*, *Rothmannia withfieldii*, *Adenorandia kalbreyeri* e *Cremaspora triflora*. Segundo artigo de revisão de Parmar & Sharma (2000), o iridoide geniposídeo também pode ser encontrado em outras espécies, como na *Gardenia augusta*, na *G. lutea* e na *G. sootenpesis*. Além disso, diversas espécies de *Galium L.* são citadas como contendo ácido geniposídico em sua composição, como *G. palustre*, *G. odoratum*, *G. rivale*, *G. humifusum*, *G. schultesii*, *G. pseudoaristatum*, *G. octonarium*, *G. rhodopeum*, *G. aegeum*, *G. lovcense*, *G. album ssp album*, *G. album spp pychnotrichum*, *G. aparine* e *G. tricornutum* (Mitova et al. 2002).

Além dessas espécies, a patente WO 2013045701 A2 (Hervé & Gwenaëlle 2013) relata a aplicação de diferentes extratos vegetais para o tingimento de fibras de queratina humana para uso cosmético, onde são citadas as espécies: *Abelia grandiflora*, *Adenorandia kalbreyeri*, *Adina polycephala*, *Aeginetia indica* var. *gracilis*, *Asperula* sp, *Asystasia bella*, *Aucuba japonica*, *Avicennia marina*, *Bartsia trixago*, *Buddleja americana*, *Buddleja crispa*, *Buddleja japonica*, *Canthium schimperianum*, *Castilleja wightii*, *Chaenorhinum minus*, *Clerodendrum serratum*, *Coprosma* sp, *Cornus officinalis*, *Craibiodendron henryi*, *Cremaspora triflora*, *Crucianella* sp, *Daphniphyllum calycinum*, *Daphniphyllum humile*, *Daphniphyllum macropodum*, *Eremostachys glabra*, *Escallonia* sp, *Eucommia ulmoides*, *Feretia apodanthera*, *Galium humifusum*, *Galium verum*, *Gardenia jasminoides*, *Garrya elliptica*, *Globularia dumulosa*, *Hedyotis corymbosa*, *Hygrophila difformis*, *Ixeris chinensis*, *Lamiastrum galeobdolon* (*Lamium galeobdolon*), *Lamiophlomis rotata* (*Phlomis rotata*), *Leonotis nepetaefolia*, *Linaria* sp, *Morinda coreia*, *Mussaenda pubescens*, *Nepeta cilicia*, *Nepeta nuda* ssp. *Albiflora*, *Odeontites verna*, *Oldenlandia corymbosa*, *Paederia scandens*, *Pedicularis chinensis*, *Pedicularis condensata*, *Pedicularis dolichocymba*, *Penstemon confertus*, *Penstemon deustus*, *Penstemon richardsonii*, *Penstemon serrulatus*, *Pithecoctenium crucigerum*, *Plantago alpina*, *Plantago carinata*, *Plantago lagopus*, *Plantago lanceolata*, *Plantago subulata*, *Premna barbata*, *Randia dumetorum*, *Rhododendron latoucheae*, *Rothmannia withfieldii*, *Rubia peregrina*, *Rubia tinctorum*, *Saprosma scortechinii*, *Scrophularia korainensis*, *Scrophularia lepidota*, *Scrophularia ningpoensis*, *Scyphiphora hydrophyllacea*, *Swida controversa*, *Syringa vulgaris*, *Tarenna kotoensis*, *Tecoma heptaphylla*, *Thevetia gaumeri*, *Thevetia peruviana*, *Verbascum laxum*, *Verbascum nigrum*, *Verbascum phlomoides*, *Verbascum salviifolium*,

Verbascum sinuatum, *Verbascum thapsus*, *Verbascum undulatum*, *Veronica derwentiana*, *Vitex nigrum* e *Wendlandia formosana* – todas possíveis fontes de genipina.

Na maioria dos vegetais, a genipina pode ser encontrada naturalmente. Por exemplo, no fruto da gardênia, a composição percentual de genipina é de 0,17 %, enquanto que no jenipapo pode variar de 1 % a 3 % (Djerassi et al. 1960; Ramos-de-la-Peña et al. 2016). Por outro lado, o teor de geniposídeo disponível na gardênia é de 4,2 % e para o jenipapo verde é de aproximadamente 12 % (Xu et al. 2016; Bentes & Mercadante 2014).

2.1.3 Técnicas para extração da genipina

O estudo de extratos brutos obtidos de plantas inteiriças ou de suas partes, como caule, folhas, flores e frutos, é de importante cunho para descoberta de novos compostos e até mesmo para se obter maiores rendimentos de compostos bioativos já conhecidos. Quanto a genipina, ela pode ser obtida por meio de diferentes técnicas, que podem ser empregadas de forma isolada, combinada (conjugada) ou sequenciada. Atualmente, três principais possibilidades são conhecidas: hidrólise enzimática, solventes e ultrassom, abordadas uma a uma neste item. A relação das melhores metodologias de extração (em relação a concentração de genipina) está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Melhores metodologias de extração de genipina (em relação a concentração) encontradas atualmente na literatura partindo diretamente de vegetais.

Fonte vegetal	Tipo de extração	Condições empregadas na extração	Concentração de genipina	Referências
<i>Gardenia jasminoides</i>	Ação enzimática	Fermentação (<i>Penicillium nigricans</i> , que contém β -glicosidase, ~96 h, 30 °C, 180 rpm).	> 1,5 mg.mL ⁻¹ (98 % de pureza)	(Xu et al. 2008)
	Ação enzimática	Fermentação (<i>Trichoderma harzianum</i> CGMCC 2979, 48 h, 30 °C, pH 6.1, 150 rpm).	3,6 mg.g ⁻¹ (98 % de pureza)	(Dong et al. 2014)
	Solvente (SAB); Ação enzimática	Acetato de etila e tampão (SAB) e aplicação de celulases (de <i>Aspergillus niger</i> , Sigma®) a 50 °C, pH 4 por 24 h.	58,83 mg.g ⁻¹ (85 % of de pureza)	(Winotapun et al. 2013)
	Solvente	Tampão de pH neutro por 5 min.	21,1 mg.g ⁻¹ (pureza não mencionada)	(Wang et al. 2011)
<i>Genipa americana</i>	Ultrassom; Ação enzimática	Ultrassom (285 W, 24 kHz, 10 °C por 15 min); aplicação de pectinesterases (Novoshape®, enzima comercial de <i>Aspergillus aculeatus</i> , a 10 °C por 1 h).	7,85 mg.g ⁻¹ (pureza não mencionada)	(Ramos-De-La-Peña et al. 2014)
	Pressão; Ação enzimática	Aplicação de pectinases (Pectinex Ultra SP-L®, enzima comercial de <i>Aspergillus aculeatus</i>) combinada com alta pressão hidrostática (130 MPa, a 9 °C por 15 min).	34 mg.g ⁻¹ (tratamento sem a presença de enzimas) (pureza não mencionada)	(Ramos-de-la-Peña et al. 2015)
	Solvente	Éter e hexano.	10 mg.g ⁻¹ (pureza não mencionada)	(Djerassi et al. 1960)
	Solvente	Maceração com clorofórmio; destilação (rotavapor); acetona (para precipitar a genipina); hexano; refrigeração de 41 dias.	0,9 mg.g ⁻¹ (pureza não mencionada)	(Velásquez et al. 2014)
	Solvente	Metanol 80 % (v/v, em água) a 22 °C por 5 min (vórtex).	3,4 mg.g ⁻¹ (pureza não mencionada)	(Bentes & Mercadante 2014)
<i>Eucommia ulmoides</i>	Irradiação; Ação enzimática; Solvente; Ultrassom	Irradiação do extrato aquoso (500 W por 10 min); aplicação de celulases da Imperial Jade Bio-Technology Co. (40 °C e pH 4 por 24 h); Etanol; Ultrassom (250 W por 30 min).	1,71 μ mol.g ⁻¹ de casca = 0,39 mg.g ⁻¹ de casca (pureza não mencionada)	(Lili Li et al. 2015)
<i>Apodytes dimidiata</i>	Solvente	Aplicação de iclorometano sobre 2,5 kg de casca.	140 mg = 0,056 mg.g ⁻¹ de casca (pureza não mencionada)	(Drewes et al. 1996; Kayonga 1996)

Fonte: elaborado pela autora.

É relevante ressaltar que protocolos que utilizam diretamente o geniposídeo como fonte de genipina não estão abrangidos nesta dissertação, visto que ao partir de um extrato purificado o rendimento de genipina será considerado extrapolado para comparação com extrações partindo diretamente de frutos. Sendo assim, todos os exemplos de extrações de genipina citados nesta revisão e neste estudo mencionam somente rendimentos de extrações que partem inteiramente de extratos vegetais.

1. 2.1.3.1 Extração por ação enzimática

A extração da genipina por hidrólise enzimática é feita basicamente por ação de β -glicosidasas, principalmente quando se utiliza o geniposídeo como fonte (Endo & Taguchi 1973). Porém, a enzima β -glicosidase possui um custo relativamente elevado, por isso é grande o emprego de celulases fúngicas comerciais, que contêm β -glicosidasas em seu complexo enzimático (Winotapun et al. 2013) (Figura 4). Dessa forma, como a molécula de genipina e de geniposídeo diferem somente no C⁻¹, onde a segunda apresenta uma unidade de glicose e a primeira não, a genipina é formada após a clivagem e liberação da porção glicosídica do geniposídeo (Ramos-de-la-Peña et al. 2016).

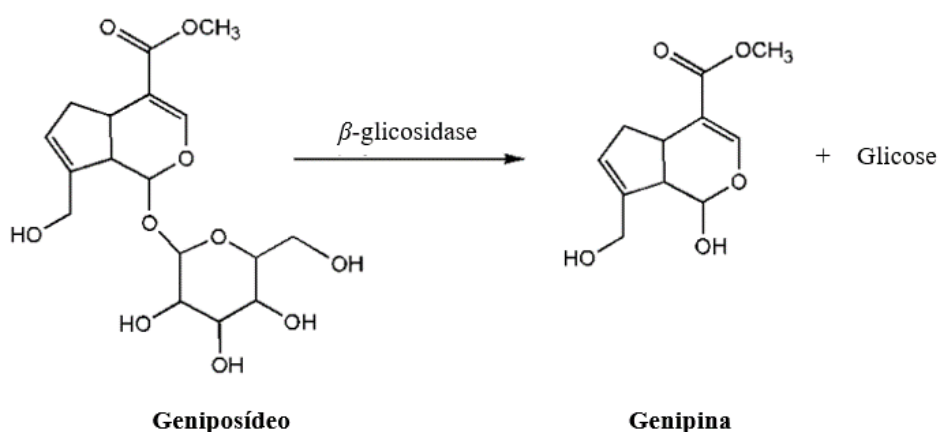


Figura 4. Hidrólise do geniposídeo e formação da genipina por ação da β -glicosidase. Fonte: adaptado de Xu et al. (2015).

Alguns estudos apresentam resultados menores de conversão de genipina utilizando enzimas com outras atividades catalíticas semelhantes ao das β -glicosidasas, como é o caso das β -dextranases ($1,18 \mu\text{mol.g}^{-1}$) e das xilanases ($1,22 \mu\text{mol.g}^{-1}$) (Lili Li et al. 2015). Já, quando empregadas outras enzimas sem auxílio de nenhum outro tratamento, como por exemplo o emprego de β -glicanases, α -glicosidasas ou

amilomaltases, estas não apresentam nenhum benefício significativo na extração de genipina (Cho et al. 2006).

É importante ressaltar que a técnica enzimática pode ser instável quando combinada com técnicas agressivas para as enzimas, o que ocorreu no estudo de Ramos-de-la-Peña e colaboradores (2015), os quais relataram que a utilização de pectinases em extrações com alta pressão (130 MPa) podem favorecer a inativação da atividade catalítica das enzimas, em particular das pectinases, neste caso utilizando a enzima comercial Pectinex Ultra SP-L® (Novozymes). Portanto, a combinação de diferentes técnicas com a ação enzimática deve ser estudada caso a caso.

Até o momento, a maior concentração de genipina extraída, utilizando a ação enzimática, foi alcançada por Winotapun e colaboradores (2013), totalizando 58,83 mg.g⁻¹ (85 % de pureza). Concentração essa obtida a partir da *Gardenia jasminoides*, submetida a um tratamento combinado de enzimas e solventes. Na extração, foram empregadas celulasas, as quais atuaram em uma concentração de 1 % (m/v) em meio bifásico contendo acetato de etila e solução aquosa (1:1, v/v), por 24 horas, a 50 °C e pH 4. Segundo os pesquisadores, o uso de celulasas auxilia na extração da genipina devido à ação simultânea de rompimento das células vegetais e de liberação das moléculas de açúcar presentes no geniposídeo.

Por outro lado, a maior concentração de genipina extraída partindo da *Genipa americana* (jenipapo) e empregando enzimas é de 7,85 mg.g⁻¹, obtida por Ramos-de-la-Peña e colaboradores (2014). O tratamento foi conduzido por ação ultrassônica a 10 °C por 15 min seguida de ação enzimática empregando pectina metil esterases fúngicas. Segundo os pesquisadores, tanto a baixa temperatura do processo de ultrassom quanto o tratamento enzimático evitaram a reticulação típica da genipina com proteínas.

A pectina metil esterase é capaz de hidrolisar ligações éster metílicas da pectina, liberando metanol e ácido péctico. Após, se adicionado um sal de cátion bivalente (como, Ca²⁺) há a formação de ligações cruzadas entre os polímeros de ácido péctico formados previamente pela enzima (Ni et al. 2005). No caso da extração de Ramos-de-la-Peña e colaboradores (2014), eles também relatam a formação de complexos após a adição de CaCl₂, porém entre polissacarídeos pécticos e proteínas. Assim, a presença de pectina metil esterases pode ser uma estratégia para evitar a presença de proteínas livres no meio reacional e, conseqüentemente, retardar a possibilidade de reticulação entre a genipina e proteínas, uma etapa importante para se obter altos teores de genipina.

2. 2.1.3.2 Extração com solventes

É possível notar que até o ano de 2011 a maioria das extrações de geniposídeo ou de genipina eram realizadas somente com solventes (Djerassi et al. 1960; Zhou et al. 2005; Wang et al. 2011). Atualmente, a utilização de solventes combinados com outros métodos é a mais empregada (Yang et al. 2011; Wang et al. 2012; Winotapun et al. 2013; Dong et al. 2014; Zhu et al. 2014). Além disso, entre os métodos combinados, a extração de genipina com solventes mais utilizada é a líquido-líquido em sistema aquoso bifásico (SAB) (Yang et al. 2011; Winotapun et al. 2013; Zhu et al. 2014; Wan et al. 2014).

O sistema de duas fases é preferido devido às diferentes polaridades da genipina e do geniposídeo. O geniposídeo, por conter uma molécula de glicose em sua estrutura, é mais polar que a genipina (Zhou et al. 2005). Assim, como a genipina é mais apolar, garante-se que ao empregar o sistema bifásico ela seja encontrada em maior quantidade no solvente mais apolar e o geniposídeo no solvente mais polar.

Alguns trabalhos utilizam o clorofórmio, porém quando empregado em processos industriais esse solvente orgânico requer muitas etapas posteriores de purificação, que, segundo Ramos-de-la-Peña e colaboradores (2014), encarecem e dificultam a obtenção do produto final (Yang et al. 2011; Dong et al. 2014). Alternativamente, há outros solventes que podem ser utilizados que também são capazes de separar o geniposídeo/genipina de forma eficaz.

Zhu e colaboradores (2014) testaram diferentes solventes para a formação de um sistema bifásico. Neste trabalho, eles formaram o sistema utilizando água e quatro possíveis solventes orgânicos: éter de petróleo, clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol, em uma relação 4:1 (v/v). Para isso, quantidades iguais de geniposídeo e genipina foram acrescentadas nestes sistemas a fim de avaliar a capacidade dos solventes de captar ambos os compostos para suas fases. Eles verificaram que, quando os sistemas foram criados contendo éter de petróleo e clorofórmio, ambos captavam para suas fases altos teores tanto de genipina quanto de geniposídeo, não sendo efetivos para separação dos mesmos. Já ao empregar o *n*-butanol e o acetato de etila, ambos apresentaram similar teor de genipina em suas fases (aproximadamente 76 %), porém, o sistema contendo acetato de etila captou maiores teores de geniposídeo na fase aquosa do que o empregado *n*-butanol (76,5 % e 72,8 %, respectivamente). Como na maioria das extrações, principalmente as de biossíntese, a permanência do geniposídeo na fase

aquosa é crucial para garantir uma contínua hidrólise do mesmo e produção de genipina, e devido ao acetato de etila também promover a permanência da genipina em sua fase, cada vez mais trabalhos têm utilizado este solvente para a sua obtenção.

A extração com solventes mais eficiente para obtenção de genipina, atualmente conhecida, foi alcançada por Winotapun e colaboradores (2013), empregando a *Gardenia jasminoides* em um sistema bifásico formado por tampão e acetato de etila; extração essa também destacada no item 2.1.3.1 (“Extração por ação enzimática”). Enquanto isso, a mais alta concentração de genipina extraída utilizando somente solventes a partir da gardênia foi de 21,1 mg.g⁻¹, realizada em tampão de pH neutro (Wang e colaboradores 2011). A partir do jenipapo, a melhor concentração de genipina extraída foi de 10 mg.g⁻¹, obtido por Djerassi e colaboradores (1960), empregando éter e hexano.

3. 2.1.3.3 Extração com ultrassom

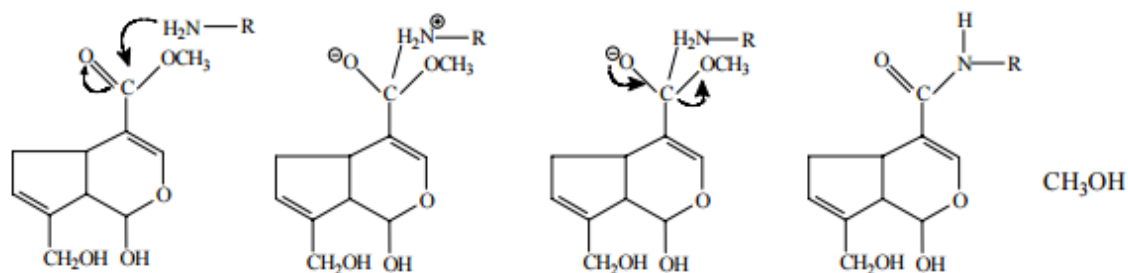
Algumas técnicas de extração de genipina estão associadas ao uso do ultrassom (Ramos-de-la-Peña et al. 2014; Li et al. 2015; Ramos-de-la-Peña et al. 2015). O sistema é baseado na transformação da energia elétrica em energia mecânica, no qual transdutores ultrassônicos provocam vibrações mecânicas em diferentes frequências capazes de se propagar com o material que estiver em contato. Através de sua utilização, ondas ultrassônicas são criadas propiciando o rompimento de células e a formação de cavitações na parte interna do material empregado (Chemat et al. 2011). Dessa forma, o acesso aos componentes do material é facilitado e vantagens como menor tempo de extração e maior rendimento são visualizadas (Melecchi et al. 2006).

A maior concentração de genipina extraída com o uso de ondas ultrassônicas foi realizada por Ramos-De-La-Peña e colaboradores (2014), a partir do jenipapo, aplicando o ultrassom nas condições de 285 W, 24 kHz, 10 °C por 15 minutos e seguido da ação de pectina metil esterases. Enquanto que para a espécie *Gardenia jasminoides* a técnica ainda não foi aplicada para obtenção de genipina partindo diretamente do seu fruto.

2.1.4 Mecanismo de reação da genipina com aminas primárias

A genipina é bastante reativa frente a grupamentos amino, no qual dois possíveis mecanismos de reação são propostos na literatura (Figura 5).

Esquema da reação 1



Esquema da reação 2

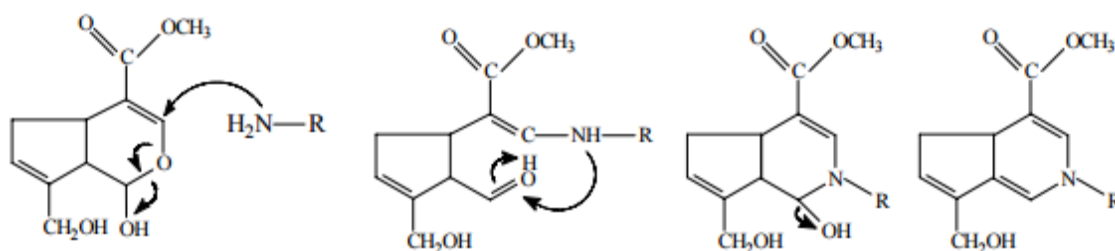


Figura 5. Possíveis reações da genipina com grupamentos amino. Fonte: Adaptado de Butler et al. (2003) por Bispo (2009).

No Esquema da reação 1, através de um ataque nucleofílico no C⁻¹ da genipina, ocorre a ligação do grupamento amino ao grupamento éster da genipina. Assim, há a formação de uma amida e um composto metílico é liberado. Na segunda proposta (Esquema da reação 2), o mecanismo de reação de reticulação do grupamento amino inicia-se pelo ataque nucleofílico do mesmo ao C-3 da genipina. Esse ataque gera uma abertura no anel di-hidropirânico da genipina e a consequente formação de um grupamento aldeído intermediário na molécula. O grupamento aldeído intermediário, por sua vez, reage com a amina secundária recém formada, gerando um novo composto heterocíclico (Butler et al. 2003; Kuo & Lin 2006).

2.1.5 Aplicações da genipina

A genipina possui ampla faixa de aplicação. Não só é reconhecida como um agente reticulante, utilizado para imobilizar enzimas e quantificar aminoácidos, por exemplo, como é empregada para fins medicinais e também de coloração.

4. 2.1.5.1 Genipina como agente de ativação natural

Na indústria bioquímica e na área médica, a genipina é conhecida como um agente de ativação natural capaz de associar-se covalentemente à diferentes materiais

(como quitosana, gelatina, colágeno, caseína e etc.) (Muzzarelli 2009; Lin et al. 2013; Chen & Yao 2011; Silva et al. 2008; Sundararaghavan et al. 2008; Song et al. 2009). A adição desses agentes é denominada de ativação (ou reticulação) e tem como intuito aumentar a estabilidade química e física do material empregado. Além disso, a genipina agrega ao material a possibilidade de reações bifuncionais (Mendes, De Castro, et al. 2011; Li & Bai 2005). Devido a essas propriedades, a de reticular e a de ativar o material para reagir, pode ser utilizada com diferentes finalidades, como para imobilizar enzimas, para quantificar aminoácidos, para encapsular substâncias, para estabilizar emulsões óleo-água, para conferir estabilidade hidrotérmica ao couro, para liberação gradativa de fármacos em regiões específicas, na constituição de próteses, como bioadesivo, no tratamento de ferimentos cutâneos e como possível substituto de *stents* metálicos (Peng et al. 2014; Ramos-Ponce et al. 2010; Chen et al. 2009; da Silva 2008; Sung et al. 1999).

No caso específico da quitosana, a adição de pequenas quantidades de genipina a alguns desses materiais pode aumentar significativamente a elasticidade do produto e sua resistência em meios ácidos (Peng et al. 2014). O aumento da estabilidade ocorre devido a reação formar ligações resistentes (ligações covalentes) entre os materiais. Na Figura 6 pode ser observada a reticulação da genipina com a quitosana, onde há o ataque nucleofílico do grupo amino da quitosana à carbonila da genipina (C^{-1}), o que forma uma ligação amida estável. Em seguida, há a substituição do oxigênio da estrutura cíclica da genipina por um nitrogênio da quitosana e assim estarão reticuladas (Mendes, de Oliveira, et al. 2011).

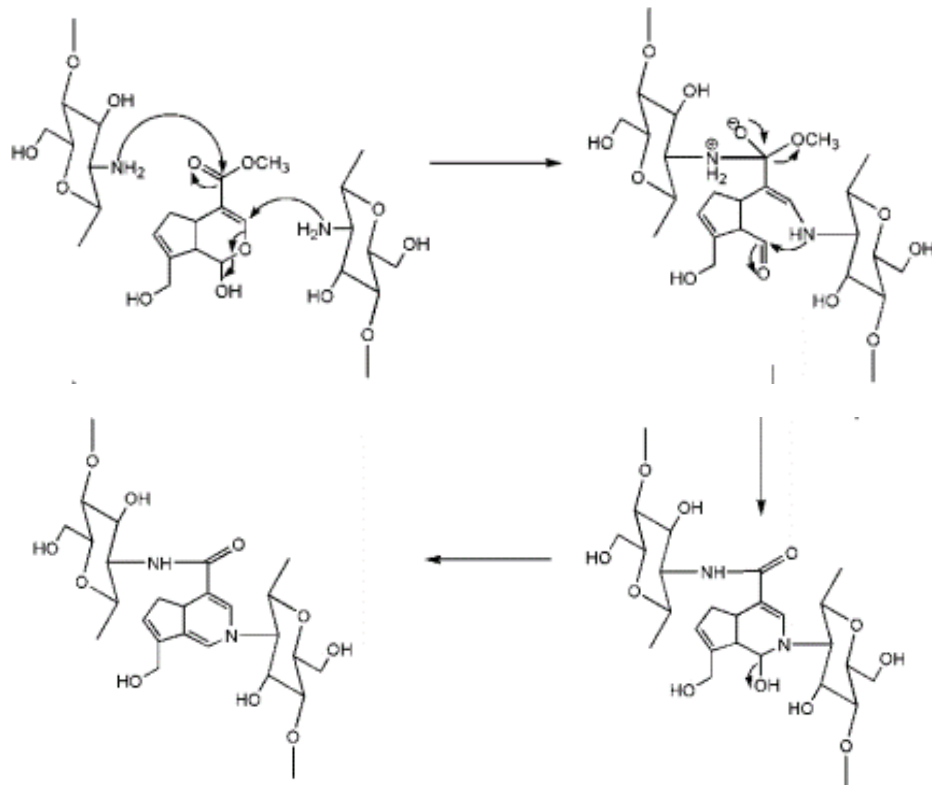


Figura 6. Mecanismo de reticulação da quitosana com genipina. Fonte: Xu et al. (2015).

Diversas evidências relatam a adição da característica de estabilidade aos materiais reticulados com a genipina. Na área biomédica, uma quantidade maior de estudos relatam o uso da genipina como agente de ativação para aumento da estabilidade. Resultados encontrados por McGann e colaboradores (2016) indicam que essa maior flexibilidade conferida pela genipina também pode ser visualizada no seu emprego em cartilagens, com a finalidade de aumentar suas propriedades de resistência à degradação química e ao desgaste mecânico. Os resultados indicaram que o uso da genipina reduziu significativamente a taxa de degradação do colágeno devido a um menor desgaste mecânico da cartilagem. Quando reticulado com genipina, o material apresentou uma rigidez aproximadamente 159 % superior do que quando comparada com o controle, após 6 horas de tratamento. Kirking e colaboradores (2014) estudaram algo semelhante. Eles mostraram o ganho de resistência em materiais reticulados com genipina. Neste estudo a reticulação da genipina com a parte lamelar de uma estrutura óssea apresentou um aumento da resistência óssea 59 % superior ao controle. Ambos os trabalhos sugerem que a reticulação, tanto com o colágeno quanto com a lamela óssea, possa ser um tratamento preventivo promissor para retardar a progressão de degenerações, como ocorre em traumatismos articulares (osteoartrite). Outra aplicação comprovada na área biomédica foi realizada por Sung e colaboradores (2001), através

de um experimento que avaliava a fixação da genipina e do glutaraldeído a um tecido biológico estéril e liofilizado. Neste estudo, a reticulação foi avaliada através da concentração de grupamentos amino livres no sistema por até 6 meses. Nesse período, a genipina mostrou ser um melhor agente, já que a presença de grupamentos amino livres no sistema com glutaraldeído chegou a atingir aproximadamente 6 moles de NH_2 por mol de colágeno, enquanto que na reticulação da genipina apenas 3 moles foram detectados. Logo, a genipina possui uma capacidade de fixação à grupamentos aminos cerca de duas vezes superior que o glutaraldeído. Segundo eles, essa variação ocorre devido as diferenças estruturais conferidas pelos diferentes agentes de ativação no momento do *crosslinking* (também conhecido como ativação/reticulação).

2.1.5.2 Outras aplicações da genipina

2.1.5.2.1 Genipina como corante

A genipina também pode ser uma possível fonte de corante, tanto para ser utilizada no tingimento de peças da indústria têxtil quanto para coloração de produtos de alimentícios (Damasceno & Francisco 2010). Apesar de ser utilizada na Ásia como corante alimentício (Akao et al. 1995), ainda não é reconhecida atualmente pelo órgão *FDA (Food and Drug Administration)*.

No ano de 2014, o questionamento do uso da “Gardenia yellow” (extrato da *Gardenia jasminoides* Ellis com alto teor de crocetina e crocina) e conseqüentemente da genipina foi avaliado pelo comitê de peritos em aditivos alimentares (JECFA, *Joint Expert Committee on Food Additives*) do *Codex Alimentarius* pela primeira vez. Os peritos relataram que o pó obtido da gardênia, submetido à indagação, ainda não teria sido submetido a um teste toxicológico ou carcinogênico de longo prazo, representativo e reconhecido internacionalmente, e, por essa razão, ainda não poderia ser aprovado. Segundo eles, para a aprovação desse produto algumas especificações ainda devem ser estabelecidas. Entre elas estão a necessidade de informações sobre seu processo de fabricação (incluindo etapas de purificação, avaliação de perdas na secagem, métodos de análise), dados analíticos sobre a composição dessa substância (incluindo a quantidade total de matéria corante), dados analíticos dos compostos relevantes para a atividade biológica conhecida, tais como o geniposídeo e a genipina, dados analíticos de, pelo menos, cinco lotes diferentes de materiais comerciais que suportem essas

especificações e, por fim, dados sobre a estabilidade dos componentes em questão testados em alimentos.

Em seguida, em março de 2015, a Colômbia redigiu ao JECFA uma solicitação para produzir o “Extracto de jagua (*Genipa americana*)”. A empresa ECOFLORA CARES S.A.S pretende fabricar o extrato e tem como intuito utiliza-lo na indústria alimentícia como corante azul. A empresa ainda sugere a aplicação de 100 mg a 300 mg do extrato para um quilograma de produto. Segundo o solicitante, a inclusão do extrato é pertinente, visto que na Colômbia a utilização da preparação já é autorizada pelas suas autoridades sanitárias (*Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, INVIMA*) desde março de 2014, a qual foi já avaliada pelo *Comité Especializado de Alimentos y Bebidas* do país.

O corante é obtido a partir da genipina, apesar de a mesma ser incolor ou amarelada quando isolada, quando reage com grupamentos amino se torna uma possível fonte de pigmento, que pode variar entre os tons violeta e o azul-escuro (Touyama et al. 1994; Ono et al. 2007). O primeiro uso da genipina como corante foi visualizado pelos índios. Segundo descrito no livro “*Brasil, amor à primeira vista!: viagem ambiental no Brasil do século XVI ao XXI*” por Marcondes (2005), Hans Staden publicou um livro em 1557, intitulado “*Hans Staden: The True Story of His Captivity, 1557*”. No livro, o alemão Hans, aprisionado durante nove meses por índios Tupinambás na região de São Paulo, relata as primeiras informações sobre os habitantes, a fauna e a flora no Brasil, entre elas, a característica colorífica do jenipapo:

“Numa árvore que os selvagens chamam de jenipapo ivá, cresce uma fruta que tem certa semelhança com a maçã. Os selvagens mascam essa fruta e espremem o suco dentro de um vaso. Com ele é que se pintam. Quando esfregam o suco sobre a pele, no início parece água. Mas depois de algum tempo a pele fica tão preta como se fosse tinta. Isso perdura até o nono dia. Depois a cor desaparece, mas não antes desse prazo, mesmo quando eles se lavam muitas vezes”.

Através do corte do jenipapo e oxidação da fruta, os índios realizavam pinturas corporais, em artesanatos e em tecidos com o extrato por acreditarem em suas propriedades medicinais (Winotapun et al. 2013). Bentes e colaboradores (2015) estudaram a formação do pigmento do jenipapo expondo os frutos ao ar por duas horas,

e comprovaram que os aminoácidos presentes no fruto não participam da formação do pigmento, já que as quantidades de aminoácidos presentes nas amostras antes e depois da oxidação do fruto não apresentaram diferenças significativas. Segundo Paik e colaboradores (2001), o pigmento possui características peculiares, exibe alta estabilidade ao calor, à presença de luz e à mudanças de pHs, muito mais estável que a ficocianina, um pigmento azul extraído de algas azul-esverdeadas, pertencentes aos filós das cianobactérias, rodofitas e criptofitas (Fujikawa et al. 1987; Eriksen 2008).

Devido a essa coloração, a genipina pode ser empregada como uma ferramenta alternativa e simples para quantificação de aminoácidos, através de análises em espectrômetro (Lee et al. 2003). Além disso, muitos trabalhos já visam a sua produção como corante: produção do pigmento para tingimento de produtos têxteis (Cho et al. 2006); pigmento solúvel em água confeccionado utilizando proteína do ovo (Yang et al. 2012); pigmento azul produzido à base de taurina (Koga et al. 1989); pigmento azul produzido à base de metilamina (Touyama et al. 1994); e pigmento azul à base de glicina (路易斯·费尔南多·埃切韦里 et al. 2015; Fujikawa et al. 1987) - sendo algum desses resguardados por patentes. Segundo Renhe e colaboradores (2009), a maior quantidade do pigmento a partir da trituração do jenipapo é obtida em extrações carregadas em pH 4, empregando solventes etanólicos e também água, a 75 °C e 55 °C, respectivamente. Conforme identificado por Bentes e colaboradores (2014), a formação do pigmento ocorre em maior intensidade na maturação verde do jenipapo. A intensidade de diferentes corantes azuis pode ser visualizada na Figura 7.

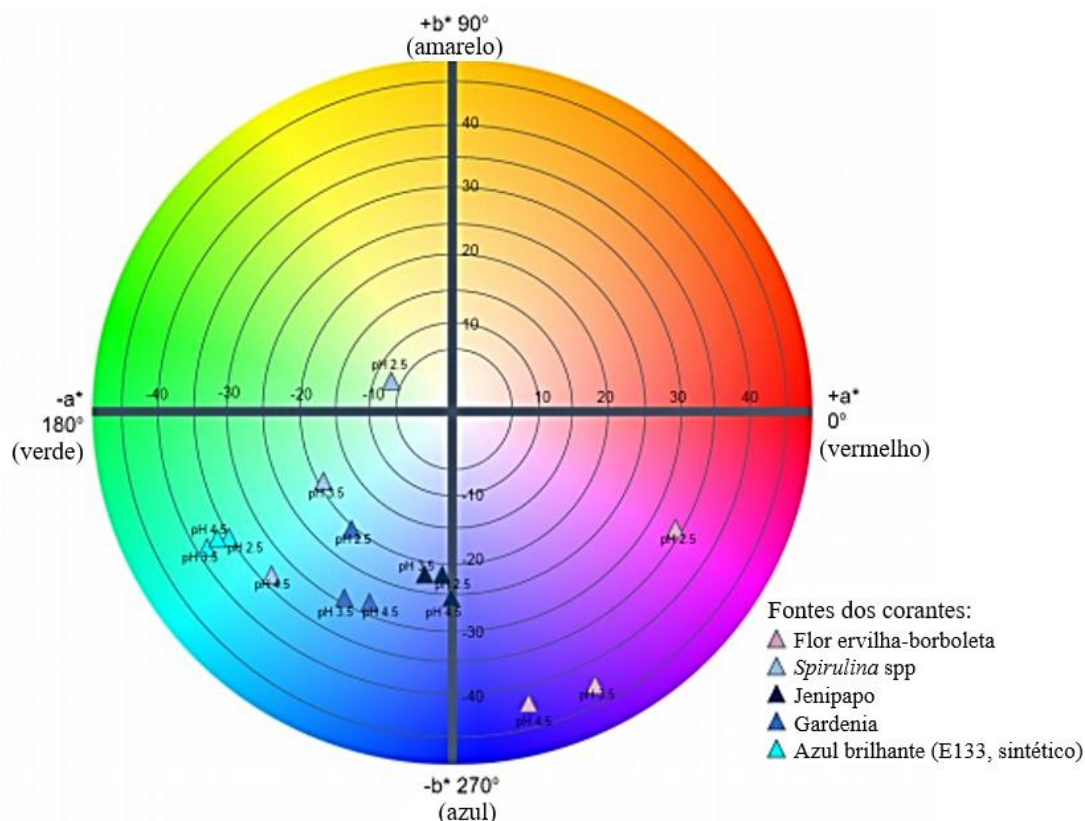


Figura 7. Roda de cores (hue^* angle, saturação da cor) mostrando os possíveis candidatos à corantes alimentares, intensidade avaliada após 28 dias a 25 °C em diferentes pHs. Fonte: adaptado de Lavinia et al. (2015).

A coloração azul formada, assim como as cores amarela e vermelha, é uma cor primária utilizada para criar muitas outras, como a verde e a violeta. Atualmente, a não existência de um pigmento azul natural estável permitido em alimentos é um agravante para essa indústria, que hoje somente utiliza corantes azuis sintéticos em seus produtos, como o azul brilhante (E133) e o indigotina (E132) (Renhe et al. 2009; Penalber et al. 1996). Porém, Lavinia e colaboradores (2015) provaram ser possível a produção de diferentes corantes azuis a partir de fontes vegetais distintas: jenipapo, gardênia, *Spirulina* spp e flor ervilha-borboleta. Neste estudo, constataram não só que a gardênia, a *Spirulina* spp e o jenipapo são ótimas fontes de pigmentos azuis, como a coloração obtida do jenipapo se destaca por ser mais estável que os outros em diferentes pHs (pH 3,5, pH 2,5 e pH 4,5).

Em relação às cores amarela e vermelha, ambas já possuem fontes naturais para formação de pigmentos menos tóxicos, como betaxantinas/curcumina e betacianinas/cochonilhas americanas (insetos), respectivamente (Volp et al. 2009). Resta agora aguardar que novos estudos sejam realizados com a genipina para que ela possa se tornar um aditivo alimentar permitido.

2.1.5.2.2 *Genipina como agente medicinal natural*

Ambos os iridoides, no geral, possuem atividades farmacológicas e podem ser destacados pelos seus potenciais antiinflamatório, analgésico, antibacteriano, antifúngico e antitumoral, além de apresentar possíveis atividades sedativas, tranquilizantes, hepatoprotetoras e indutoras de sono (Nascimento 2008). Sendo assim, a genipina, entre outras aplicações, também é reconhecida por apresentar diferentes ações medicinais (Yang et al. 2011).

Estudos apontam que a genipina é capaz de alterar a atividade da proteína desacopladora UCP-2, presente na membrana interna da mitocôndria, que está diretamente envolvida na regulação negativa da secreção de insulina, estimulando a secreção da mesma. Como a atividade da UCP-2 também está envolvida no desenvolvimento de vários tipos de desenvolvimento de câncer, a genipina pode ser utilizada tanto como um agente indireto no combate da *diabetes mellitus*, quanto no tratamento de alguns cânceres (Zhang et al. 2006). Além disso, o emprego da genipina pode aumentar a expressão de um receptor responsável pela proliferação de peroxissomas, que são capazes de inibir moléculas de adesão celular vasculares responsáveis por aderir células de linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos ao endotélio vascular, evitando assim o possível desenvolvimento da aterosclerose (Hwa et al. 2011; Alves & Ming 2015). Através da regulação dos ciclos de glicólise/gliconeogênese e do ciclo de Krebs, pode auxiliar em tratamentos contra depressão (Chen et al. 2015). E ainda, é citada por apresentar efeitos antitrombóticos, proporcionar proteção contra lesões hepáticas e possuir a capacidade de inibir lesões gástricas (Suzuki et al. 2001; Lee et al. 2009).

2.2 JENIPAPO (*GENIPA AMERICANA* LINNAEUS)

O jenipapeiro pertence à família Rubiaceae e subfamília Ixorideae (Martins & Nunez 2015). A sua árvore pode alcançar até 12 m de altura, possui diâmetro de caule de aproximadamente 60 cm, apresenta uma ampla copa com muitos ramos e suas folhas são pecioladas lisas de 20 cm a 42 cm de comprimento por 9 cm a 16 cm de largura, que apresenta coloração cinza a esverdeada (Figura 8) (Corrêa & Penna 1984; Estrella & Botto 1995).



Figura 8. Jenipapeiro. Fonte: Francis (1993).

De nome científico *Genipa americana* Linnaeus, o jenipapo também é conhecido como jagua, chipara, guayatil, maluco, caruto, huito ou jenipá, do Tupi-guarani “jandipap”, que significa fruto que serve para pintar (Fernandes & Rodrigues 2012; da Silva et al. 2009). É considerado uma espécie nativa amplamente distribuída, encontrada tanto na América Central (região caribenha) quanto no norte da América do Sul (no Brasil, da Amazônia até o estado de São Paulo), como pode ser visto na Figura 9 (Francis 1993).



Figura 9. Distribuição geográfica do jenipapo (destacada em cinza). Fonte: Adaptado de Francis (1993).

O fruto do jenipapeiro, o jenipapo, é aromático, elíptico, podendo apresentar de 8 cm a 10 cm de comprimento e 6 cm a 8 cm de diâmetro e possui casca fina rugosa e polpa adocicada com inúmeras sementes (da Silva et al. 2010). Devido a sua capacidade de crescimento em áreas temporárias ou permanentemente inundadas ou degradadas,

seu plantio pode ser tanto utilizado para biorremediação quanto como uma alternativa de renda e alimentação em regiões menos beneficiadas (Lorenzi 1992).

A safra do jenipapo acontece nos meses de março a julho, sendo a maior produção no mês de maio. Em maio, 39,1 % da produção brasileira da fruta é proveniente do estado de São Paulo. No estado do Espírito Santo, o município de Itaguaçu lidera a comercialização com 10.670 quilos, seguido de Cariacica com 4.002 quilos, Santa Leopoldina com 2.660 quilos, Viana com 1.785 quilos, Laranja da Terra com 1.580 quilos, Santa Maria de Jetibá com 1.220 quilos e de Domingos Martins com 810 quilos (Mansur 2012).

Quanto à sua produtividade, a produção anual deste fruto não é conhecida, porém estima-se que cada árvore bem desenvolvida possa render até 140 Kg de jenipapo (Gomes et al. 2010). O jenipapo é um dos destaques no mercado Central de Abastecimento do Espírito Santo (Ceasa/ES), empresa vinculada à Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca (SEAG) do Espírito Santo. Desde 2002, quando o jenipapo foi cadastrado na Ceasa/ES, até 2012, estima-se que já foram vendidos 39.217 quilos da fruta. A movimentação financeira, comercializando o jenipapo a um preço médio de R\$ 1,50 o quilo, foi de R\$ 80.556,98, o dobro da quantia do ano de 2011 (CampoVivo 2012).

Mesmo assim, como a maioria das frutas tropicais, o jenipapo é altamente perecível, inutilizando-se em poucos dias, um empecilho para a sua comercialização (Alves, R. E.; Chitarra, A. B.; Chitarra 1995). Uma possível alternativa para aumentar ainda mais sua comercialização seria sua industrialização através do comércio da fruta seca ou em pó, como é feito com a *Gardenia jasminoides* na Ásia (de Figueiredo et al. 1986). Hoje, o jenipapo é utilizado principalmente para produção de bebidas e na preparação de compotas (Fernandes & Rodrigues 2012; da Silva et al. 1998; da Silva et al. 2009).

2.2.1 O estágio de maturação do jenipapo e sua composição

A composição do jenipapo varia de acordo com o seu estado de amadurecimento. O peso do fruto é de aproximadamente 198 g (sendo 11,5 g da casca e 67,5 g das sementes) (Figueiredo et al. 1986). Quando ainda não maduro, a casca do jenipapo possui coloração verde e, com o seu amadurecimento, apresenta cor amarela-alaranjada. Quanto a polpa, é clara quando verde, com pontos azuis quando o fruto está

amadurecendo e amarelada quando está “de vez” (início do amarelecimento da casca) ou maduro (Rodrigues & Renhe 2008). A ilustração do amadurecimento do fruto pode ser observada na Figura 10.

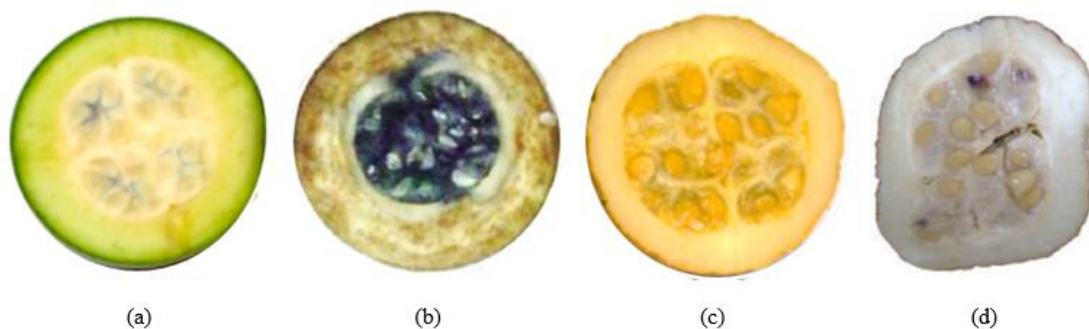


Figura 10. Aspecto da polpa do jenipapo em diferentes fases de amadurecimento: verde (a), verde oxidado (b), “de vez” (c) e maduro (d). Fonte: adaptado de Bentes & Mercadante (2014), Rodrigues & Renhe (2008) e Queiroz et al. (2012).

Bentes & Mercadante afirmam que o estado de amadurecimento do jenipapo está diretamente relacionado com o seu teor de iridoides e de compostos fenólicos (2014). Segundo eles, no estágio verde de maturação o fruto possui 90 % mais iridoides do que quando maduro. Assim, o jenipapo é caracterizado quimicamente pela presença de iridoides na sua composição. O primeiro iridoide isolado deste fruto foi a genipina, em 1960 por Djerassi e colaboradores. Mais tarde, em 1972, Guarnaccia e colegas extraíram das folhas do fruto o ácido geniposídico, e dezenove anos depois, em 1991, Ueda e colaboradores isolaram vários iridoides, entre eles um importante iridoide glicosilado, conhecido como geniposídeo. Atualmente a lista de iridoides presentes no jenipapo é muito maior, sendo os principais destacados na Figura 11.

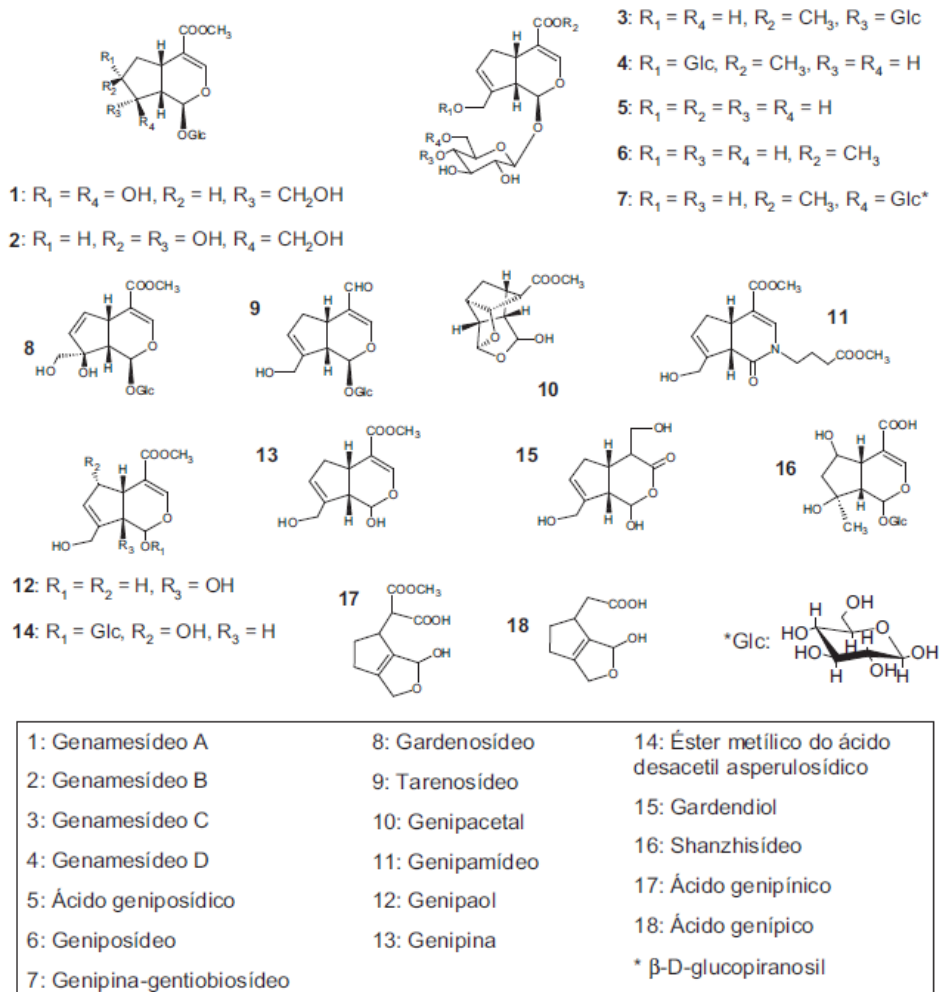


Figura 11. Iridoides identificados no jenipapo. Fonte: Bentes (2014).

Os frutos da família Rubiaceae, como um todo, são caracterizados por possuir altos teores de iridoides. Estes compostos fazem parte do metabolismo secundário dos vegetais e atuam como defensores durante a interação planta e animais herbívoros.

Desde a descoberta da genipina, muitos constituintes presentes no jenipapo já foram identificados. Nele também são encontrados os ácidos carboxílicos, como butanóico, hexadecanóico, bem como os ésteres etílicos 2- e 3-metilbutanóicos, que segundo Borges & Rezende (2000), são compostos que estão diretamente relacionados ao odor forte e primário do fruto. Já em outros estudos, como no de Pino e colaboradores (2005) e no de Pinto e colaboradores (2006), outros compostos além de ácidos carboxílicos foram identificados, como o linalol, o limoneno e mais 32 constituintes voláteis presentes no jenipapo. Vale ressaltar que a composição do jenipapo dependerá da época de colheita, do estágio de maturação do fruto, da sua

origem geográfica (características do solo e clima) e do fenótipo da espécie (UNCTAD 2005).

Além disso, o jenipapo apresenta elevados teores de glicose, celulose, carboidratos, umidade, sólidos solúveis, iridoides e compostos fenólicos na sua composição (Gabriela et al. 2008). Em contrapartida, possui baixos teores de proteína, pectina, lipídeos e cinzas (Hamacek et al. 2013). A composição centesimal do jenipapo em diferentes estados de maturação é listada na Tabela 3.

Tabela 3. Composição centesimal do jenipapo (*Genipa americana* L.) nos estágios de maturação verde, “de vez” e maduro.

Composto	Estágio de maturação	Composição ^a	Referência
Glicose	verde	47,0	(Martina, 1931, citado por Figueiredo et al. 1986)
	maduro	49,81	(Martina, 1931, citado por Figueiredo et al. 1986)
Celulose	verde	45,3	(Martina, 1931, citado por Figueiredo et al. 1986)
	maduro	32	(Martina, 1931, citado por Figueiredo et al. 1986)
Carboidratos	verde (mesocarpo)	15,8	(Bentes 2014)
	verde (endocarpo)	10,5	(Bentes 2014)
	maduro (mesocarpo)	22,7	(Bentes 2014)
	maduro (endocarpo)	26,2	(Bentes 2014)
	maduro	67,0	(Pacheco & Pascoal 2014)
Fibras	maduro	20,9	(Pacheco & Pascoal 2014)
Pentaglicose	verde	0,5	(Martina, 1931, citado por Figueiredo et al. 1986)
	maduro	10,1	(Martina, 1931, citado por Figueiredo et al. 1986)
Proteínas	verde (mesocarpo)	1,6	(Bentes 2014)
	verde (endocarpo)	1,8	(Bentes 2014)
	maduro (mesocarpo)	0,7	(Bentes 2014)
	maduro (endocarpo)	0,7	(Bentes 2014)
	maduro	0,7	(Porto et al. 2014)
Lipídeos	verde (mesocarpo)	1,2	(Bentes 2014)
	verde (endocarpo)	1,5	(Bentes 2014)
	maduro (mesocarpo)	0,6	(Bentes 2014)
	maduro (endocarpo)	2,1	(Bentes 2014)
	maduro	1,6	(Porto et al. 2014)
Pectina	verde	traços	(Figueiredo et al. 1986)
	“de vez”	traços	(Figueiredo et al. 1986)
	maduro	traços	(Figueiredo et al. 1986)
Vitamina C	“de vez”	32,0	(da Silva et al. 2009)
	maduro	21,3	(da Silva et al. 2009)
Fenólicos ^b	maduro	587,7	(Pacheco & Pascoal 2014)
Antocianinas ^b	maduro	4,6	(Porto et al. 2014)
Flavonóides ^b	maduro	728,0	(Porto et al. 2014)

^aComposição centesimal (gramas do composto por 100g de base seca de jenipapo); ^bmiligramas em 100 g de base seca de jenipapo. Fonte: elaborado pela autora.

Um dos principais componentes do jenipapo é a glicose (47 % no fruto verde), teor esse que revela a doçura do fruto, similar a maçãs da variedade Fuji (Goularte & Antunes 1999). Por conseguinte, são encontrados altos teores de carboidratos

(aproximadamente 26 % no fruto verde), responsáveis pela doçura do fruto após hidrólise com o passar de seu amadurecimento (Gomez et al. 1999). Na sequência, as fibras alimentares se destacam (21 % no fruto maduro), com diversos benefícios para quem os consome, pois auxiliam na diminuição do risco de desenvolvimento de algumas doenças crônicas não transmissíveis e na prevenção da constipação (WHO 2003; Souza 2007).

Quanto aos compostos bioativos do jenipapo, o fruto não apresenta betacaroteno na sua composição, porém se sobressai pelos teores de vitamina C (32 %) e alta incidência de compostos fenólicos (588 mg por grama do fruto maduro), que repercutem na alta atividade antioxidante do fruto (Tabela 4). Entre os compostos fenólicos existentes no fruto, destacam-se ainda os fenóis naturais, denominados flavonoides (728 mg por grama do fruto maduro), que possuem teores similares ao do fruto pequi (Barreto et al. 2009).

Tabela 4. Parâmetros físico-químicos do jenipapo (*Genipa americana* L.) em diferentes estágios de maturação.

Parâmetro físico-químico	Estágio de maturação	Valores médios	Referência
Umidade	verde (mesocarpo)	80,9	(Bentes 2014)
	verde (endocarpo)	85,7	(Bentes 2014)
	maduro (mesocarpo)	75,3	(Bentes 2014)
	maduro (endocarpo)	70,2	(Bentes 2014)
Cinzas	verde	1,0	(Figueiredo et al. 1986)
	“de vez”	0,9	(Figueiredo et al. 1986)
	maduro	2,2	(Porto et al. 2014)
pH	verde (mesocarpo)	4,7	(Bentes 2014)
	verde (endocarpo)	5,6	(Bentes 2014)
	“de vez”	4,58	(da Silva et al. 2009)
	maduro (mesocarpo)	3,7	(Bentes 2014)
	maduro (endocarpo)	3,7	(Bentes 2014)
	maduro	3,65 - 3,9	(da Silva et al. 2009; Pacheco & Pascoal 2014)
Sólidos solúveis totais (°Brix)	verde	14,0	(de Figueiredo et al. 1986)
	maduro	15,2	(Pacheco & Pascoal 2014)
Acidez total titulável (%) ^a	verde	0,6	(Souza 2007)
	maduro	0,7	(Souza 2007)
Atividade Antioxidante (%) ^b	maduro	70,2	(Pacheco & Pascoal 2014)

^aAvaliado através do percentual de ácido cítrico; ^bPercentual de inibição de oxidação. Fonte: elaborado pela autora.

Em relação às características físico-químicas (Tabela 4), o jenipapo apresenta pH ácido independentemente de seu estágio de maturação, abaixo de 5,7. De modo geral, a indústria alimentícia aprecia alimentos ácidos para processamento porém, o jenipapo geralmente possui baixa aceitação sensorial *in natura* por parte dos consumidores

(Hansen et al. 2008). Por outro lado, o jenipapo possui alto teor de sólidos solúveis totais, assim como o melão (Pandey et al. 2008), valor este diretamente relacionado ao índice de açúcares totais presente em frutos e um indicativo de seu grau de maturação (Hamacek et al. 2013). Segundo Souza (2007), a alta quantidade de sólidos solúveis presente no jenipapo, assim como em outras frutas, é responsável por propiciar um melhor sabor ao fruto e um maior rendimento no processamento do mesmo para elaboração de produtos.

Diferente da maioria dos frutos, o jenipapo possui alta acidez, mesmo quando maduro (similar à acerola), que pode ser ainda maior em jenipapos armazenados a temperatura ambiente durante 28 dias - uma característica que diminui ainda mais seu potencial de ingestão *in natura* (Silva et al. 1998; Hansen et al. 2008; Brasil et al. 2016). Além disso, devido ao seu alto teor de umidade, a conservação do jenipapo *in natura* é dificultada, pela maior probabilidade de contaminação microbiológica e rápida deterioração do fruto (Hamacek et al. 2013).

As concentrações dos macroelementos (cálcio, fósforo, potássio, sódio, cloro, magnésio, enxofre) e dos microelementos (ferro, cobre, cobalto, manganês, zinco, iodo, flúor, molibdênio, selênio, cromo, silício) presentes no jenipapo estão relacionados na Tabela 5. Segundo Hardisson e colaboradores (2001), ambos desempenham papel importante para o desenvolvimento e boa saúde do corpo humano, sendo que as frutas são as principais fontes de minerais na dieta humana.

Tabela 5. Exemplos de minerais presentes na composição do jenipapo (*Genipa americana* L.) em diferentes estágios de maturação.

Mineral	Estágio de maturação	Valores médios ^a	Referência
Potássio (K)	maduro	92,6	(De Souza et al. 2012)
Cálcio (Ca)	verde	46,3	(de Figueiredo et al. 1986)
	maduro	33,4	(de Figueiredo et al. 1986)
Magnésio (Mg)	maduro	8,2	(De Souza et al. 2012)
Fósforo (P)	maduro	0,6	(De Souza et al. 2012)
Ferro (Fe)	maduro	0,2	(De Souza et al. 2012)

^aExpressos em mg de mineral por 100 g de jenipapo. Fonte: elaborado pela autora.

Como pode ser visto acima, o jenipapo possui como mineral majoritário o potássio e o cálcio, nutrientes essenciais e necessários para a manutenção da saúde humana (Beto 2015). Estes seguidos ainda de magnésio, fósforo e ferro, porém em menores concentrações.

Por fim e mais recentemente, Bentes e colaboradores (2015) ainda relataram que o fruto possui altos teores de aminoácidos. Entre os aminoácidos avaliados podem ser encontrados o ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, glicina, histidina, treonina, alanina, prolina, tirosina, valina, metionina, cistina, isoleucina, leucina, fenilalanina e lisina.

2.2.2 Uso popular e propriedades farmacológicas

Na cultura popular, a utilização da polpa do jenipapo maduro é indicada como agente antiasmático, afrodisíaco, antianêmico, tônico, diurético, para o tratamento de icterícias, de feridas externas e de patologias no baço e no fígado, enquanto que a polpa ainda verde possui aplicação como anti-sifilítica e capacidade de curar rupturas de umbigo em recém-nascidos (Delprete et al. 2005; Mors et al. 2000). No estado do Pará (Brasil), é comum seu consumo por índias Kayapos. Elas utilizam a espécie para a preparação de infusões, as quais são consumidas do terceiro até o quinto mês de gestação, pois acreditam que o preparado auxilia na regulação do crescimento do feto (Elisabetsky & Posey 1989). Em relação a casca do jenipapo, é indicada como antiulcerogênica, antidiarréica e para o tratamento de faringites (Mors et al. 2000). Segundo Cravo e colaboradores (Cravo 1995), a casca ainda pode ser utilizada no tratamento da opacidade de córneas, e indicam que seja cortada para liberação de uma goma branca e doce, que deve ser diluída em água e aplicada nos olhos. Já o uso das raízes do jenipapeiro é indicada como agente antigonorréico e para curar faringite e feridas, enquanto que suas folhas, podem ser utilizadas como agente antidiarréico e antisifilíticas após uma decoção, bem como no tratamento de febres, quando maceradas (Mors et al. 2000; Delprete et al. 2005).

Além do uso popular, algumas propriedades farmacológicas do jenipapo já foram comprovadas cientificamente. Furtado (2006) evidenciou que o extrato das folhas do fruto é capaz de inibir o desenvolvimento de verminoses ovinas. Adicionalmente, Bernard e colaboradores (2001) apresentaram o uso do extrato como um potencial anti-inflamatório e Souza e colaboradores relataram sua capacidade inibitória perante enzimas, como tirosinases e α -glicosidases. Do jenipapo ainda podem extraídos alguns compostos que podem beneficiar a saúde humana. Entre eles está o geniposídeo, um iridoide com propriedades antidiabéticas, anti-inflamatórias, antiartrite, antitrombótica e antidepressivas (Xiao et al. 2016).

2.2.3 Importância econômica, ecológica e prospecção tecnológica

A espécie *Genipa americana* L. é uma alternativa de renda para pequenos agricultores, tanto através da comercialização da madeira do jenipapeiro como pela venda de seus frutos. Sua madeira é utilizada na construção civil, marcenaria e na confecção de cabos para ferramentas, e sua casca é utilizada em curtumes com a finalidade de tratar couros, devido à alta concentração de taninos na sua composição. Porém, sua principal forma de comercialização é o fruto, que depois de maduro é utilizado regionalmente para confeccionar doces e bebidas, como vinhos e licores (Lorenzi 1992).

O jenipapeiro tem considerável importância econômica e social para famílias de baixa renda, dada a possibilidade de desenvolvimento em áreas brejosas e degradadas, já que se adapta muito bem à terrenos úmidos. Também é uma espécie presente em programas de reflorestamento com o intuito de fornecer alimentos para a fauna ao seu redor (Coimbra et al. 2006; Valeri et al. 2003). Seus frutos são consumidos por vários animais silvestres, entre eles antas, porcos-do-mato, capivaras e paca-tatu, os quais contribuem com a dispersão natural de ambas as espécie (Lorenzi 1992; Delprete et al. 2005). A disponibilidade do jenipapo aos animais contribui com a manutenção de algumas espécies, como é o caso do *Ramphastos toco*, um tucano que permanece se desenvolvendo no seu *habitat* natural devido a abundância de jenipapos nos períodos de seca na região (Ragusa-Netto 2006).

Atualmente, devido ao seu alto potencial, vários órgãos de pesquisa possuem a espécie em bancos ativos de germoplasma (BAG), como a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Universidade Estadual Paulista (Jaboticabal, SP), a Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia (Cruz das Almas, BA) e a Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola S. A. (Conceição Almeida, BA) (Dantas et al. 2009), sendo que a Embrapa Tabuleiros Costeiros mantém seu BAG de jenipapeiro desde de 2009, e em 2012 obteve cerca 172 acessos oriundos de diversas regiões do país (Almeida 2013). Com relação a atual germinação empregada para manter a espécie, Salla e colaboradores (2016) afirmam que o banco de sementes desenvolvido por eles, em uma área de mata ciliar, apresenta um maior potencial para o estabelecimento das plântulas de jenipapo em ambiente natural, que propicia características ecológicas de acordo com as exigências da espécie. Relatam ainda que após a germinação, as

plântulas se mantêm em desenvolvimento por pelo menos dez meses e somente após este tempo ocorre o surgimento do seu primeiro par de folhas.

Efetuada buscas de artigos com o termo “*Genipa americana*” é possível notar a grandeza da aplicação do fruto, ou de parte do mesmo (exemplo: mesocarpo, endocarpo, etc.), como fonte de compostos bioativos para aplicação em diversos estudos. Conforme estudo dirigido por Moura e colaboradores (2016), utilizando a palavra-chave “*Genipa americana* L.” é possível encontrar 88 patentes registradas nas bases do *European Patent Office*, da *World Intellectual Property Organization*, do *United States Patent and Trademark Office* e no Instituto Nacional de Propriedade Industrial, sendo 5 específicas para o uso do jenipapo como corante. Adicionalmente, apesar da espécie ser amplamente distribuída no Brasil e na América Central, os Estados Unidos e o Japão são os países que mais apresentam números de patentes utilizando o fruto, sendo os anos de 2010, 2011 e 2015 os mais incidentes. Esses índices mostram que a biodiversidade brasileira, que possui relativo potencial econômico, é um atrativo a nível mundial, e hoje, infelizmente, os países que mais investem em pesquisas e os que possuem um maior número de empresas que visam produtos mais naturais são os que possuem maior domínio das patentes de algumas espécies brasileiras (Piedade 2008).

O uso do jenipapo nesta pesquisa de patentes foi visualizado primeiramente para aplicação em produtos para fins médicos, odontológicos e de higiene (código A61K), seguida dos gêneros alimentício (código A23L), de materiais químicos (código CO9B) e de preparações para tratamento de pele e cabelo (código A61Q) (Moura et al. 2016).

2.3 ENZIMAS

As enzimas são proteínas que agem como catalisadores, sustentando a vida através de suas reações bioquímicas (Cech & Bass 1986). São ótimas alternativas perante suas diversas características vantajosas em comparação com catalisadores químicos. São capazes de acelerar e manter equilíbrio químico de reações sem ser consumidas (Cabral et al. 2003). São altamente específicas com relação aos seus substratos, especificidade essa maior ou menor, determinada conforme a conformação e aminoácidos encontrados em seus sítios ativos. Por isso, não são afetadas por reações paralelas e ainda garantem um produto final com pureza mais elevada que os catalisadores convencionais. Por exigirem condições mais brandas de reação, como

temperaturas, pHs e pressões amenas, as enzimas ainda podem contribuir para um menor custo de energia. Além disso, por serem catalisadores biológicos, seu descarte é mais prático e mais sustentável do que os catalisadores químicos (Klibanov 1979).

Embora elas apresentem essas vantagens, alguns empecilhos ainda são encontrados para a sua utilização. A sua atividade enzimática dependerá da manutenção da sua integridade durante o processo em que está inserida. Em condições extremas de reação, como alterações dos parâmetros de temperatura, pH e pressão, se a variável for muito atenuada ou elevada de forma que saia da sua faixa ótima de atuação, haverá grandes chances de a enzima ser desnaturada ou dissociada em duas ou mais subunidades (Johannes & Zhao 2006). Desta forma, a enzima perde suas funções catalíticas, pois suas estruturas proteicas secundária, terciária e quaternária estão comprometidas e são essenciais para sua plena atuação. Outros problemas são relatados na sua aplicabilidade na indústria, como o elevado custo para sua produção e purificação, a não possibilidade de reutilização quando inserida em soluções aquosas e a inibição catalítica em altas concentrações dos próprios produtos de reação. Mas, apesar destes fatores limitantes na sua utilização, muitos desses problemas podem ser superados pela utilização de técnicas de imobilização de enzimas (Krajewska 2004).

2.3.1 Celulases

As celulases são formadas por um complexo enzimático que possui três atividades distintas (Arantes & Saddler 2010). As endoglicanases (ou endo- β ^{1,4} glicanases), responsáveis por catalisar a hidrólise das ligações β ^{1,4}-D-glicosídicas da celulose, liberando oligossacarídeos de pelo menos 6 unidades de glicose. As exoglicanases, as quais agem sobre as extremidades da celulose, e que liberam tanto moléculas de glicose como de celobiose (duas unidades de glicose). As β -glicosidases, que por sua vez, atuam hidrolisando as moléculas de celobiose e assim, liberando unidades de glicose. Apesar de ser um complexo catalítico estável, com o passar da reação, as β -glicosidases podem apresentar perda de sua atividade catalítica, pois são altamente inibidas pelo seu produto, a glicose (Woodward & Arnold 1981).

As celulases são produzidas por diferentes microrganismos, como bactérias e fungos, podendo ser aeróbios ou anaeróbios, mesófilos ou termófilos. Porém, os gêneros

mais empregados para obtenção de celulases são os de *Aspergillus* e de *Trichoderma* (Bhat 2000).

2.3.2 Pectinases

As pectinases podem ser obtidas por meio de bactérias, leveduras, fungos filamentosos, insetos, nematódeos e plantas (Pedrolli et al. 2009). Elas são responsáveis pela hidrólise de polissacarídeos pécticos.

A classificação das pectinases é baseada no modo em que atacam os componentes pécticos, e são divididas em três grupos: protopectinases, esterases e despolimerases (Jayani et al. 2005). As protopectinases são conhecidas por degradarem a pectina, o ácido péctico ou a protopectina em resíduos pectinolíticos mais solúveis. As esterases, são capazes de catalisar a desesterificação da pectina por remoção do grupo metoxil das substâncias pécticas, e são conhecidas como pectina metil esterases. E por fim, as despolimerases, que hidrolisam ligações glicosídicas α -(1,4) da galacturonana (hidrolases) ou atuam clivando por transeliminção (liases). As hidrolases são conhecidas como poligalacturonases e as liases como pectina liases (Uenojo & Pastore 2007).

2.3.3 β -galactosidases

A β -galactosidase (EC 3.2.1.23) é uma enzima de grande emprego na indústria de alimentos. Também conhecida como lactase ou β -D-galactohidrolase, pode ser encontrada amplamente na natureza. Mais precisamente, em vegetais, como amêndoas e maçãs, em órgãos de animais, como intestino e cérebro, além de ser produzidas por muitos microrganismos, como leveduras (como *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus*), fungos filamentosos (como *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*) e bactérias (como *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearco-thermophilus*, *Bacillus circulans*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus thermophila*) (Vidya et al. 2014).

Pertencentes à família das glicosídeo hidrolases (família GH2 e GH35), no geral, as β -galactosidases fúngicas são capazes de atuar em uma faixa geral de pH ótimo de 2,5 a 5,4, as provenientes de leveduras tem um faixa de pH ótimo entre 6,0 e 7,0 e as bacterianas entre 6,5 e 7,5, atuando numa faixa relativamente mais neutra. Devido a essas características e outras, como temperatura ótima, o ambiente em que será

empregada a enzima deve ser levado em conta antes de sua aplicação (Husain 2010). Diversos microrganismos são produtores de β -galactosidases e, dependendo da fonte, as enzimas podem se destacar por uma maior atividade hidrolítica ou de transgalactosilação.

A β -galactosidase é capaz de hidrolisar resíduos (ligações) de β -D-galactopiranosídicas a partir de polissacarídeos, oligossacarídeos ou metabólitos secundários. Devido a essa atividade, a enzima possui duas grandes aplicações industriais: a de redução do teor de lactose de produtos à base de leite e a de síntese de produtos galactosilados (Husain 2010). Ou seja, seu mecanismo de ação inclui tanto a hidrólise da lactose quanto a reação de transgalactosilação. Se a enzima estiver em um ambiente de baixa concentração de lactose (com alta atividade de água) irá ocorrer a hidrólise desse dissacarídeo; enquanto que se estiver na presença de altas concentrações de lactose sua via será deslocada para a transgalactosilação (Goulas et al. 2007).

A hidrólise da lactose pela β -galactosidase já é uma tecnologia difundida nas indústrias de laticínios para reduzir o teor de lactose do leite e de seus derivados. Através deste mecanismo, a ligação galactosídica $\beta(1-4)$ da lactose é clivada pela enzima resultando em uma mistura equimolecular de glicose e galactose (Figura 12) (Klein et al. 2013).

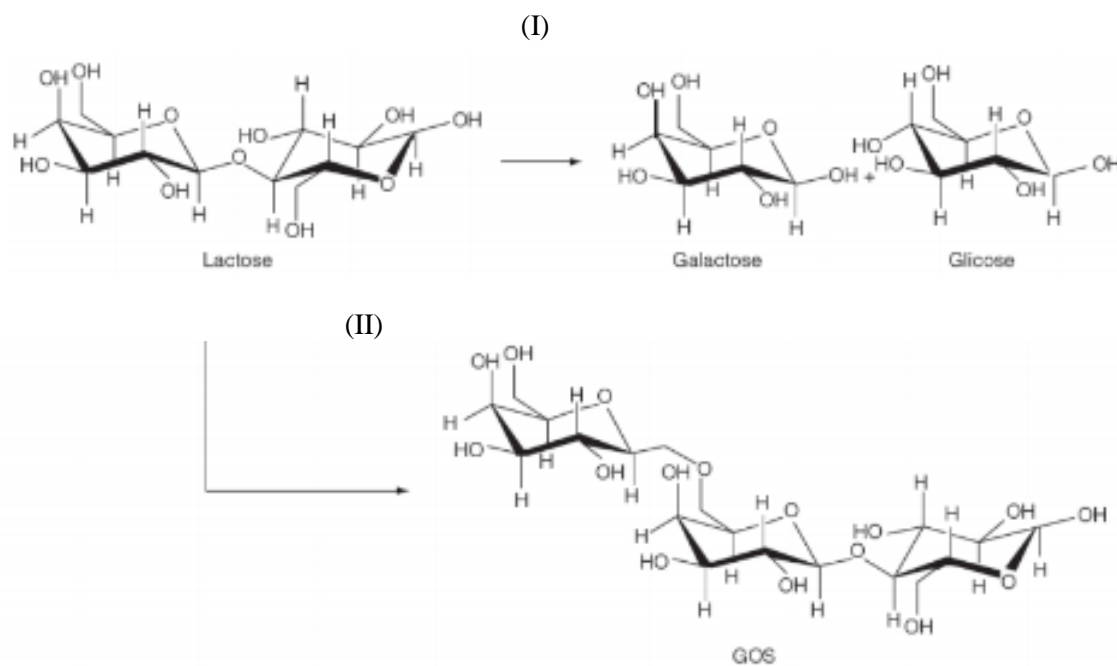


Figura 12. Hidrólise (I) e transgalactosilação (II) da lactose pela β -galactosidase. Fonte: Adaptado de Martins et al. (2009).

Esse processo, além de beneficiar consumidores intolerantes à lactose, faz com que a doçura e a solubilidade do produto em questão sejam elevadas (Tabela 6), pois a soma do grau de doçura desses dois sacarídeos é quase sete vezes maior que o da lactose isolada (Vasileva et al. 2012). Com isso, indústrias que utilizam a hidrólise em seus processos diminuem a necessidade de adição de açúcares nos seus produtos finais. Além disso, a hidrólise possui outras vantagens, pode ser aplicada como uma ferramenta a fim de evitar problemas futuros nos processamentos de alguns alimentos, como ganho de textura e tempo de processo. É o caso da prevenção à cristalização da lactose, o qual gera um aspecto arenoso nos alimentos. Isso pode ocorrer quando a razão molar de uma mistura anidra de α e β lactose é igual a 5:3, ou quando a umidade relativa no ambiente em que está inserida é alta, aproximadamente 70 % (Jouppila, K.; Kansikas, J.; Roos 1997). A formação dos cristais pode ser evitada utilizando a hidrólise da lactose previamente ao processamento, como já empregado na produção de sorvetes, doce de leite e leite condensado. Outro processo em que esta catálise está inserida é no auxílio às etapas de pré-fermentação, utilizado hoje na fabricação de iogurtes. Ou seja, clivando a lactose em glicose e galactose antes da ação das bactérias lácticas se garante um menor tempo de fermentação, visto que os monossacarídeos são mais fermentescíveis que os dissacarídeos (Zadow 1993).

Tabela 6. Índice de doçura relativa à sacarose.

Substância	Doçura relativa a sacarose
Sacarose	1,00
Lactose	0,16
Galactose	0,32
D-glicose	0,74

Fonte: Adaptado de Goraleb et al. (2008).

Em condições específicas de processamento, neste caso de altas concentrações de lactose, a β -galactosidase é capaz de “ativar” o seu outro mecanismo catalítico, o de transgalactosilação. Em altas concentrações desse dissacarídeo no meio reacional a enzima, além da hidrólise da lactose, promove a formação de oligômeros, conhecidos como galacto-oligossacarídeos (GOS) (Figura 12). Os GOS têm fórmula molecular geral $(\text{Gal})_n\text{-Glc}$ e $(\text{Gal})_n\text{-Gal}$ (Tabela 7) e podem ser encontrados até o grau de polimerização (GP/ n) 11 (Barbosa, Mariana; German, J. Bruce; Lebrilla, Carlito B.; Mills, David; Freeman-Sharkey, Samara; King 2017), apesar de não ser usual sua produção em cadeias tão extensas (Mussatto & Mancilha 2007).

Tabela 7. Estruturas de alguns oligossacarídeos formados durante a ação da β -galactosidase em altas concentrações de lactose.

GP (n)	Fórmula	Identificação
2	$\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow6)\text{-D-Glc}$	alolactose
	$\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow6)\text{-D-Gal}$	galactobiose
	$\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow3)\text{-D-Glc}$	
	$\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow3)\text{-D-Gal}$	
	$\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow2)\text{-D-Glc}$	
3	$\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow6)\text{-D-Glc}$	6' digalactosil-glicose
	$\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow4)\text{-D-Glc}$	6' galactosil-lactose
	$\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow6)\text{-D-Gal}$	6' galactotriose
	$\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow4)\text{-D-Glc}$	3' galactosil-lactose
	$\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow4)\text{-D-Glc}$	4' galactosil-lactose
4	$\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow4)\text{-D-Glc}$	6' digalactosil-lactose
	$\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow4)\text{-D-Glc}$	
	$\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow4)\text{-D-Glc}$	
5	$\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-Gal}(1\rightarrow4)\text{-D-Glc}$	6' trigalactosil-lactose

Gal: galactose; Glc: glicose. Fonte: Adaptado de Mahoney (1998).

Os GOS podem ser obtidos por meio de duas rotas, uma através de ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ e a outra através de ligações $\beta(1\rightarrow6)$ (Sako et al. 1999). A

reação será mais efetiva quanto menor for o peso molecular do oligossacarídeo receptor, por isso a síntese de GOS com GP2, GP3 e GP4 é mais comum do que os maiores que GP4, por exemplo (Mahoney 1998). A conversão da lactose por ação da β -galactosidase é controlada através da competição das suas duas cinéticas simultaneamente, a hidrólise e a transgalactosilação. Na produção de GOS o primeiro complexo a ser formado é enzima-galactosil, seguida pela liberação da glicose (hidrólise). O resíduo de galactose é transferido, por sua vez, para um acceptor hidroxil, que pode ser um sacarídeo ou uma molécula de água. Nesta etapa, a condição de concentração da solução de lactose é crucial e direcionará a rota cinética a ser tomada pela enzima. Ou seja, somente se houver alta concentração de lactose no meio o mecanismo de transgalactosilação será iniciado. Neste caso, o galactosil do complexo será transferido para um sacarídeo (acceptor), como a própria lactose ou um outro oligossacarídeo já formado anteriormente.

Além da atividade da β -galactosidase poder ser alterada pela concentração inicial de lactose, ela pode ser afetada por outros fatores, como o microrganismo produtor da enzima (origem), a concentração da enzima utilizada, o tipo de processo a ser aplicada, as condições de pH e temperatura operadas durante a reação e por inibição competitiva (Mahoney 1998; Frenzel et al. 2015). A transgalactosilação pode ser inibida pela formação dos produtos. A presença excessiva de glicose e principalmente de galactose, são capazes de frear essa via catalítica. Neste caso, a galactose é mais efetiva por ser competidora da molécula de lactose pelo sítio da β -galactosidase.

Habitualmente, as lactases oriundas de leveduras são mais utilizadas para hidrólise da lactose do leite e as de origem fúngica, para a hidrólise do soro ácido, devido a sua catálise ótima em pHs ácidos. Com relação à síntese de prebióticos, diversas fontes estão relacionadas e os microrganismos mais utilizados são *Bacillus circulans*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces fragilis* (Boon et al. 2000).

5. 2.3.3.1 β -galactosidase de *Bacillus circulans*

A β -galactosidase de *Bacillus circulans* (ATCC 31382) é conhecida por produzir altos níveis de prebióticos na presença de lactose. É uma proteína tetramérica, formada por quatro isoformas, denominadas BgaA (189,3 kDa), BgaB (154,9 kDa), BgaC (134,8 kDa) e BgaD (91,6 kDa), as quais variam muito quanto às suas estruturas e atividades

de transgalactosilação. Dentre as isoformas, a BgaD destaca-se por possuir a maior atividade de transgalactosilação (Warmerdam et al. 2013).

O polipeptídeo designado BgaD possui uma sequência de 1.738 aminoácidos (5.214 pares de bases), com um peptídeo sinal de 35 aminoácidos e um domínio lacZ formado por 807 aminoácidos (Song et al. 2013). A partir dessa isoforma, Song e colaboradores (2011) testaram quatro mutantes, por meio de deleções consecutivas (Figura 13) e identificaram a BgaD-D como a mais específica tanto para o substrato lactose quanto para o orto-fenil- β -galactopiranosídeo (ONPG). Mais tarde, Tanaka e colaboradores (2015) identificaram a mutante como a maior produtora de GOS, podendo atingir aproximadamente 50 % de conversão da lactose em prebióticos.

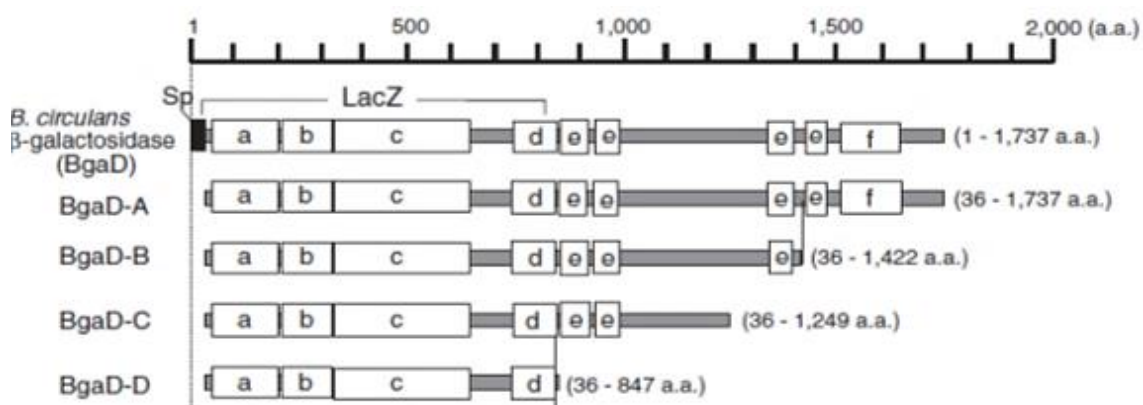


Figura 13. Domínios da β -galactosidase de *Bacillus circulans* e seus mutantes BgaD-A, BgaD-B, BgaD-C e BgaD-D construídos por deleção. Legenda: peptídeo sinal (Sp, 1-35 a.a.); a. domínio Glyco_hydro_2N (ligação-açúcar); b. domínio Glyco_hydro_2; c. domínio Glyco_hydro_2_C (TIM barrel); d. domínio BID_1; e. quatro repetições do domínio Big_4; f. domínio F5/8 tipo C (domínio DS). Fonte: Song et al. (2011).

Atualmente, já se conhece o mecanismo de transgalactosilação da BaD-D (Figura 14). Na reação, inicialmente, ocorre a protonação do oxigênio glicosídico pelo aminoácido Glu447 e o ataque nucleofílico de um átomo de oxigênio carboxílico do Glu532, hidrolisando a ligação β -glicosídica da lactose (Fig. 14A). Isso resulta na formação de uma ligação covalente entre galactose e Glu532 e na liberação da glicose (Fig. 14B). Subsequentemente, o intermediário reage com o resíduo OH do galactosil, liberando uma molécula de água (Fig. 14C) e produzindo os GOS (FIG. 14D) (Ishikawa et al. 2015).

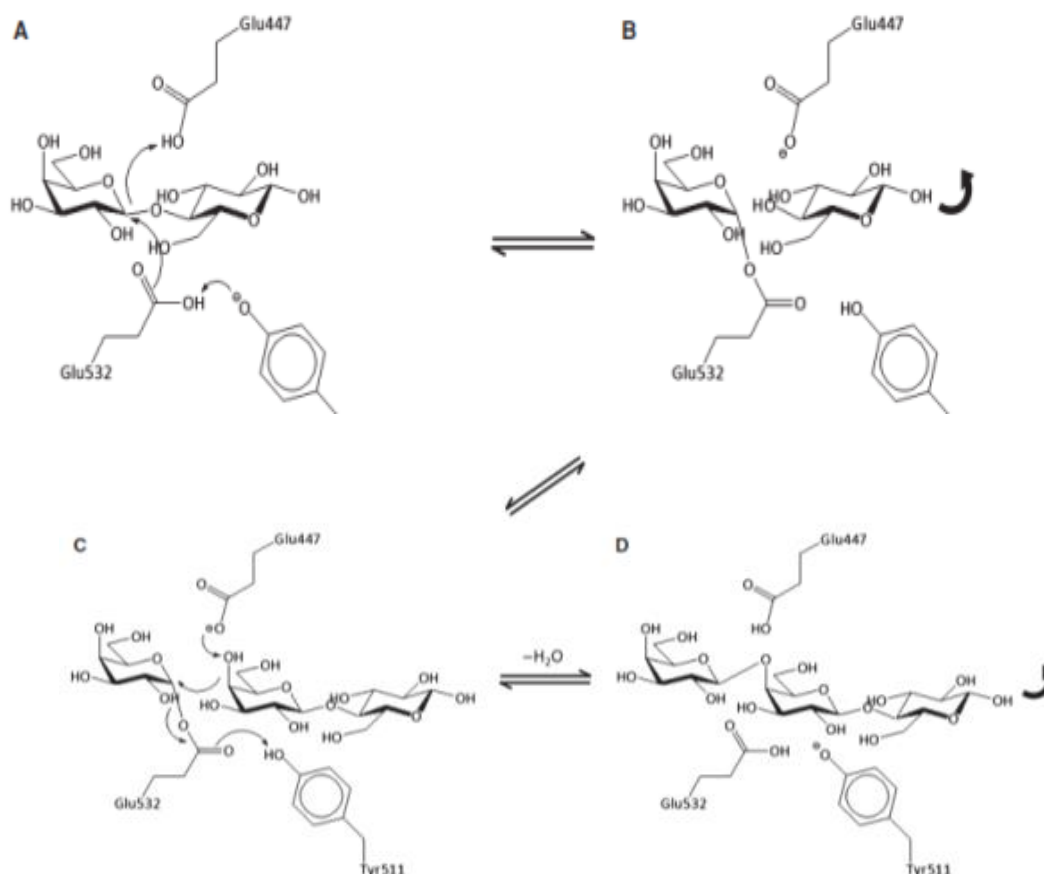


Figura 14. Mecanismo de produção de GOS a partir de BgaD-D. Fonte: Ishikawa et al. (2015).

O desenvolvimento de organismos geneticamente modificados, como o mutante BgaD-D de *Bacillus circulans* em *E. coli*, é importante para o desenvolvimento da indústria. Por exemplo, por meio de modificações, é possível tornar os microrganismos mais resistente a diferentes temperaturas e pHs, além de poder aumentar a sua expressão para um ou mais genes específicos de interesse. Isso facilita os processos de larga escala e capacita-os a produzirem mais e em condições seguras, através do uso de microrganismos reconhecidos como seguros (GRAS, *Generally Recognized as Safe*) (Passuello & Boccaletti 2016), o que é algo que vem crescendo, com algumas aplicações, por exemplo, na produção de aditivos e de enzimas (Adrio & Demain 2010).

2.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A imobilização enzimática começou a ser utilizada na segunda metade do século XX como uma técnica para aliviar os problemas encontrados na utilização das enzimas na forma livre. Conhecida por confinar ou manter as enzimas em uma região definida, a imobilização deve manter a atividade catalítica das enzimas para que sejam reutilizadas

continuamente (Silman & Katchalski 1966, citado por Katchalski-Katzir 1993). O principal objetivo de imobilizar enzimas é manter sua estrutura e, assim, a sua estabilidade durante o processo no qual será inserida (Dalla-Vecchia et al. 2004).

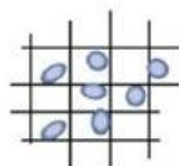
2.4.1 Métodos e suportes para imobilização de enzimas

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para a imobilização de enzimas. Essas técnicas são baseadas em ligações físicas ou químicas entre a biomolécula e o suporte, no qual a primeira consiste em interações fracas entre o suporte e a enzima, e a segunda em ligações iônicas ou covalentes entre ambos (Figura 15). A imobilização por interações físicas entre a enzima e o suporte pode ser por meio de adsorção não covalente à suportes insolúveis, por aprisionamento e encapsulação. Na imobilização por interações químicas são exemplos a ligação iônica ou covalente à suportes insolúveis e a reticulação, com reagentes multifuncionais (Klibanov 1979; Krajewska 2004; Cao 2005).

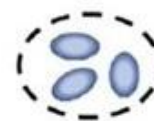
As características das enzimas imobilizadas irão depender tanto de suas propriedades quanto das características dos suportes utilizados (Cantone et al. 2013). Os suportes mais comumente utilizados são resinas sintéticas, biopolímeros, como polissacarídeos, ou sólidos inorgânicos, como sílica mesoporosa ou zeólitas (Grosová et al. 2003). As particularidades de cada suporte, como diâmetro de partícula, susceptibilidade ao intumescimento, estabilidade mecânica e comportamento durante a compressão devem ser previamente analisados de acordo com o tamanho da enzima e também averiguados quanto às suas condições específicas de reação, já que alguns materiais podem ser instáveis em determinados pHs e temperaturas (Cantone et al. 2013). A Figura 15 mostra uma ilustração com os principais métodos de imobilização de enzimas.

Imobilização física

Adsorção física



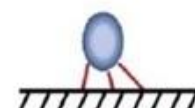
Aprisionamento



Encapsulamento

Imobilização química

Adsorção iônica



Ligação covalente



Ligação cruzada

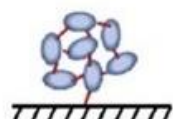
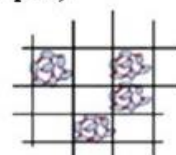
Combinação de métodos (exemplos)Ligações covalentes e
reticulaçãoAprisionamento e
reticulação

Figura 15. Ilustração dos métodos de imobilização enzimática físicos, químicos e combinados. Fonte: adaptado de (Y.-H. P. Zhang et al. 2011; Guisan 2006).

Com o passar dos anos, a combinação de dois ou mais métodos de imobilização é cada vez mais empregada para melhorar a performance das enzimas. Visto que não há um só método ou material que beneficie todos os tipos de enzimas existentes, cada enzima necessita de um estudo de metodologia para a aplicação desejada. Porém, idealmente, a técnica utilizada para imobilização deverá conferir uma atividade estável à enzima durante longos períodos de tempo, evitar sua lixiviação, ser reutilizável e permitir a difusão de substratos e produtos durante a catálise (Ispas et al. 2009). Essas características vão depender ainda da conformação de cada enzima e das propriedades do suporte utilizado (Krajewska 2004) (Krajewska, 2004). Garcia-Galan e colaboradores (2011) salientam que existem pontos relevantes para se obter um biocatalisador imobilizado eficiente: resistência mecânica, simplicidade do protocolo de imobilização, ter a possibilidade de acoplar um sistema de purificação da enzima, avaliar o impacto da imobilização na atividade da enzima, garantir a estabilidade da enzima, evitando seu enrijecimento ou dissociação estrutural, garantir a sua seletividade e reduzir possíveis problemas de inibição de sua atividade. Entre os suportes mais utilizados para imobilização de enzimas estão o Eupergit C, alumina, sílica, quitosana e

celulose. A quitosana, a gelatina e o polietilenoglicol são suportes que possuem grupamentos aminos importantes na imobilização através de ligações covalentes (Canilha 2006). A imobilização de enzimas em suportes insolúveis é a mais aplicada nas indústrias de alimentos (Guisan 2006).

6. 2.4.1.1 Adsorção física à suportes insolúveis (não covalente)

A adsorção não covalente de uma enzima em um suporte insolúvel é atrativa pois é simples, rápida e de baixo custo e consiste na ligação da enzima em um ou mais pontos da superfície do suporte. Dependendo da enzima e do suporte empregado, a adsorção física pode ocorrer através de interações de van der Waals, de forças hidrofóbicas ou através de ligações de hidrogênio (Canilha 2006). As desvantagens incluem a possibilidade de dessorção do suporte e decréscimo da capacidade catalítica devido ao impedimento estérico desenvolvido pelo suporte (F. Zhang et al. 2011). Ainda assim, a adsorção física é uma técnica muito empregada por ser prática e de relativo baixo custo (Harris et al. 2010).

7. 2.4.1.2 Aprisionamento e encapsulação

As técnicas de aprisionamento e encapsulação envolvem o emprego de membranas pré-formadas, de diferentes polímeros, géis ou matrizes porosas. No caso do aprisionamento, com emprego de géis como suporte, a enzima é misturada aos componentes que formam este suporte que, depois de pronto, irá reter a enzima na matriz (Hanefeld et al. 2009). Os poros desses suportes devem evitar a perda da enzima para o meio externo bem como devem permitir a difusão de substratos e produtos (Chaplin & Bucke 1990). No encapsulamento a matriz é diferente, podem ser materiais semi-impermeáveis ou surfactantes, que auxiliam na formação de micelas, onde as enzimas permanecem livres no ambiente reacional, mas em um espaço restrito. Como desvantagens são citados problemas difusionais e a instabilidade das matrizes, o que restringe sua utilização por longos períodos (Canilha 2006).

8. 2.4.1.3 Adsorção iônica à suportes insolúveis

A adsorção iônica ocorre por atrações eletrostáticas estabelecidas entre as cargas opostas da enzima e do suporte. Qualquer elemento trocador de íons pode ser utilizado como suporte, dependendo do estado de ionização da enzima (Marconi 1989). Por isso,

o estudo do pH e das concentrações de sal ao longo da imobilização deve ser considerado. É uma união mais estável que a adsorção física, mas é uma técnica inferior quando comparada com os outros métodos, pois na presença de altas concentrações de sais, a lixiviação de enzimas para a parte aquosa ocorre facilmente devido a interações iônicas formadas entre as enzimas e o meio salino (Hanefeld et al. 2009).

9. 2.4.1.4 Ligação covalente

A imobilização por ligação covalente é eficiente, mas mais trabalhosa e dependerá dos grupos funcionais presentes na superfície do suporte e dos grupos funcionais dos resíduos de aminoácidos da enzima. Esse método pode ou não carecer de uma ativação do suporte de interesse antes da imobilização da enzima. Vários grupos funcionais podem ser utilizados para imobilização covalente, como grupos amino e resíduos de açúcares.

Apesar de em alguns casos ser necessário bloquear alguns grupos reativos livres após a imobilização, possui as vantagens de manter a enzima fortemente ligada ao suporte, ser mais estável que a forma livre, apresentar baixa taxa de lixiviação e reduzida contaminação do produto final (Garcia-Galan et al. 2011). Para um melhor resultado, o ideal é realizar um estudo dos resíduos de aminoácidos presentes na superfície da enzima para que esta seja imobilizada sem alterar sua estrutura terciária e conseqüentemente seu sítio catalítico e/ou sua mobilidade (Cao 2005).

10. 2.4.1.5 Agentes de ativação e reticulação

A imobilização de enzimas pelo método covalente é comumente empregada utilizando agentes de ativação. O emprego desses agentes é simples e pode ser realizado misturando-os diretamente em uma matriz ou através da aplicação em matrizes pré-formadas, como membranas e esferas (Kumar 2000; Rodrigues et al. 2008). O método é eficaz e ainda pode ser capaz de melhorar a estabilidade da enzima devido à presença desses agentes de imobilização que proporcionam ligações bi- ou multipontuais (Guisan 2006). Estes reagentes podem ser tanto utilizados para entrecruzamento de enzimas, como também em combinação com outros métodos (Fig. 15).

Diferentes agentes de ativação podem ser utilizados para a reticulação além da genipina, como o glicidol, a epícloridrina, o glioxal, o formaldeído e o glutaraldeído (Mendes, de Oliveira, et al. 2011; Li & Bai 2005; Rodrigues et al. 2008; Muzzarelli et

al. 2015). Porém, atualmente, muitos trabalhos têm sido publicados utilizando a genipina, isso por que os outros agentes são considerados de elevado grau tóxico e requerem excessivas purificações antes de serem descartados (Pujana et al. 2013; Muzzarelli et al. 2015; Klein et al. 2016). O glutaraldeído, por exemplo, é de 5.000 a 10.000 vezes mais citotóxico do que a genipina (Chen et al. 2009).

No que se refere ao uso de genipina como agente reticulante para a imobilização de enzimas, Liu e colaboradores (2016) também a testaram para o ganho de estabilidade. Eles investigaram a performance catalítica de uma lipase imobilizada em partículas magnéticas de quitosana reticuladas tanto com genipina quanto com glutaraldeído. Como resultado, os autores concluíram que quando a imobilização da enzima é efetuada com genipina a atividade catalítica da lipase é mais estável a variação de diversos fatores (pH, temperatura e estabilidade de estocagem e operacional) em comparação com a imobilização realizada com glutaraldeído. Um exemplo é a perda da atividade relativa da enzima, que, segundo eles, a enzima imobilizada com genipina perde somente 38,2 % de sua atividade, enquanto que a enzima imobilizada com glutaraldeído perde 57,6 % de sua atividade. Através de reusos, a enzima imobilizada com genipina apresentou 95 % de sua atividade inicial no 7º dia enquanto que a enzima imobilizada contendo glutaraldeído reteve somente 82 % de sua atividade no 7º dia. Além disso, a enzima imobilizada com genipina manteve 80 % da sua atividade inicial após cinco ciclos de reusos, enquanto que a enzima imobilizada utilizando glutaraldeído manteve somente 26 % de sua atividade. Assim, supõe-se que essa baixa da enzima imobilizada com glutaraldeído está atribuída a possíveis reações com o sítio ativo da enzima, alterando a conformação da mesma e impossibilitando sua ação. Além disso, é possível que ocorra um excesso de pontos de ligação glutaraldeído-lipase, que pode restringir a flexibilidade da enzima, afetando sua atividade catalítica.

11. 2.4.1.6 Ligação cruzada

Na imobilização por ligação cruzada as enzimas estão interligadas formando uma estrutura tridimensional complexa. Dessa forma é possível obter um biocatalisador livre de suporte. Existem duas formas de formá-los, através de cristais de enzimas reticuladas, conhecidas como CLECs (*Crosslinking Enzyme Crystals*) ou através de agregados, conhecidos como CLEAs (*Crosslinking Enzyme Aggregates*) (Cao 2005). Os CLECs são formados pela cristalização de enzimas puras seguido de reticulação e os

CLEAs são preparados por meio de precipitação das enzimas seguido de reticulação (Liang Li et al. 2015). Suas vantagens incluem a concentração de atividade (podendo ser compostos de uma ou mais enzimas de interesse), a alta estabilidade e um custo relativamente mais baixo que os outros métodos. Como desvantagens cita-se a sua baixa retenção da atividade, sua baixa estabilidade mecânica e a baixa reprodutibilidade da imobilização (Sheldon 2007).

2.4.2 Imobilização de enzimas em suportes à base de quitosana

Biopolímeros são alternativas de suportes para a imobilização de enzimas, por serem naturais e normalmente possuir custo reduzido. Diferentes biomateriais são citados na literatura como os carboidratos insolúveis (celulose, amido, dextranas, agarose, quitosana e etc.) e as proteínas (albumina, gelatina e etc.) (Cao 2005). Dentre eles, a utilização de polissacarídeos é atrativa, já que são seguros biologicamente e possuem característica hidrofílica, propiciando um ambiente adequado para a maioria das enzimas (Cantone et al. 2013).

Neste trabalho, será utilizada a quitosana, um aminopolissacarídeo oriundo da desacetilação da quitina, obtida a relativo baixo custo do exoesqueleto de crustáceos (Kumar 2000). A quitosana é um suporte que possui diversas vantagens: exibe alta afinidade por proteínas, possui disponibilidade de grupos funcionais (para reação com enzimas ou para modificação química), apresenta biocompatibilidade, possui resistência à degradação química, propriedades antimicrobianas, não é tóxica e, ainda, pode ser preparada de diferentes formatos físicos (Krajewska 2004; Juang et al. 2001; Hsieh et al. 2000).

A quitosana é conhecida por ser pouco solúvel em água e insolúvel em pHs alcalinos, entretanto é capaz de se dissolver em meios ácidos (pH menor que 6,5) (Krajewska 2004). Ao mesmo tempo, pode ser modificada por diferentes agentes visando a imobilização de enzimas, entre eles o glutaraldeído, o glicidol e a genipina (Rodrigues et al. 2008; Muzzarelli 2009). A ativação e/ou reticulação da quitosana com genipina pode ser visualizada no item 2.1.5.1 (“Genipina como agente de ativação natural”). Através desse mecanismo, a quitosana é capaz de se ligar em duas extremidades da molécula de genipina, por meio de dois ataques nucleofílicos. Quando a enzima for adicionada ao gel para efetuar a imobilização, a enzima tanto poderá ser

adsorvida pelo material, quanto poderá reagir com a genipina, caso algumas das suas duas estruturas estiver disponível.

Esse tratamento da quitosana com agentes de ativação aumenta sua estabilidade térmica e previne sua dissolução em pHs ácidos (Juang et al. 2001). Além do mais, o uso da quitosana é um ótimo exemplo de reintrodução de resíduos sólidos orgânicos em novos processos. Já que a quitina, fonte da quitosana, é um resíduo da indústria pesqueira e quando tratado produz este produto de alto valor agregado e permite sua introdução em outros processos.

2.4.3 Benefícios e restrições da imobilização de enzimas

A utilização de enzimas imobilizadas apresenta algumas vantagens e desvantagens. Um dos principais benefícios da sua utilização é a possibilidade de reutilização da enzima. Por estar presente de forma isolada no processo, a sua recuperação do meio reacional é facilitada (Cabral et al. 2003). A imobilização de enzimas ainda permite a sua utilização em sistemas contínuos, uma vez que é possível impedir sua lixiviação junto com os produtos. São amplamente empregadas na construção de biorreatores enzimáticos, os quais possibilitam a utilização de altas concentrações de enzimas, são capazes de operar em grandes volumes e de catalisar produções em escalas de nível industrial (Cipolatti et al. 2014). Desta forma, a imobilização permite a economia de recursos e garante um produto final sem a presença da enzima (Grosová et al. 2003).

Alguns estudos apontam que o confinamento de enzimas pode ainda reduzir a sua sensibilidade à diferentes pHs, pressões, temperaturas e solventes orgânicos, além de ficar menos suscetível a enzimas proteolíticas (Ekman & Sjöholm 1978). De modo geral, a imobilização aumenta a estabilidade por criar um micro-ambiente formado pelo confinamento, promovendo um efeito protetor ao biocatalisador perante as características do ambiente em que estaria exposta se estivesse solúvel na reação (Coelho et al. 2006). Na forma imobilizada, as enzimas também podem apresentar um maior desempenho catalítico por poderem ser “fixadas” em uma conformação em que seu sítio ativo fica mais exposto, através de um estudo da sua composição de aminoácidos. Entretanto não há regra, algumas podem ter suas atividades catalíticas inibidas após a imobilização (Dalla-Vecchia et al. 2004). Por isso, a utilização de diferentes metodologias de imobilização, a otimização de seus parâmetros reacionais e o

número de reutilizações possíveis devem ser averiguados para se obter a condição mais vantajosa para determinada aplicação.

CAPITULO 3: METODOLOGIA

3.1 EXTRAÇÃO DE GENIPINA

Este projeto foi realizado no Laboratório de Enzimologia de Alimentos, pertencente ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA/UFRGS).

Para o desenvolvimento do projeto, os jenipapos, oriundos de São Paulo (São Paulo, Brasil) e obtidos através de feirante, foram submetidos a diversas etapas de processamento até obter seu pó. O pó foi obtido a partir de 32 unidades de jenipapo ainda no estágio de maturação verde, os quais foram lavados, descascados e fatiados para posterior congelamento (-80 °C), liofilização e trituração. Após, quatro enzimas comerciais (Celluclast®, Pectinex Smash XXL®, Pectinex Ultra Color® e Lallzyme Beta®) foram avaliadas quanto aos seus teores proteicos e suas atividades de pectinase total, celulase total e β -glicosidase total. Esta etapa teve como intuito conhecer as suas composições para que, posteriormente, se pudesse correlacionar, em particular suas diferentes atividades enzimáticas com a composição tecidual do jenipapo, a fim de verificar a potencialidade das mesmas na extração da genipina.

Em seguida, diferentes condições de extração de genipina foram testadas utilizando 100 mg do pó de jenipapo dissolvido em um sistema bifásico aquoso (SAB) contendo acetato de etila e tampão (1:1, v/v): aplicando as enzimas comerciais em uma concentração de 5 % (v/v, ou m/v no caso da Lallzyme Beta®), a 37 °C e pH 5,5 (i); aplicando as duas enzimas comerciais mais eficazes em uma concentração de 1 % e 10 % (v/v, ou m/v), nas mesmas condições (ii); utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR), fatorial 2^3 com três repetições do ponto central, para avaliação da extração de genipina em diferentes condições de pH e temperatura empregando a melhor enzima comercial na concentração mais eficaz para extração (iii); e realização de uma extração direta de genipina empregando metanol 80 % (v/v) com o intuito de determinar o teor de genipina disponível no fruto pelo método padrão (iv).

3.2 GENIPINA COMO AGENTE DE ATIVAÇÃO DA QUITOSANA E SUA COMPARAÇÃO COM O GLUTARALDEÍDO

Utilizando a melhor condição de extração de genipina, fez-se a coleta da fase orgânica e evaporação do acetato de etila com gás nitrogênio até obtenção do pó de genipina a ser utilizado em outros experimentos. Dentre estes, a utilização da genipina como agente de ativação de géis de quitosana para comparação com géis ativados com glutaraldeído. Nestes géis foram realizadas análises texturais e reológicas, para verificar as diferentes resiliências conferidas pelos materiais. Após, partículas de quitosana foram preparadas e ativadas com genipina e glutaraldeído para imobilização de duas β -galactosidases modelos, a fim de avaliar suas capacidades catalíticas e consequentemente a estabilidade proporcionada pelos diferentes suportes de imobilização.

A Figura 16 apresenta o fluxograma das metodologias empregadas na extração da genipina e na comparação dos *crosslinkers*. As informações experimentais detalhadas deste estudo podem ser encontradas no Capítulo 4, na forma de artigo científico.

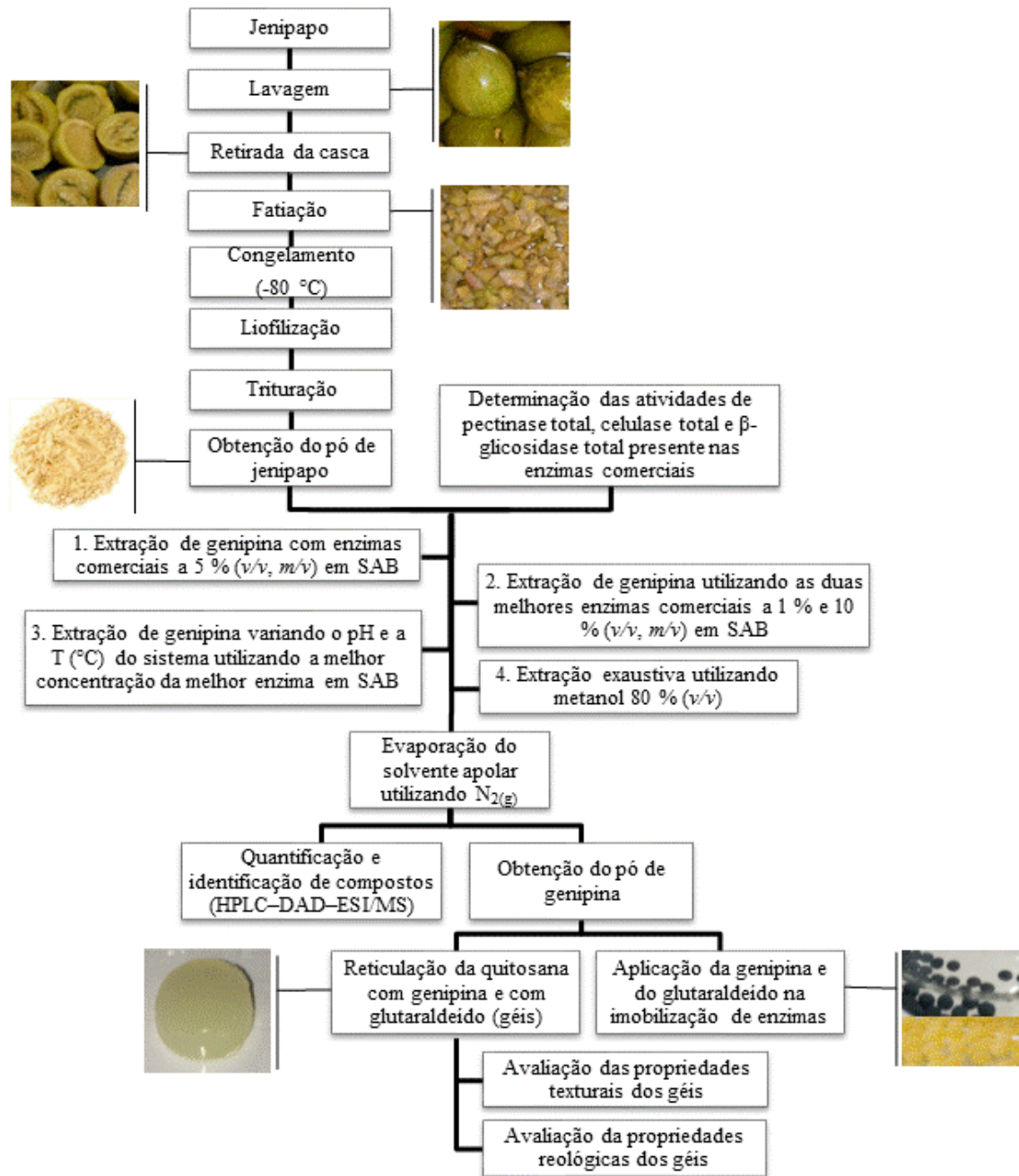


Figura 16. Fluxograma da metodologia utilizada para extração da genipina e comparação da mesma com o glutaraldeído. Fonte: elaborado pela autora.

3.3 ESTUDO DA CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE *BGAD-D* DE B-GALACTOSIDASE DE *BACILLUS CIRCULANS* VISANDO A SÍNTESE DE GOS

Esta etapa do projeto foi realizada em parceria com empresa Quatro G Pesquisa e Desenvolvimento Ltda., instalada no Tecnopuc (PUCRS). No entanto, não foi concluída

e para fins de interesses futuros no seu desenvolvimento, a metodologia e os resultados obtidos podem ser encontrados no Apêndice B.

**CAPÍTULO 4: EFFICIENT ENZYME-ASSISTED EXTRACTION OF GENIPIN
FROM GENIPAP (*GENIPA AMERICANA* L.) AND ITS APPLICATION AS A
CROSSLINKER FOR CHITOSAN GELS**

(Artigo submetido à revista *Food Chemistry*)*

Anelise S. Bellé^a, Camila R. Hackenhaar^a, Luiza Spolidoro^a, Eliseu Rodrigues^b,
Manuela P. Klein^c, Plinho F. Hertz^a

^a Enzymology Laboratory, Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, 9500 Bento Gonçalves Ave, P.O. Box 15090, ZC 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Natural Antioxidants Laboratory, Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, 9500 Bento Gonçalves Ave, P.O. Box 15090, ZC 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Nutrition Department, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, 245 Sarmiento Leite St, ZC 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author:

Tel.: +55 51 3308 7094; fax: +55 51 3308 7048

E-mail address: plinho@ufrgs.br (P. F. Hertz)

Web: www.ufrgs.br/bbb

*O material suplementar deste artigo pode ser encontrado no Apêndice A.

ABSTRACT

Enzyme-assisted extraction in liquid-liquid two-phase aqueous system (TPAS) was applied for the first time in order to extract genipin from genipap (*Genipa americana* L.). The effect of different commercial enzymes, their concentrations, and extraction parameters such as pH and temperature were investigated. Moreover, chitosan gels were prepared, crosslinked with glutaraldehyde or the extracted genipin and characterized by their textural and rheological properties. Lastly, the crosslinked chitosan was used as support for the immobilization of two model β -galactosidases. Among the different commercial enzymes tested for extraction, the treatment carried out with Celluclast 10 % (v/v), at 36 °C and pH 3.7, provided an extraction of 196 mg of genipin per gram of genipap - the highest genipin recovery found in literature until now. Chitosan gels crosslinked with genipin 0.5 % (w/v) showed better textural and similar rheological properties when compared to the chitosan crosslinked with glutaraldehyde 3 % (v/v). In general, the percentage of lactose hydrolysis by the β -galactosidases from *K. lactis* immobilized using genipin as a crosslinker was higher than when glutaraldehyde was used (87 % and 9 %, respectively). Thus, genipin with 97 % of purity obtained directly by the enzyme-assisted extraction in TPAS developed in this work proves to be an excellent alternative to the use of glutaraldehyde in chitosan crosslinking applications.

Keywords: genipin, genipap, glutaraldehyde, textural and rheological characteristics, enzyme immobilization.

1. Introduction

Genipin is a product of geniposide hydrolysis, which is catalyzed by the enzyme β -glucosidase (EC 3.2.1.21). In this reaction, the sugar moiety of geniposide is released, forming genipin (Ramos-De-La-Peña et al., 2014). Geniposide is a natural iridoid and the major compound in genipap (*Genipa americana* Linnaeus), being present in both endocarp and mesocarp of the fruit, and representing more than 70 % of its total iridoids (Bentes, de Souza, Amaya-Farfan, Lopes, & de Faria, 2014). Geniposide can also be found in the fruits of *Gardenia jasminoides*, *Castilleja tenuiflora*, *Bellardia trixago*, and *Eucommia ulmoides*, as well as in the leaves and stems of *Tocoyena formosa* and *Randia spinosa* (Carrillo-Ocampo, Bazaldúa-Gómez, Bonilla-Barbosa, Aburto-Amar, & Rodríguez-López, 2013; Lee et al., 2014). The genipap used in this study is a typical fruit widely distributed in Central America and in the north of Brazil (Bailão, Devilla, da Conceição, & Borges, 2015).

It has been reported that genipin possesses anticholestatic, anti-inflammatory, antidepressant, anticancer, and anti-obesity activities, among other curative and pharmacological actions (Feng et al., 2011). Besides this, genipin is able to react with amino acids and proteins, which allows it to be used in enzyme immobilization protocols as a crosslinking agent and in medicinal treatments as a stent and as a drug delivery vehicle (Klein et al., 2016). In addition, this reaction produces a blue pigment, which can be used as a natural colorant and as a colorimetric detector of amino acids and proteins (Paik, Lee, Cho, & Hahn, 2001). As a crosslinker, genipin can replace conventional agents, as glutaraldehyde, in enzyme immobilization protocols. Moreover, compared to glutaraldehyde, genipin can be 5.000 to 10.000 times less cytotoxic (Sung, Huang, Huang, & Tsai, 1999).

Despite extensive application possibilities, efficient genipin extraction stands as a challenge. Several protocols have already been reported, testing different solvents, ultrasound and enzyme-assisted extractions, either alone or combined (Ramos-de-la-Peña, Montañez, Reyes-Vega, Hendrickx, & Contreras-Esquivel, 2015). Due to its nonpolarity, genipin can be easily separated from geniposide in a liquid-liquid two-phase aqueous system (TPAS) comprised of ethyl acetate or n-butanol and water (Zhou, Fan, Hong, Chai, & Wu, 2005). According to Zhu and co-workers (2014), 76.5 % of the geniposide remains in the aqueous phase using ethyl acetate in TPAS. Moreover, this system has the advantages of minimizing product degradation, reducing costs in the

downstream processing and yielding a high purity end product (Wang, Liu, Xing, Liu, & Song, 2016).

Until now, the highest concentration of genipin extracted from a fruit (gardenia) was 58.83 mg.g⁻¹ (genipin per gram of dried fruit), which was obtained using a combination of solvents and enzymes (Winotapun, Opanasopit, Ngawhirunpat, & Rojanarata, 2013). The enzyme-assisted extraction can be used both for rupturing the cell wall to expose the components of interest, as well as to hydrolyze the sugar moiety, thus releasing glucose from geniposide to form genipin. Different enzymes have been used for this purpose, such as pectinesterase from *Aspergillus aculeatus* (Ramos-De-La-Peña et al., 2014) and β -glucosidases from *Penicillium nigricans* (Xu et al., 2008), *Trichoderma harzianum* (Dong et al., 2014) and *Aspergillus niger* (Gong et al., 2014). However, when it comes to extractions from genipap, the maximum concentration of genipin ever reported was 34 mg.g⁻¹, which was obtained in a process without enzymes (Ramos-de-la-Peña et al., 2015).

In view of the above arguments and due to the large availability of genipap in Brazil, enzyme-assisted extraction in TPAS was applied for the first time for genipin recovery from genipap. The proposed methodology was based on the solubility of the compounds released after geniposide hydrolysis in the TPAS comprised of an aqueous buffer solution and ethyl acetate. The extractions were carried out varying the conditions of pH, temperature and enzyme concentration. Chitosan gels were crosslinked with glutaraldehyde or the extracted genipin, and their textural and rheological properties were determined and compared. Finally, genipin and glutaraldehyde crosslinked on chitosan gels were used for the immobilization of two distinct model β -galactosidases for further application in lactose hydrolysis.

2. Experimental

2.1 Materials

Genipap fruit was purchased from a local market, situated in São Paulo (Brazil). The fruits were chopped, frozen in an ultrafreezer (-80 °C), lyophilized, crushed into powder and maintained at -18 °C until use. The commercial enzymes Celluclast, Pectinex Smash XXL, and Pectinex Ultra Color (Novozymes®, Spain) were kindly donated by LNF Latino Americana® (Brazil), while Lallzyme Beta was purchased from Lallemand® (St. Simon, France). The enzyme-assisted extraction in the TPAS was

carried out using distilled water and ethyl acetate (analytical grade, from Dinâmica®). β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Maxilact LX 5000) was obtained from Globalfood® (Brazil). β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*, 4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (PNPG, ID N7006), 2-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG, ID N1127), pectin (ID 76282, 70-75% of esterification degree), lactose (ID 61345), chitosan (ID C3646, from shrimp shells, $\geq 75\%$ deacetylated), genipin standard (99 % purity), formic acid, and methanol HPLC grade were acquired from Sigma-Aldrich® (Brazil). All solvents and other chemicals were of analytical or HPLC grade. The samples and solvents were filtered through Millipore® membranes of 0.22 μm (cellulose acetate) and 0.45 μm (polytetrafluoroethylene, PTFE), respectively.

2.2 Characterization of the commercial enzymes

Four commercial enzymes were tested for their enzymatic activities (total cellulase, total pectinase and β -glucosidase). The amount of protein was determined by the Lowry method (1951) using bovine serum albumin as standard. The total pectinase activity was measured by the hydrolysis of a pectin solution (75 % esterification degree), as follows: 100 μL of the suitably diluted commercial enzyme in sodium citrate buffer, 0.05 M and pH 5.0 (buffer A) were added to 900 μL of the pectin solution (1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) prepared in the same buffer (Dal Magro, Goetze, et al., 2016). The reaction was conducted at 40 °C in a water bath during 2 min. The number of reducing groups was quantified by 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) according to the Miller method (1959) and detected in a spectrophotometer at 540 nm. Total cellulase activity was determined using Whatman® n°1 filter paper as the substrate, following the method proposed by Ghose (1987). For this, 100 μL of the suitably diluted enzyme in buffer A were added to 900 μL of the same buffer containing 50 mg of filter paper and it was incubated at 50 °C for 2 min. The released reducing sugars were quantified by DNS method and detected in a spectrophotometer at 540 nm. One pectinase or cellulase unit was defined as the amount of enzyme required to release 1 μmol of reducing groups per minute, under the reaction conditions described above.

The β -glucosidase activity was performed using p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (PNPG) as substrate (Parry et al., 2001). The reaction consisted in 120 μL of buffer A, 80 μL of PNPG (4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) and 50 μL of the commercial enzyme conveniently diluted in the same buffer. The mixture was incubated at 37 °C for 2 min, and the reaction was stopped by adding 1 mL of sodium carbonate buffer (0.5 M, pH

12.0). The absorbance was measured spectrophotometrically (405 nm) and the enzyme activity was calculated using the molar extinction coefficient of the released p-nitrophenol ($\epsilon = 13 \text{ L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ at pH 10). One β -glucosidase unit was defined as the amount of enzyme required to hydrolyze 1 μmol of p-nitrophenol per minute, under the above conditions. All experiments were conducted in duplicate.

2.3 Enzyme-assisted extraction of genipin in liquid-liquid two-phase aqueous system (TPAS) containing ethyl acetate

2.3.1 Effect of the enzyme concentration on genipin extraction in TPAS

Genipin extraction was performed in a water bath, in the absence of light, at 100 rpm and 37 °C. The samples were incubated in 10 mL Erlenmeyer's flasks containing 100 mg of genipap powder, 1.5 mL of the commercial enzyme (5 % v/v, in buffer A) and 1.5 mL of ethyl acetate. Samples were collected every 30 min up to 120 min, and the suspension was centrifuged at $3,000 \times g$ (Sigma-4K15 centrifuge, Germany) for 5 min to sediment the vegetable debris. Afterwards, the organic phase (supernatant) was collected, the ethyl acetate was evaporated, and the dry residue (genipin) was redissolved in methanol 45 % (v/v) and filtered for subsequent analysis of genipin content.

The commercial enzymes that provided the first and second highest genipin recoveries were employed for extraction in the additional concentrations of 1 % (v/v) and 10 % (v/v). Samples were collected every 30 min up to 180 min. A control treatment was also conducted, containing dried genipap powder, ethyl acetate and buffer A, but without enzymes. The results obtained in the extractions were carried out by two independent experiments (duplicate).

2.3.2 Optimization of pH and temperature for genipin extraction

A central composite rotational design (CCRD) was employed to investigate the optimum pH and temperature for genipin extraction at 150 min. 11 sets of experiments were employed in this study to determine the significant factors. The significance of the regression coefficients was determined by Student's t-test. The variance explained by the model was given by the multiple coefficient of determination, R^2 . Statistica 13.0 software (StatSoft, USA) and OriginPro 8.0 (OriginLab, USA) were used for regression and graphical analysis of response surface.

2.4 Direct extraction of genipin

The direct extraction was performed to completely leach the naturally occurring compounds present in genipap. For this, 400 mg of dried genipap and 20 mL of methanol 80 % (*v/v*, in ultra-pure water) were mixed in a vortex (genius 3, IKA®) at maximum speed for 5 min. Afterwards, the mixture was centrifuged during 5 min ($3,000 \times g$, 4 °C) and the supernatant was collected for subsequent analysis. This process was repeated several times until genipin was no longer detected in the supernatants by HPLC-DAD.

2.5 Genipin analysis (HPLC–DAD–ESI/MS)

Recoveries of genipin extraction were determined using a Shimadzu HPLC system equipped with two pumps, online degasser and column oven connected in series to a diode array detector and a mass spectrometer with q-TOF analyzer and electrospray ionization source (Bruker Daltonics, model microTOF-QIII, Bremen, Germany). Samples previously filtered (10 μ L, cellulose acetate membrane, 0.22 μ m) were injected into the chromatographic system and separated in a T3 Atlantis® column (150 mm \times 6 mm, 5 μ m), using methanol:milliQ® water (45:55, *v/v*) as mobile phase at 0.9 mL.min⁻¹ and 29 °C (Gong et al., 2014). Genipin was quantified using analytical curves of the compound standard ($R^2 > 0.99$) with seven points (3.125 mg.L⁻¹ to 200 mg.L⁻¹). The limit of detection (LOD) was estimated using a 3.3 signal-to-noise ratio criterium and the limit of quantification (LOQ) as 10 times the above-mentioned ratio. The LOD and LOQ were estimated at about 3.2 mg.L⁻¹ and 9.6 mg.L⁻¹, respectively. Genipin was monitored at 238 nm, having a retention time of approximately 7 min. The compounds were identified over the mass range of *m/z* 100 to 800 (-/+), at drying temperature of 310 °C and nebulizer at 300 psi.

2.6 Textural and rheological characterization of chitosan gels crosslinked with genipin and glutaraldehyde

Chitosan (2 %, *w/v*) dissolved in 0.35 M acetic acid was cast into a circular Teflon mold (13 mm diameter and 4 mm height) and subsequently precipitated using a coagulation solution (1 M sodium hydroxide and ethanol 26 %, *v/v*). The gel formed was washed several times until neutrality. Crosslinking was carried out using genipin (0.5 %, *w/v*) in 0.05 M sodium citrate buffer pH 5.5 (buffer B) for 8 h at room temperature. Different concentrations of glutaraldehyde (0.5 %, 3.0 % and 5.0 %, *v/v*) in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 (buffer C) were tested for crosslinking during 3 h at

room temperature. The crosslinked gels were rinsed to eliminate the excess of genipin or glutaraldehyde and stored at 4 °C until analysis.

Texture profile analysis (TPA) of the chitosan crosslinked gels was performed in a TA-XT plus Texture Analyzer (Stable Micro System, UK) with a 20 mm diameter cylindrical probe (P/20), previously calibrated using a load cell of 50 kg. The samples were subjected to two consecutive cycle compression of 20 % at a constant speed of 2 mm.s⁻¹. From the force results, four textural parameters were quantified: hardness (or firmness), that is the force required to attain a given deformation of the material; cohesiveness, related to the work required to overcome the internal bonding of the material; and the gumminess, defined as the force required to completely disintegrate the material (Bourne, 2005). The effect of the different treatments was evaluated by analysis of variance (ANOVA). Tukey's t-test was used to distinguish differences among treatments. All tests were conducted in triplicate.

The rheological properties of chitosan crosslinked gels were performed using a rheometer (Haake MARS, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Germany) fitted with a 35 mm parallel plate with a gap of 4 mm. The rheometer imposed a strain sweep on the gel and the Haake rheowin® software measured the resulting stress, thus providing the parameters to understand the microstructural network of the gel system. These viscoelastic properties comprised the elastic modulus (G'), the energy storage in the material during deformation, and the viscous or loss modulus (G''), the energy dissipated as heat. Both properties were monitored during the strain variation of 0.1 % to 100 % (γ). The oscillatory strain sweep was performed in the controlled deformation (CD) mode with a constant frequency of 1 Hz at 25 ± 1 °C. The analyses were conducted in triplicate. Complex shear modulus (G^*) was estimated in order to determine the linear viscoelastic region (Zhai, Salomon, & Milliron, 2004), according to the following equation:

$$G^* = \sqrt{G'^2 + G''^2} \quad (\text{Eq. 1})$$

2.7 Enzyme immobilization

The preparation of chitosan for enzyme immobilization was conducted according to a previous report (Klein et al., 2013). The particles were activated with genipin 0.5 % (w/v, in buffer B), overnight at room temperature, or with glutaraldehyde 3 % (v/v, in

buffer C), for 3 h at room temperature. Then, they were washed with the same buffers and incubated with a solution of β -galactosidase from *K. lactis* (5 mL, 0.6 mg.mL⁻¹) prepared in 0.1 M of phosphate-potassium buffer, pH 7.0, containing 1.5 mM of MgCl₂, and with a solution of β -galactosidase from *A. oryzae* (5 mL, 0.5 mg.mL⁻¹), prepared in 0.1 M of sodium acetate buffer, pH 4.5.

The enzyme activity was measured adding 25 μ L of the free enzyme previously diluted or three chitosan particles with the immobilized enzyme in 475 μ L or 500 μ L of ONPG, respectively. The ONPG final concentration was 10 mM for *K. lactis* and 14 mM for *A. oryzae* β -galactosidases. The reaction was performed at 40 °C for 2 min, and it was stopped by the addition of 1.5 mL of sodium carbonate buffer (0.1 M, pH 10). One β -galactosidase unit was defined as the amount of enzyme required to hydrolyze 1 μ mol of ONPG per minute, under assay conditions. The immobilization yield (IY) and the immobilization efficiency (IE) were calculated according to the following equations (Sheldon & Van Pelt, 2013):

$$\text{IY (\%)} = \text{Immobilized activity}/\text{Applied activity} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\text{IE (\%)} = \text{Activity measured on the support}/\text{Immobilized activity} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

2.8 Storage and operational stability

Storage stability of the immobilized β -galactosidases was monitored during 35 days at 4 °C. The residual enzyme activity was measured as described above.

The operational stability of the immobilized enzymes was performed in Erlenmeyer's flasks containing 5 mL of buffered lactose solutions (5 %, w/v) and 31 U and 22 U of *K. lactis* and *A. oryzae* β -galactosidases, respectively. After each batch of reuse, the immobilized enzymes were washed with buffer and incubated with the lactose solution for a new batch. In the end of each batch of hydrolysis, samples were collected and enzymatically assayed for glucose formation.

3. Results and discussion

3.1 Characterization of the commercial enzymes

Celluclast is known as a cellulolytic enzyme preparation from *Trichoderma reesei*, which is able to hydrolyze (1,4)- β -D-glycosidic linkages in cellulose and other β -D-glucans. Pectinex Smash XXL and Pectinex Ultra Color, obtained from *Aspergillus aculeatus* and *Aspergillus niger*, respectively, are pectinase preparations able to catalyze

the eliminative cleavage of (1,4)- α -D-galacturonan methyl ester, and can be producing oligosaccharides with 4-deoxy-6-O-methyl- α -D-galact-4-enuronosyl groups at their non-reducing ends. Concerning the catalytic action of Lallzyme Beta, according to the supplier, it is a pectinolytic enzyme preparation that has a strong secondary glycosidase activity, produced by the fungus *Aspergillus niger*. The commercial enzymes were applied on the unripe genipap, which contains only traces of pectin and 0.45 g of cellulose per gram of dried fruit (Martina, 1931, cited by Figueiredo et al., 1986).

Protein concentration and activities of total pectinase, total cellulase and total β -glucosidase were evaluated to understand the possible mechanism of action of each commercial enzyme in genipin extraction (Table 1).

Table 1. Protein concentration and total pectinase, total cellulase and total β -glucosidase activities present in commercial enzymes.

Commercial enzyme	Protein (mg.mL ⁻¹)	Total pectinase (U.mL ⁻¹)	Total cellulase (U.mL ⁻¹)	Total β -glucosidase (U.mL ⁻¹)
Celluclast	275.99 \pm 1.49 ^b	638.41 \pm 15.96 ^d	2038.39 \pm 163.53 ^b	62.40 \pm 1.92 ^b
Pectinex Smash XXL	111.72 \pm 1.91 ^c	774.49 \pm 42.83 ^c	228.95 \pm 16.66 ^d	0.92 \pm 0.08 ^d
Pectinex Ultra Color	106.24 \pm 2.62 ^c	1126.66 \pm 6.23 ^b	939.77 \pm 43.61 ^c	11.75 \pm 0.24 ^c
Lallzyme Beta*	457.13 \pm 3.74 ^a	10467.04 \pm 560.67 ^a	23198.96 \pm 1627.51 ^a	95.19 \pm 1.92 ^a

*Protein in mg.g⁻¹ and activities in U.g⁻¹; Means followed by the same letter are not significantly different by Tukey's multiple comparison tests in each type of analysis (p<0.05).

Analyzing the Tab. 1, all commercial enzymes displayed the activities declared by the suppliers. The highest total pectinase activity was obtained using Lallzyme Beta, while Lallzyme Beta and Celluclast exhibited the highest total cellulase and total β -glucosidase activities. Regarding protein concentration, Lallzyme Beta and Celluclast also show the highest results (457.13 mg.g⁻¹ and 275.99 mg mL⁻¹, respectively), while Pectinex Ultra Color presents the lowest protein content (106.24 mg mL⁻¹). This concentration can be an indicative of the degree of purity of these enzymes along with the information of their activities. Hence, in the next experiments, we investigated the effects of all these commercial enzymes activities on the extraction of genipin.

3.2 Enzyme-assisted extraction of genipin in liquid-liquid two-phase aqueous system (TPAS) containing ethyl acetate

3.2.1 Effect of the enzyme concentration on the genipin extraction in TPAS

Figure 1A displays the kinetics of the enzyme-assisted extraction of genipin in the TPAS along time. As it can be seen, the concentration of genipin increases with the reaction time and tends to the stabilization after 90 min of reaction. This result can be

explained by the possible inhibition of β -glucosidase, since the conversion of geniposide into genipin releases glucose, an inhibitor of this enzyme. Moreover, the genipin formed is susceptible to spontaneous crosslinking with primary amino groups from peptides or proteins by covalent bonds in the aqueous phase. This reaction leads to the formation of an irreversible blue pigment, hindering the passage of genipin to the organic phase (Paik et al., 2001).

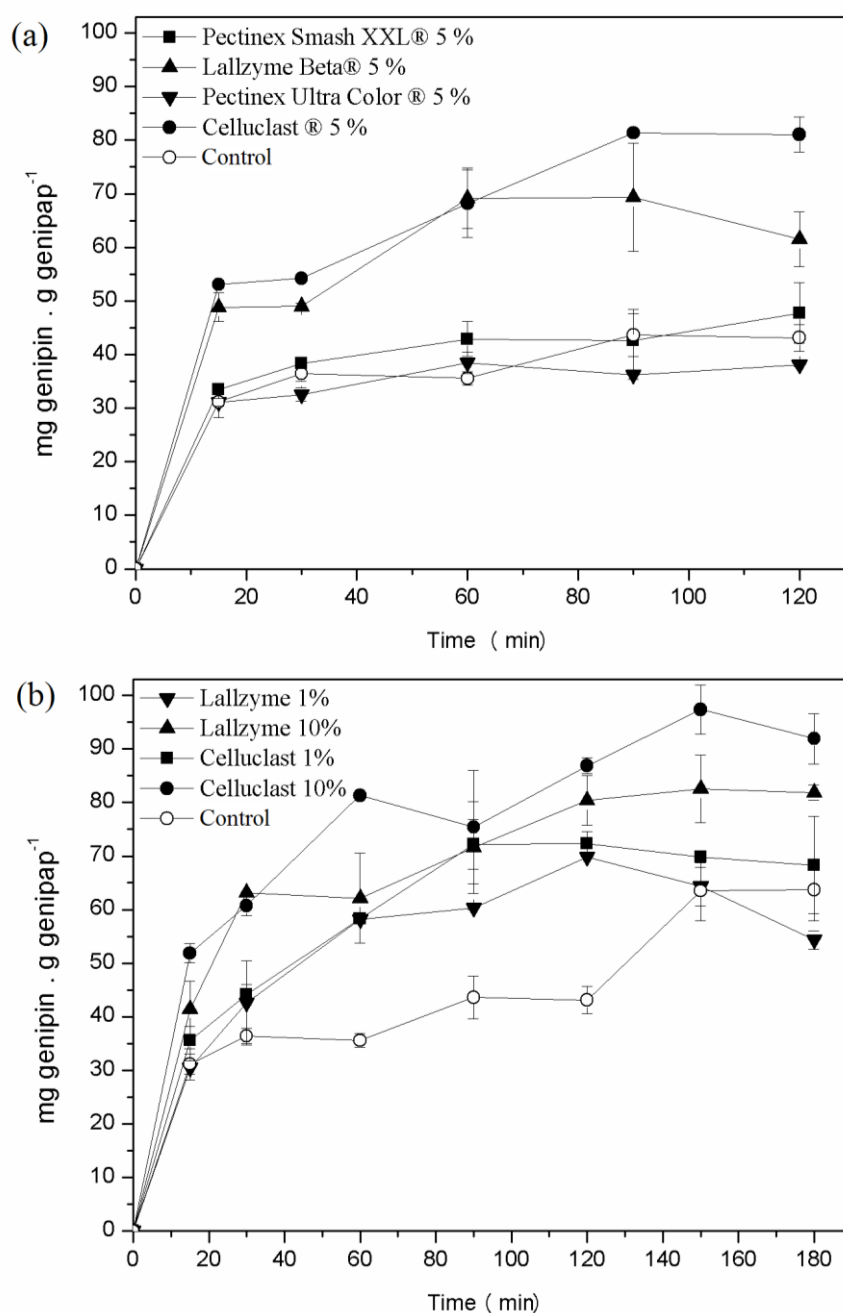


Figure 1. Kinetics of the enzyme-assisted extraction of genipin in TPAS using the commercial enzymes at 5 % (v/v) (a) using the two better commercial enzymes at 1 % (v/v) and 10 % (v/v) (b).

According to the graph of Fig. 1A, it is possible to observe that genipin extraction is stabilized after 90 min. Pectinex Ultra Color, Pectinex Smash XXL and the treatment without enzymes have little effect on the genipin conversion at 90 min. In these conditions, the concentrations of genipin were 36.18 mg.g⁻¹, 42.63 mg.g⁻¹ and 43.62 mg.g⁻¹, respectively. This lower effect can be probably due to the low content of cellulase and β -glucosidase in these preparations when compared to the others, once

these enzymes are essential for the hydrolysis of cellulose from the cell wall and geniposide, respectively (Xu et al., 2008). Li and co-workers (2015), also found that cellulases can extract more genipin (from *Eucommia ulmoides*) than pectinases.

Higher concentrations of genipin from the extraction were achieved using Celluclast (81 mg.g⁻¹) and Lallzyme Beta (69 mg.g⁻¹) at 90 min. These results can be explained by the efficient hydrolysis of the cell wall, due to the high cellulolytic and glycosidic activities in these enzyme preparations.

An additional process of extraction was carried out in order to evaluate the influence of ethyl acetate throughout the reaction. To do so, ethyl acetate was added in the final 30 min before reaction interruption. This condition, at the end of the extraction, provided only half of the concentration of genipin achieved in the previous experiments. The long reaction time without the presence of TPAS may increase the chances of crosslinking between genipin and proteins, explaining this result. Then, the addition of ethyl acetate from the beginning of the reaction allows the continuous migration of genipin as soon as it is released.

Since Celluclast and Lallzyme Beta provided improved concentrations of genipin from the extractions, they were also tested in the additional concentrations of 1 % (v/v) and 10 % (v/v) during 180 min of reaction (Fig. 1B).

Figure 1B shows an increase in genipin concentration with time using different enzyme concentrations. Using Celluclast 10 % (v/v) and Lallzyme Beta 10 % (w/v) during 150 min of reaction, it was possible to obtain 97.33 mg.g⁻¹ and 82.52 mg.g⁻¹ of genipin, respectively. Celluclast appears to be more effective for genipin extraction compared to Lallzyme Beta, which could represent an advantage from an economical point of view, since Celluclast is less expensive than Lallzyme Beta. According to Cho and co-workers (2006), cellulases from *Aspergillus oryzae* (used in the production of Lallzyme) are less capable of extracting genipin than cellulases from *Trichoderma viride* (the same genus as *Trichoderma reesei*, used in the production of Celluclast). Moreover, pectin methyl esterases hydrolyze methyl ester bonds from pectin, releasing methanol and pectic acid. The pectic acid, in turn, avoids the typical crosslinking of genipin with proteins, since, in the presence of bivalent cations (as Ca²⁺), it can form complexes comprised of pectic acid, calcium and proteins, thus capturing proteins that could react with genipin (Ramos-De-La-Peña et al., 2014). Possibly, the calcium present on genipap (46.3 mg.g⁻¹ in the unripe fruit and 33.4 mg.g⁻¹ in the ripe fruit) (Figueiredo

et al., 1986), released during extraction, might be involved in this reaction. These arguments explain the high concentrations of genipin obtained with Celluclast, since this commercial enzyme has 808 U.mL⁻¹ of pectin methyl esterases not found in Lallzyme Beta (Dal Magro, Dalagnol, et al., 2016).

3.2.2 Effect of pH and temperature for genipin extraction

Effect of pH and temperature for genipin extraction were assessed by CCRD using Celluclast 10 % (v/v) during 150 min of reaction. The results can be seen in Table 2.

Table 2. Experimental design and results for genipin extraction according to the 23 full factorial central composite design using Celluclast 10 % (v/v) (confidence = 95 %).

Treatment	Factors		Concentration
	Temperature (°C)	pH	mg genipin.g genipap ⁻¹
1	30	5.5	96.02
2	36	3.7	195.97
3	36	7.3	95.62
4	50	3.0	150.61
5	50	5.5	83.68
6	50	5.5	87.33
7	50	5.5	80.59
8	50	8.0	87.87
9	64	3.7	89.94
10	64	7.3	65.87
11	70	5.5	114.67

Temperature effect: -27.5 (p < 0.05); pH effect: -53.3 (p < 0.05); R-sqr: 0.75.

The experimental study indicated that pH and temperature effects have a negative behavior in genipin extraction and a statistically significant interaction (p = 0.008). The highest concentration of genipin (196 mg.g⁻¹) was obtained at a mild condition of temperature and slightly acid pH (36 °C and pH 3.7). Compared to others works, the data found using the experimental design in this study was almost six times superior and twelfold faster than the best extraction of genipin from genipap (34 mg.g⁻¹) (Ramos-de-la-Peña et al., 2015) and three times superior when compared with the best genipin extraction obtained from gardenia fruit, using enzymes and solvents (58.83 mg per gram of *Gardenia jasminoides*) (Winotapun et al., 2013). These comparisons reveal that, currently, the extraction method employed in this work is the most efficient to obtain genipin from genipap and possibly indicates that genipap pulp has greater concentrations of geniposide than gardenia fruit.

Most enzymes are unstable at higher temperatures and the maintenance at low temperatures preserves enzyme activity, allowing its continuous action on the substrate (genipap). On the other hand, increased pHs facilitate amino groups deprotonation ($-\text{NH}_2$), improving the probability of interaction between proteins (added enzymes or proteins/enzymes from genipap) and genipin in the aqueous phase, preventing its transfer to the organic phase. In addition, according to Delmar and co-workers (2015), the crosslinking between chitosan and genipin can be fourfold faster in higher pHs (pH 5.5) than at lower pHs (pH 4.5), emphasizing the higher probability of interactions at higher pHs. In our extractions carried out at higher pHs (as pH 7.3 and pH 8), the crosslinking of genipin and proteins was observed through the formation of a strong color blue pigment (see Supplementary material, Fig. S1). The same was not visualized at 36 °C and pH 3.7, since in this condition the probability of genipin reaction with protein is low, due to the presence of protonated amino groups ($-\text{NH}_3$).

3.3 Direct extraction of genipin from genipap and spectroscopic identification of compounds

In the best condition of pH and temperature, it was possible to extract approximately 196 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ of genipin with 97 % of purity, as confirmed by HPLC-DAD. However, aiming to a determination of the total content of genipin available in genipap a direct extraction was carried out using methanol 80 % (v/v).

Over direct extraction, single three cycles were sufficient to extract all genipin in the fruit, which was 38.28 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ with 32 % of purity. This result is lower than the concentration achieved without enzymes in TPAS (43 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ with 87 % of purity) and can be an indicative that methanol inhibits the enzymes naturally present in the dried fruit. Moreover, the TPAS confers to both enzyme and genipin a protective environment, preventing the denaturation of enzymes due to contact with organic solvents and the possibility of crosslinking between proteins and genipin in the aqueous phase.

The compounds from direct extraction and enzyme-assisted extraction in TPAS were separated and analyzed by HPLC-DAD-ESI/MS. By the fragmentation pathways, it was possible to identify four different iridoids: genipin, geniposide, shanzhiside and the aglycone of shanzhiside. The structures and its chromatographic and spectroscopic characteristics can be seen in Supplementary material, Figure S2, and in Table 3, respectively.

Table 3. Chromatographic and spectroscopic characteristics of the compounds present in the organic phase recovered from the enzyme-assisted extraction in TPAS and from the direct extraction.

Extraction method	Compound	Mass (g.mol ⁻¹)	t _R (min) ^a	UV λ _{max} (nm) ^b	Compared with standard	[M-H] ⁻ m/z	[M+AcO] ⁻ m/z	ESI-MS/MS m/z
Enzyme-assisted extraction in TPAS	Aglycone of shanzhiside	230.214	3.2	233	No	211	-	201, 207, 147, 123, 101, 167
	Genipin	226.228	6.6	238	Yes	225	-	123, 101, 207
	Sanzhiside	392.355	3.1	228	No	391	-	391→ 229, 119, 167, 185, 149, 113
Direct extraction	Geniposide	388.369	4.7	238	No	387, 433	-	433→ 225, 101, 207, 123
	Genipin	226.228	6.6	238	Yes	225	225	(-)225→ 147, 101, 123 (+)225→ 123, 101, 207

^aRetention time on the column; ^bsolvent: methanol:milliQ water (45:55, v/v).

The structures were further characterized mainly based on their MS fragmentation behavior. Both chromatographic and spectroscopic characteristics of the samples confirmed the presence of genipin in negative ionization mode, except for the direct extraction, which was identified also in the positive ionization mode. The genipin molecule was identified in its deprotonated form (m/z 225). The fragment at m/z 207 was generated by the loss of an OH radical localized in C⁻¹ from the ion at m/z 225. The product ion at m/z 147 was relative to a successive loss of an OH radical on C⁻¹ and a methyl ester (32 u) on C-4 (Ding et al., 2012). The presence of a product ion at m/z 123 resulted from the loss of 3-oxopropanoate methyl group (102 u) from genipin and the fragment at m/z 101 was regarded to the 3-oxopropanoate group of ionized methyl also from genipin (Wu et al., 2014).

The other iridoid found in the enzyme-assisted in TPAS extraction was the aglycone of shanzhiside, a structure similar to genipin. The differences between them concerns on the C-4, C-6 and C-8 atoms (Fig. 3). The aglycone of shanzhiside has 230 g.mol⁻¹ of mass and it appeared in the [M-H]⁻ spectra at m/z 211, a signal due to a loss of a water molecule (18 u) (Zhou et al., 2010). The other signals occurred at m/z 201, corresponding to a loss of CO molecule (28 u), and at m/z 147, due to a break of its structure, probably releasing C₆H₆.

Besides genipin, two iridoid glycosides were found in the direct extraction. These structures are glycosylated molecules due to the absence of enzymes to cleave and release glucose in this extraction. The first compound was the shanzhiside, identified in

its deprotonated form in [M-H]⁻ at m/z 391, which was in accord with the literature (Zhou et al., 2010). The fragment at m/z 229 referred to the loss of a glucose molecule (162 u), while the product ion at m/z 185 could be assigned to a loss of CO₂ molecule (44 u). In addition, fragments at m/z 167 and at m/z 149 indicate successive losses of water molecules (18 u). Moreover, the product ion at m/z 119 corresponds to a partial cleavage and release of glucose molecule presents in the shanzhiside structure (see Fig. 3). The same characteristics were related by Zhou and co-workers (2010). The last released component in this extraction, using methanol 80 %, was the geniposide. It was identified in its deprotonated form at m/z 387 and at m/z 433, as also found by Wang and co-workers (2016). The fragment ion at m/z 433 was probably generated from binding with an ethyl ester molecule (46 u). The product ions of genipin were also observed in this ionization at m/z 225 due to the release of geniposide's glycosidic group.

3.4 Textural and rheological characterization of chitosan gels crosslinked with genipin and glutaraldehyde

Textural properties of chitosan gels crosslinked with genipin and glutaraldehyde were determined using a texture analyzer (Table 4).

Table 4. Textural profile analysis of chitosan gels crosslinked with genipin or with glutaraldehyde.

Chitosan gels	Units in gram force ¹		
	Hardness	Cohesiveness ²	Gumminess
(control)	55.2 ± 2.9 ^a	1.0 ± 0.0 ^a	56.8 ± 0.6 ^a
0.5 % (w/v) of genipin	254.3 ± 84.5 ^{bc}	1.0 ± 0.1 ^a	231.8 ± 43.2 ^{bc}
0.5 % (v/v) of glutaraldehyde	101.0 ± 7.0 ^{ab}	1.0 ± 0.0 ^a	101.7 ± 10.2 ^a
3 % (v/v) of glutaraldehyde	164.7 ± 48.3 ^{abc}	0.9 ± 0.1 ^a	140.5 ± 31.4 ^{ab}
5 % (v/v) of glutaraldehyde	325.4 ± 23.7 ^c	0.8 ± 0.1 ^a	271.3 ± 35.4 ^c

¹Means followed by the same letter are not significantly different by Tukey's multiple comparison tests ($p < 0.05$); ²undimensionless.

The chitosan gels crosslinked with glutaraldehyde presented an improvement in their properties of hardness and gumminess with increasing glutaraldehyde concentrations, except for cohesiveness. The control sample, as expected, gave the lowest values for the parameters evaluated. The presence of the crosslinker allows the formation of covalent linkages that maintain a rigid structure of chitosan gels. According to Mi and co-workers (2002), crosslinking of chitosan gels with glutaraldehyde and genipin is able to significantly reduce the in vivo degradability of

the particles. Then, all the samples crosslinked with glutaraldehyde have shown more resistance to deformation and disintegration. The cohesiveness of gels crosslinked with different concentrations of glutaraldehyde does not differ significantly among the formulations. This is probably due to the fact that the force being applied was not enough to disestablish the internal bonds of the material (Ikeda & Henry, 2016). When genipin 0.5 % (w/v) was used for crosslinking of chitosan gels, the values of hardness and gumminess were between those for the gels crosslinked with glutaraldehyde 3 % (v/v) and 5 % (v/v). This way, in order to obtain the same textural quality, a less concentration of genipin is required in comparison with glutaraldehyde, thus representing an advantage from the economical and toxicological point of view.

Aiming to understand the stability of these gels to deformation, a characterization using a rheometer was carried out. Figure 2 displayed the samples behavior after the strain sweep test is applied. In the graphs, the variation of the viscoelastic properties, G' (elastic modulus), G'' (viscous modulus) and G^* (complex shear modulus), on the long of the strain amplitude applied give the stability behavior of samples. The complex shear modulus indicates the attractive force among particles of the material sample. G^* is defined as strain level where the complex shear modulus drops to 90 % of the original G^* value. Thus, the strain amplitude intervals at which the G^* remains stable represents that the material network does not depend on the level of applied strain and the material behaves as a highly and stabilized structured (Zhai et al., 2004).

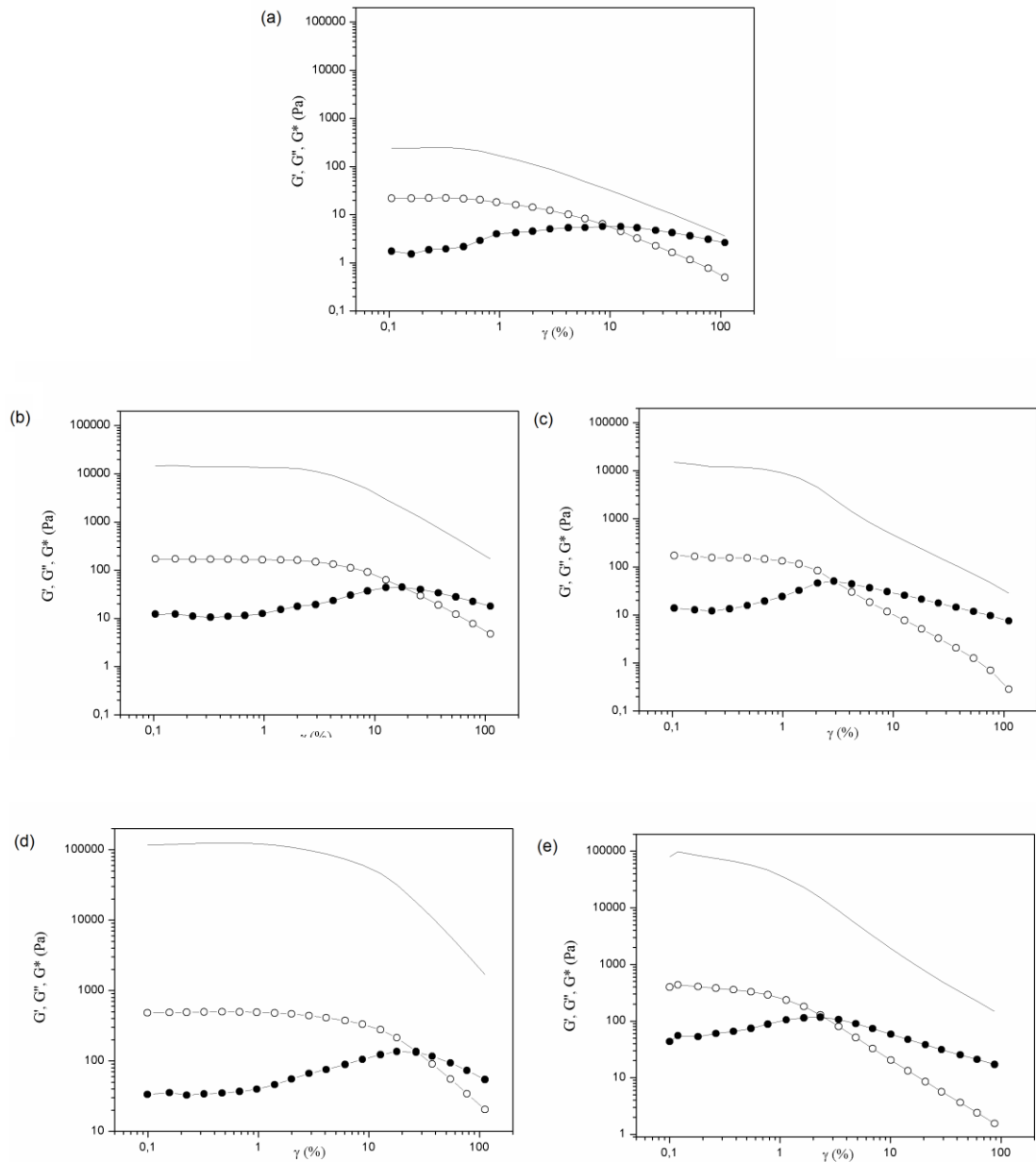


Figure 2. Variation of the viscoelastic properties as a function of the strain amplitude at 25 °C and 1 Hz. Open symbols indicated G' (○), closed symbols indicated G'' (●) and line indicated G^* (-). Samples are as follows: (a) control; (b) chitosan crosslinked with genipin 0.5 % (w/v); (c) chitosan crosslinked with glutaraldehyde 0.5 % (v/v); (d) chitosan crosslinked with glutaraldehyde 3 % (v/v); (e) chitosan crosslinked with glutaraldehyde 5 % (v/v) (axes are displayed in logarithmic scale).

The graphs from Fig. 2 display a similar behavior for all the gels analyzed. It is known that when G' is higher than G'' , the system is more resistant and has a solid-like behavior, such as strong gels and balms. When G' has the same magnitude as G'' , the

system is softer and stickier. On the other hand, when G'' is higher than G' , the gels are weak and the system has a liquid-like behavior (Coblas, Broboana, & Balan, 2016). It can be observed that when an external strain is imposed, the system resists against deformation up to a certain strain, when G'' becomes higher than G' ; from this point, the structure of the system becomes unstable. Therefore, the gels are stronger at the beginning of the strain sweep, and, at the end, get more similar to a fluid. For the chitosan gels crosslinked with genipin 0.5 % (w/v) and with glutaraldehyde 3 % (v/v), G' values stay higher than G'' under a large range of strain compared to the other gels, being an indicative of higher stability. Moreover, during the application of the strain sweep, it is possible to perceive, at first, an improvement of G'' values followed by their decreasing (Hyun, Kim, Ahn, & Lee, 2002). According to Hyun and co-workers (2002), this is known as weak strain overshoot and occurs in materials similar to xanthan gum.

Analyzing the G^* values (Fig. 2), the stability of the gels system over strain amplitude was lower for the control gel and for the gels crosslinked with glutaraldehyde 0.5 % (v/v) and 5 % (v/v) compared to the gel crosslinked with genipin 0.5 % (w/v). The linear viscoelasticity zone of the chitosan gels crosslinked with genipin 0.5 % (w/v) goes from 0.1 % to 2 % of the applied strain. Similar results were obtained by Moura and co-workers (2007), who affirmed that chitosan hydrogels crosslinked with genipin were stronger to deformation compared to control samples. On the other hand, the chitosan gels crosslinked with glutaraldehyde 3 % (v/v) tested in this study were stable from 0.1 to 1.98 % of the applied strain. This gel exhibited a similar stability compared to the system using genipin 0.5 % (w/v). However, it is possible to realize that when an excessive amount of crosslinker is added on chitosan gels, their stabilities decrease. It can be attributed to an excess of covalent bonds inside the gel structure, conferring a rigid structure, however more brittle. Then, it can be concluded that for glutaraldehyde, an intermediate concentration is ideal, giving rise to resilient chitosan gels.

Based on the rheological properties, the chitosan gels with genipin 0.5 % (w/v) and with glutaraldehyde 3 % (v/v) have the highest dynamic modulus, characterizing them as the most resistant to total strain G^* of all the gels evaluated. Regarding the textural properties, the gels crosslinked with genipin 0.5 % (w/v) are superior to those with glutaraldehyde 3 % (v/v). This fact can be explained by the structural differences

provided to the gels when using genipin or glutaraldehyde as crosslinkers (Supplementary material, Figure S3).

According to Butler and co-workers (2003), the crosslink formed with genipin molecules will be more flexible, allowing network polymer molecules to be linked further apart. The structure of genipin confers flexibility to the crosslinking system due to the arrangement of its cyclic rings, more resilient than comparing with glutaraldehyde, which has a linear chain that renders the chitosan gels more rigid and brittle. From the crosslinked structures in Fig. 5, it can be observed that genipin-crosslinked network has a more steric hindrance that minimizes the impact of external forces due to its bulky heterocyclic structure (Mi et al., 2002). Therefore, it can be said that the different crosslinkers directly interfere in the structures and features of the chitosan gels formed.

In general, it is possible to conclude that glutaraldehyde can be replaced for genipin 0.5 % (w/v) for chitosan gels crosslinking, presenting many advantages: (i) it results in a more resistant and resilient structure, (ii) it requires ten times less crosslinker when compared with glutaraldehyde 5% (v/v) (usually used for immobilization (Klein et al., 2012)), (iii) it provides less cytotoxic gels than glutaraldehyde (Sung et al., 1999), (iv) it has the property of fixing proteins, and (v) it shows resistance against in vivo degradation (Mi et al., 2002).

3.5 Enzyme immobilization

Genipin reacts covalently and spontaneously with any primary amine group through a monosubstitution reaction (Butler et al., 2003). Due to this feature, it can be employed as a crosslinking agent in immobilization protocols. In this work, we evaluate and compare the immobilization of two different β -galactosidases as model enzymes on chitosan, which was previously activated using extracted genipin or glutaraldehyde.

The IY (immobilization yield) of *K. lactis* and *A. oryzae* β -galactosidases immobilized on the chitosan activated with genipin was 74 % and 67 %, respectively. Using glutaraldehyde, the IY was 99% for both enzymes. Regarding the IE (immobilization efficiency), 8 % and 3 % were obtained with genipin as crosslinker, and 7 % and 46 % when using glutaraldehyde, for *K. lactis* and *A. oryzae* β -galactosidase, respectively. Despite the low values of IE (quite normal in

immobilization studies), it was possible to attach the enzyme to the chitosan particles through crosslinking with genipin.

The reusability of the immobilized enzymes was performed to assess the maintenance of its catalytic activity in several batches of lactose hydrolysis (reuses) (Supplementary material, Figure S4). For the first batch, the *A. oryzae* and *K. lactis* β -galactosidases immobilized on chitosan activated with genipin were able to hydrolyze 63.6 % and 86.5 % of the lactose solution (Fig. S4a), respectively. For the β -galactosidases immobilized on chitosan activated with glutaraldehyde, the percentages of lactose hydrolysis were 4.6 % and 8.5 % for *A. oryzae* and *K. lactis* β -galactosidases (Fig. S4b), respectively. After 19 cycles of reuse, the biocatalysts were still able to hydrolyze almost the same percentage of lactose. The lactose hydrolysis was always higher when using the β -galactosidases immobilized using genipin as a crosslinker. It is possible that the active conformation of enzyme molecules are less affected by genipin than by glutaraldehyde, which presents a small and very reactive structure. According to Giacomini and co-workers (1998), the reaction of glutaraldehyde with enzymes is responsible for changes in the enzyme conformation with a resultant loss of activity. Since *K. lactis* β -galactosidase has more hydrolytic nature than *A. oryzae* β -galactosidase (that is better for transgalactosylation reaction), the percentages of conversion were always higher when using the biocatalyst containing *K. lactis* β -galactosidases.

The stability of β -galactosidases immobilized on chitosan with the two crosslinkers was also evaluated under refrigeration at 4 °C and, during all storage time (35 days), the enzymatic activity remained constant.

4. Conclusions

In this study, we applied for the first time the enzyme-assisted extraction in TPAS to obtain genipin from genipap. This technique proved to be simple, inexpensive and efficient to extract the highest genipin concentration from genipap reported until now (196 mg.g⁻¹). Moreover, from this study, we found that low pHs are adequate for the genipin extraction, while neutral pHs are recommended for the crosslinking reaction of proteins and enzymes. In general, chitosan gels crosslinked with genipin showed to be more resilient and stable than compared to gels crosslinked with glutaraldehyde, giving rise to very active β -galactosidase biocatalysts. Finally, our results suggest that genipin is a promising agent, able to replace glutaraldehyde with several advantages.

Acknowledgments

This work was supported by Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq), Rio Grande do Sul State Foundation for Research Support (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - FAPERGS), and the Improvement Coordination for Higher Level Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES) from Brazilian government.

References

Bailão, E. F. L. C., Devilla, I. A., da Conceição, E. C., & Borges, L. L. (2015). Bioactive compounds found in Brazilian cerrado fruits. *International Journal of Molecular Sciences*. <http://doi.org/10.3390/ijms161023760>

Bentes, Á. de S., de Souza, H. a. L., Amaya-Farfan, J., Lopes, A. S., & de Faria, L. J. G. (2014). Influence of the composition of unripe genipap (*Genipa americana* L.) fruit on the formation of blue pigment. *Journal of Food Science and Technology*, 52(June), 3919–3924. <http://doi.org/10.1007/s13197-014-1651-9>

Bourne, M. (2005). Texture in solid and semi-solid foods. In *Encyclopedia of Life Sypport Systems (EOLSS) (Vol. II)*.

Butler, M. F., Ng, Y. F., & Pudney, P. D. a. (2003). Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 41(24), 3941–3953. <http://doi.org/10.1002/pola.10960>

Carrillo-Ocampo, D., Bazaldúa-Gómez, S., Bonilla-Barbosa, J. R., Aburto-Amar, R., & Rodríguez-López, V. (2013). Anti-inflammatory activity of iridoids and verbascoside isolated from *Castilleja tenuiflora*. *Molecules*, 18(10), 12109–12118. <http://doi.org/10.3390/molecules181012109>

Cho, Y. J., Kim, S. Y., Kim, J., Choe, E. K., Kim, S. I., & Shin, H. J. (2006). One-step enzymatic synthesis of blue pigments from geniposide for fabric dyeing. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 11(3), 230–234. <http://doi.org/10.1007/BF02932035>

Coblas, D., Broboana, D., & Balan, C. (2016). Correlation between large amplitude oscillatory shear (LAOS) and steady shear of soft solids at the onset of the

fluid rheological behavior. *Polymer* (United Kingdom), 104, 215–226. <http://doi.org/10.1016/j.polymer.2016.06.003>

Dal Magro, L., Dalagnol, L. M. G., Manfroi, V., Hertz, P. F., Klein, M. P., & Rodrigues, R. C. (2016). Synergistic effects of Pectinex Ultra Clear and Lallzyme Beta on yield and bioactive compounds extraction of Concord grape juice. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 157–165. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.046>

Dal Magro, L., Goetze, D., Ribeiro, C. T., Paludo, N., Rodrigues, E., Hertz, P. F., ... Rodrigues, R. C. (2016). Identification of Bioactive Compounds From *Vitis labrusca* L. Variety Concord Grape Juice Treated With Commercial Enzymes: Improved Yield and Quality Parameters. *Food and Bioprocess Technology*, 9(2), 365–377. <http://doi.org/10.1007/s11947-015-1634-5>

Delmar, K., & Bianco-Peled, H. (2015). The dramatic effect of small pH changes on the properties of chitosan hydrogels crosslinked with genipin. *Carbohydrate Polymers*, 127, 28–37.

Ding, Y., Zhang, T., Tao, J. S., Tan, B., Guo, C. R., & Yang, L. (2012). HPLC-MS/MS method to determine genipin in rat plasma after hydrolysis with sulfatase and its application to a pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, 26(7), 816–825. <http://doi.org/10.1002/bmc.1735>

Dong, Y., Liu, L., Bao, Y., Hao, A., Qin, Y., Wen, Z., & Xiu, Z. (2014). Biotransformation of geniposide in *Gardenia jasminoides* to genipin by *Trichoderma harzianum* CGMCC 2979. *Cuihua Xuebao/Chinese Journal of Catalysis*, 35(9), 1534–1546. [http://doi.org/10.1016/S1872-2067\(14\)60134-0](http://doi.org/10.1016/S1872-2067(14)60134-0)

Feng, Q., Cao, H., Xu, W., Li, X., Ren, Y., & Du, L. (2011). Apoptosis induced by genipin in human leukemia K562 cells: involvement of c-Jun N-terminal kinase in G₂/M arrest. *Acta Pharmacologica Sinica*, 32(4), 519–527. <http://doi.org/10.1038/aps.2010.158>

Figueiredo, R. W., Maia, G. A., de Holanda, L. F. F., & Monteiro, J. C. S. (1986). Características Físicas E Químicas Do Jenipapo. *Pesq. Agropec. Bras.*, 21(4), 421–428.

Ghose, T. K. (1987). Measurement of Cellulase Activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2), 257–268. <http://doi.org/10.1351/pac198759020257>

Giacomini, C., Villarino, A., Franco-fraguas, L., & Batista-viera, F. (1998). Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: comparison of different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 4, 313–327.

Gong, G., Zheng, Z., Liu, H., Wang, L., Diao, J., Wang, P., & Zhao, G. (2014). Purification and Characterization of a β -Glucosidase from *Aspergillus niger* and Its Application in the Hydrolysis of Geniposide to Genipin. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 24(6), 788–794. <http://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2511>

Hyun, K., Kim, S. H., Ahn, K. H., & Lee, S. J. (2002). Large amplitude oscillatory shear as a way to classify the complex fluids. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 107(1–3), 51–65. [http://doi.org/Pii_S0377-0257\(02\)00141-6](http://doi.org/Pii_S0377-0257(02)00141-6) [http://doi.org/10.1016/S0377-0257\(02\)00141-6](http://doi.org/10.1016/S0377-0257(02)00141-6)

Ikeda, S., & Henry, K. (2016). Effects of Partial Replacement of Gelatin in High Sugar Gels with Gellan on their Textural, Rheological, and Thermal Properties. *Food Biophysics*, 11(4), 400–409. <http://doi.org/10.1007/s11483-016-9454-3>

Klein, M. P., Fallavena, L. P., Schöffner, J. D. N., Ayub, M. A. Z., Rodrigues, R. C., Ninow, J. L., & Hertz, P. F. (2013). High stability of immobilized β -d-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 465–470. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.044>

Klein, M. P., Hackenhaar, C. R., Lorenzoni, A. S. G., Rodrigues, R. C., Costa, T. M. H., Ninow, J. L., & Hertz, P. F. (2016). Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and β -d-galactosidase immobilization. *Carbohydrate Polymers*, 137, 184–190. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.069>

Klein, M. P., Nunes, M. R., Rodrigues, R. C., Benvenutti, E. V., Costa, T. M. H., Hertz, P. F., & Ninow, J. L. (2012). Effect of the support size on the properties of β -galactosidase immobilized on chitosan: Advantages and disadvantages of macro and nanoparticles. *Biomacromolecules*, 13(8), 2456–2464. <http://doi.org/10.1021/bm3006984>

Lee, G.-H., Lee, M.-R., Lee, H.-Y., Kim, S. H., Kim, H.-K., Kim, H.-R., & Chae, H.-J. (2014). *Eucommia ulmoides* Cortex, Geniposide and Aucubin Regulate

Lipotoxicity through the Inhibition of Lysosomal BAX. PLoS ONE, 9(2), e88017. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0088017>

Li, L., Guo, Y., Zhao, L., Zu, Y., Gu, H., & Yang, L. (2015). Enzymatic Hydrolysis and Simultaneous Extraction for Preparation of Genipin from Bark of *Eucommia ulmoides* after Ultrasound, Microwave Pretreatment. *Molecules*, 20, 18717–18731. <http://doi.org/10.3390/molecules201018717>

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265–275. [http://doi.org/10.1016/0304-3894\(92\)87011-4](http://doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4)

Mi, F., Tan, Y., Liang, H., & Sung, H. (2002). In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant. *Biomaterials*, 23, 181–191.

Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 426–428.

Moura, M. J., Figueiredo, M. M., & Gil, M. H. (2007). Rheological study of genipin cross-linked chitosan hydrogels. *Biomacromolecules*, 8(12), 3823–3829. <http://doi.org/10.1021/bm700762w>

Paik, Y. S., Lee, C. M., Cho, M. H., & Hahn, T. R. (2001). Physical stability of the blue pigments formed from geniposide of gardenia fruits: Effects of pH, temperature, and light. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 430–432. <http://doi.org/10.1021/jf000978f>

Parry, N. J., Beever, D. E., Owen, E., Vandenberghe, I., Van Beeumen, J., & Bhat, M. K. (2001). Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable beta-glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. *The Biochemical Journal*, 353(Pt 1), 117–127. <http://doi.org/10.1042/0264-6021:3530117>

Ramos-de-la-Peña, A. M., Montañez, J. C., Reyes-Vega, M. de la L., Hendrickx, M. E., & Contreras-Esquivel, J. C. (2015). Recovery of genipin from genipap fruit by high pressure processing. *LWT - Food Science and Technology* (Vol. 63). <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.038>

Ramos-De-La-Peña, A. M., Renard, C. M. G. C., Wicker, L., Montañez, J. C., García-Cerda, L. A., & Contreras-Esquivel, J. C. (2014). Environmental friendly cold-mechanical/sonic enzymatic assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa*

americana). Ultrasonics Sonochemistry, 21(1), 43–49.
<http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.06.008>

Sheldon, R. A., & Van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. Chemical Society Reviews, 42(42), 6223–6235.
<http://doi.org/10.1039/c3cs60075k>

Sung, H.-W., Huang, R.-N., Huang, L. L. H., & Tsai, C.-C. (1999). In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 10(1), 63–78.
<http://doi.org/10.1163/156856299X00289>

Wang, L., Liu, S., Xing, J., Liu, Z., & Song, F. (2016). Characterization of interaction property of multi-components in *Gardenia jasminoides* with aldose reductase by microdialysis combined with liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom., 30, 87–94.
<http://doi.org/10.1002/rcm.7620>

Winotapun, W., Opanasopit, P., Ngawhirunpat, T., & Rojanarata, T. (2013). One-enzyme catalyzed simultaneous plant cell disruption and conversion of released glycoside to aglycone combined with in situ product separation as green one-pot production of genipin from gardenia fruit. Enzyme and Microbial Technology, 53(2), 92–96. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.05.001>

Wu, X., Zhou, Y., Yin, F., Mao, C., Li, L., Cai, B., & Lu, T. (2014). Quality control and producing areas differentiation of *Gardeniae Fructus* for eight bioactive constituents by HPLC-DAD-ESI/MS. Phytomedicine, 21(4), 551–559.
<http://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.10.002>

Xu, M., Sun, Q., Su, J., Wang, J., Xu, C., Zhang, T., & Sun, Q. (2008). Microbial transformation of geniposide in *Gardenia jasminoides* Ellis into genipin by *Penicillium nigricans*. Enzyme and Microbial Technology, 42, 440–444.
<http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.01.003>

Zhai, H., Salomon, D., & Milliron, E. (2004). Using Rheological Properties to Evaluate Storage Stability and Setting Behaviors of Emulsified asphalts.

Zhou, T., Fan, G., Hong, Z., Chai, Y., & Wu, Y. (2005). Large-scale isolation and purification of geniposide from the fruit of *Gardenia jasminoides* Ellis by high-speed

counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1100(1), 76–80. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.09.026>

Zhou, T., Liu, H., Wen, J., Fan, G., Chai, Y., & Wu, Y. (2010). Fragmentation study of iridoid glycosides including epimers by liquid chromatography-diode array detection/ electrospray ionization mass spectrometry and its application in metabolic fingerprint analysis of *Gardenia jasminoides* Ellis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry (RCM)*, 24, 2520–2528. <http://doi.org/10.1002/rcm>

Zhu, Y., Zhao, B., Huang, X., Chen, B., & Qian, H. (2014). A substrate fed-batch biphasic catalysis process for the production of natural crosslinking agent genipin with *Fusarium solani* ACCC 36223. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(6), 814–819. <http://doi.org/10.4014/jmb.1407.07045>

CAPÍTULO 5: PLANT SOURCES, EXTRACTION METHODS AND APPLICATIONS OF GENIPIN

(Artigo submetido à Revista *Industrial Crops and Products*)*

Anelise S. Bellé^a, Luiza S. Spolidoro^a, Manuela P. Klein^b, Plinho F. Hertz^a

^a Enzymology Laboratory, Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, 9500 Bento Gonçalves Ave, P.O. Box 15090, ZC 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Nutrition Department, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, 245 Sarmento Leite St, ZC 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author:

Tel.: +55 51 3308 7094; fax: +55 51 3308 7048

E-mail address: plinho@ufrgs.br (P. F. Hertz)

Web: www.ufrgs.br/bbb

ABSTRACT

Genipin is an iridoid obtained from the hydrolysis of geniposide, both genipin and geniposide being found in various plant species. When pure, genipin has high added value and a wide range of applications. Thereby, this review aims to present its properties, main plant sources, extraction methods, and possible applications in different fields. The main benefits of genipin include its low cytotoxicity and high reactivity with amino acids, proteins, and peptides. The compound is currently employed as a natural activation agent for enzyme immobilization, as well as in biomedicine, tanning and fabric dyeing, besides presenting promising characteristics for applications in the food industry. The species *Gardenia jasminoides* and *Genipa americana* L. are the most commonly used for genipin extraction, although other sources, such as *Eucommia ulmoides* and *Apodytes dimidiata*, are also known. Genipap fruit (*Genipa americana* L.) represents an excellent vegetal source for the extraction of genipin, and in comparison with *Gardenia* fruit, has a greater content of genipin and geniposide. Extraction of genipin has been done for almost 60 years, but lately an increasing number of works have shown the development of more environmentally friendly extraction techniques, thus reducing the use of toxic substances while obtaining genipin from plant sources.

Keywords: genipin; geniposide; extraction methods; genipap; properties.

1. Introduction

Genipin is an organic compound discovered in 1960 by Djerassi and collaborators. Belonging to the superclass of lipids, it is an iridoid known as the aglycone form of geniposide. The structural difference of geniposide with respect to genipin is found in the C1 of hexane, where the former is bonded with glucose and the latter with a hydroxyl group. Later, more accurate in 1997, Dewick uncovered terpenoid biosynthesis, and in 2007, Liu & Lou found that the source of geniposide was given from the cycles of mevalonic acid pathway (MAP) and 2-C-Methylerythritol 4-phosphate (MEP).

Genipin, as well as geniposide, can be naturally found in many different plant species. According to the literature, their main sources are *Gardenia jasminoides* (gardenia) and *Genipa americana* L. (genipap fruit). In gardenia fruit, genipin corresponds to 0.17%, whereas in genipap this amount may range from 1% to 3% (Djerassi et al., 1960; Ramos-de-la-Peña et al., 2016). Moreover, the geniposide content available in gardenia is 4.2%, while in green genipap fruit it reaches approximately 12% of dry matter (Bentes and Mercadante, 2014; Xu et al., 2016).

Thus, among currently known plant sources, genipap has been considered the most promising in terms of genipin extraction. Widely distributed in Central and South America (Renhe et al., 2009), the fruit possesses both genipin and geniposide in its endocarp and mesocarp (Ramos-De-La-Peña et al., 2014).

Due to genipin's high added value, an increasing number of studies have revealed new methodologies for its extraction, for instance, enzymatic action, solvents and ultrasound. Since these techniques may provide different extraction efficiencies, careful analysis is needed prior to their application, either alone or combined.

When isolated, genipin presents itself as a white to yellowish powder, which is capable of spontaneously reacting with primary amino groups, thus producing an intense blue coloration. This, along with genipin's high resistance to temperature variations, makes it a compound of wide application, with promising uses in enzyme immobilization and biomedicine, owing to its crosslinking ability; in the food industry and for quantification of amino groups, because of its colorimetric property; and even in medicine, since hepatoprotective, anticancer, neuroprotective, choleric, anti-inflammatory, antithrombotic, antibacterial, gastritis curative, antidiabetic and anti-

depressant-like effects related to genipin have been reported (Kim et al., 2013; Tian et al., 2010; Winotapun et al., 2013).

Therefore, the aim of this study is to present a review of the main plant sources for genipin extraction, as well as existing extraction methods and the properties of extracted genipin for application in the biomedical, food, scientific research, among other fields.

2. Biosynthesis of genipin

Genipin is classified as an iridoid, a type of monoterpene produced by plants. Iridoids are synthesized from geraniol, a monoterpene derived from either MAP or MEP biosynthetic pathways (Dewick, 1997; Liu and Lou, 2007) (Figure 1). Through oxidation and hydroxylation reactions, a new carbon-carbon bond is formed (Michael nucleophilic addition), leading to the cyclization of geraniol, thus originating the iridoid nucleus (Sampaio-Santos and Kaplan, 2001; Simões et al., 2004).

Then, oxidation of C⁻¹ from the iridotrial generates the aglycone of α -deoxycholanic acid. This, upon undergoing glycosylation, forms α -deoxyglycan acid, known as the precursor of iridoids with 8 α stereochemistry (α conformation at C⁻¹⁰) (Jensen, 1991), of which boschaloside and tarennoside are reaction intermediates. Following, geniposidic acid and geniposide are formed (Uesato et al., 1984). Genipin, which in turn, is formed after methylation and deglycosylation of geniposidic acid (Inouye et al., 1969).

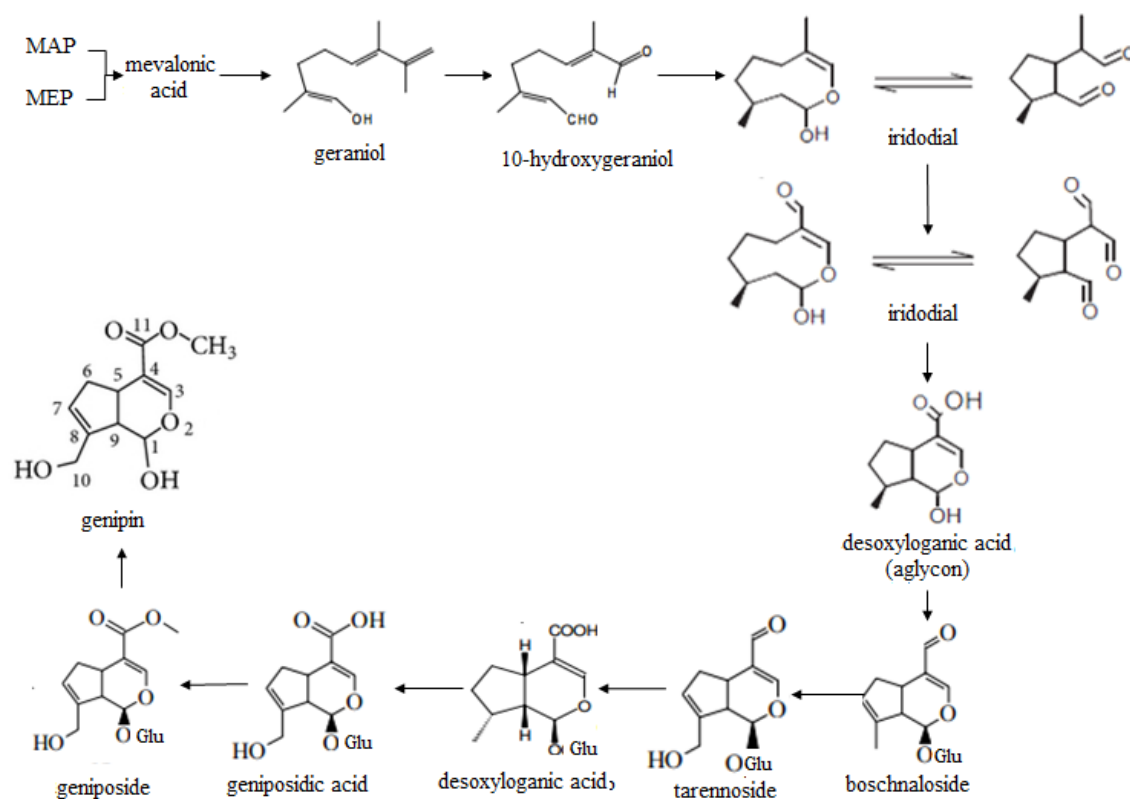


Figure 1. Reactional intermediates of iridoid biosynthesis from geraniol. Adapted from von Poser (1997), Dewick (1997), and Sampaio-Santos & Kaplan (2001).

The cyclopentane-dihydropyran ring system that composes the basic structure of iridoids (Sampaio-Santos and Kaplan, 2001), as well as the chemical structures of genipin and geniposide, are shown in Figure 2. Geniposide has a molecule of glucose bonded to C⁻¹, whereas genipin is its aglycone. Therefore, genipin is more apolar than its precursor (Q. C. Chen et al., 2009).

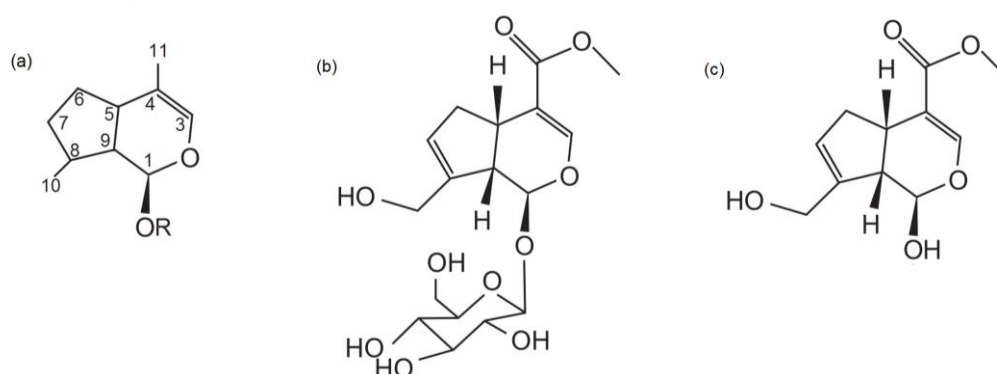


Figure 2. General structure of iridoids (a), geniposide (b), and genipin (c). Adapted from Sampaio-Santos & Kaplan (2001) and Wang et al. (2015).

3. Plant sources of genipin

Genipin can be extracted from different plant sources. It is present in both endocarp and mesocarp of genipap, and in the fruit of *Gardenia jasminoides*. It can also be found in the leaves and stems of *Tocoyena formosa* and *Randia spinosa*, as well as in the fruits of *Castilleja tenuiflora*, *Bellardia trixago* and *Eucommia ulmoides* (Ramos-de-la-Peña et al., 2014; Coelho et al., 2006; Hamerski et al., 2003; Carrillo-Ocampo et al., 2013; Venditti et al., 2013; Lee et al., 2014; Winotapun et al., 2013).

A list of these and other species, and the segment of the plant where genipin or geniposide have already been identified are presented in Table 1.

Table 1. Plant sources for extraction of genipin/geniposide.

Species	Family	Geographic distribution	Plant part	Reference
<i>Gardenia jasminoides</i> <i>Ellis</i>	Rubiaceae	Asia	Fruit and flowers	(Ramos-de-la-Peña et al., 2016)
<i>Genipa americana</i> L.	Rubiaceae	Central and South Americas	Endocarp and mesocarp of unripe fruit	(Bentes and Mercadante, 2014; Renhe et al., 2009)
<i>Tocoyena formosa</i>	Rubiaceae	Americas	Stem and leaves	(Coelho et al., 2006)
<i>Randia spinosa</i>	Rubiaceae	Asia	Stem	(Hamerski et al., 2003; Singh et al., 2010)
<i>Canthium multiflorum</i>	Rubiaceae	Burkina Faso (Africa)	Leaves, fowers and fruit	(Kouam et al., 2013; Traoré et al., 2008)
<i>Eucommia ulmoides</i>	Eucommiaceae	China	Bark	(Li et al. 2015)
<i>Castilleja tenuiflora</i>	Orobanchaceae	North America	Flowers	(Carrillo-Ocampo et al., 2013)
<i>Bellardia trixago</i>	Orobanchaceae	Mediterranean Region	Flowers	(Venditti et al., 2013)
<i>Apodytes dimidiata</i>	Icacinaceae	South Africa	Bark	(Drewes et al., 1996; Kayonga, 1996)

According to Parmar & Sharma (2000), geniposide can also be found in other species, such as *Gardenia augusta*, *G. lutea* and *G. sootenpesis*. In addition, several species of *Galium* L. are cited as containing geniposide acid in their composition, for instance, *G. palustre*, *G. odoratum*, *G. rivale*, *G. humifusum*, *G. schultesii*, *G. pseudoaristatum*, *G. octonarium*, *G. rhodopeum*, *G. aegeum*, *G. lovcense*, *G. album* ssp *album*, *G. album* spp *pychnotrichum*, *G. aparine* and *G. tricornutum* (Mitova et al., 2002).

US patent 20100196298 A1 (Andre et al., 2010) reports the possibility of pigment formation by extracts from seven species in the Rubiaceae family, due to the presence of numerous iridoids, including geniposide. In addition, dyeing of human keratin fibers

for cosmetic purposes using plant extracts from 87 different species is reported in the patent WO 2013045701 A2 (Hervé and Gwenaëlle, 2013).

Among all the aforementioned species, the fruits of *Gardenia jasminoides* and *Genipa Americana* are the most widely used for genipin extraction. *Gardenia* fruit can be found throughout subtropical to temperate East Asia, from Vietnam to the southern part of Japan (Ueda et al., 1991), as well as distributed in the southerly provinces of the Yangtze River in China (Wang et al., 2012).

In powder form, gardenia is widely used by the Chinese as a medicinal herb, since it presents antidiabetic, anti-inflammatory, antioxidant, antiphlogistic, antidiuretic, antihemostatic and anticancer properties, besides improving the quality of sleep (Xiao et al., 2017). Moreover, antidepressant activity has been observed through the use of oil from *Gardenia jasminoides* (Tao et al., 2014), where geniposide is highlighted as its active ingredient (Zhou et al., 2012).

3.1 *Genipa americana* Linnaeus

3.1.1 General features

Genipap tree belongs to Rubiaceae family, subfamily Ixorideae (Martins and Nunez, 2015). It can reach up to 12 m high, with stem diameter of about 60 cm, and a large canopy with many branches. Its petiolate flat leaves can be grey to greenish in color, varying from 20 cm to 42 cm long and 9 cm to 16 cm wide (Corrêa and Penna, 1984; Estrella and Botto, 1995). Yet the annual production of fruit is unknown, it is estimated that each well-developed tree can yield up to 140 kg of genipap (Gomes et al., 2010).

As for most tropical fruits, genipap's high perishability represents an obstacle to its commercialization (Alves, R. E.; Chitarra, A. B.; Chitarra, 1995). Therefore, a possible alternative to increase its shelf-life would be the industrialization into powder or dried fruit, similarly to *Gardenia jasminoides* products sold in Asia (de Figueiredo et al., 1986). Currently, in Brazil, genipap is mainly used for beverage production and preparation of jams (da Silva et al., 1998, 2009; Fernandes and Rodrigues, 2012).

3.1.2 Genipap's composition and stage of maturation

In Brazil, genipap fruit's ripening occurs from November to December (Rodrigues and Renhe, 2008). Each fruit weighs approximately 198 g, with 11.5 and

67.5 g corresponding to peel and seeds, respectively (de Figueiredo et al., 1986). Genipap's composition, including iridoid and phenolic compound content, varies according to its maturation stage (Bentes and Mercadante, 2014; de Figueiredo et al., 1986). While unripe, genipap's skin is green, becoming yellow-orange with ripening. With respect to the pulp, blue spots appear amidst its initially light color, then becoming yellowish when "at once" (the stage of maturation corresponding to the beginning of yellowing of the peel) or ripe (Rodrigues and Renhe, 2008).

The fruits of Rubiaceae family, as a whole, are characterized by high levels of iridoids. These compounds are part of the secondary metabolism of plants and act as defenders during interactions with herbivorous animals. According to Bentes & Mercadante (2014), the unripe genipap has 90% more iridoids than the fruit in its mature stage. Hence, most of genipin extraction methodologies from genipap apply the fruit while still green.

Genipin was the first iridoid isolated from genipap fruit, what was achieved by Djerassi et al. in 1960. Later, in 1972, Guarnaccia and colleagues extracted geniposidic acid from leaves and fruit, and nineteen years later, in 1991, Ueda and colleagues isolated several iridoids, including a glycosylated one called geniposide.

4. Extraction methods of genipin

Genipin is naturally found in some plants, although high concentrations can be achieved when direct hydrolysis of geniposide, its precursor, is employed. It is important to note that protocols using previously purified geniposide as a source of genipin are not covered in this review, since their genipin yield would be extrapolated in comparison with extractions starting directly from fruits.

The study of crude extracts obtained from whole plants or their parts, such as stems, leaves, flowers and fruits, has major importance either for the discovery of new compounds or obtention of higher yields of known bioactive compounds.

As for genipin, it can be obtained by different techniques, which can be used alone, combined (conjugated) or sequenced. Three main methods are currently known: enzymatic hydrolysis, solvents and ultrasound. The relation of the best extraction methodologies (in relation to genipin concentration) is presented in Table 2.

Table 2. Concentrations of genipin obtained from different extraction methodologies and plant sources.

Plant source	Type of extraction	Extraction conditions	Genipin concentration	References
<i>Gardenia jasminoides</i>	Enzymatic action	Fermentation with <i>Penicillium nigricans</i> (which contains β -glucosidase); ~96 h, 30 °C, 180 rpm; 70 g.L ⁻¹ gardenia powder.	about more than 21.43 mg.g ⁻¹ (98 % of purity)	(Xu et al., 2008)
	Enzymatic action	Fermentation (<i>Trichoderma harzianum</i> CGMCC 2979, 48 h, 30 °C, pH 6.1, 150 rpm).	3.6 mg.g ⁻¹ (98 % of purity)	(Dong et al., 2014)
	Solvent (TPAS); Enzymatic action	Ethyl acetate and buffer (TPAS) and application of cellulases (<i>Aspergillus niger</i> , Sigma®); 50 °C, pH 4 for 24 h.	58.83 mg.g ⁻¹ (85 % of purity)	(Winotapun et al., 2013)
	Solvent	Neutral pH buffer for 5 min.	21.1 mg.g ⁻¹ (purity not mentioned)	(Wang et al., 2011)
<i>Genipa americana</i>	Ultrasound; Enzymatic action	Ultrasound (285 W, 24 kHz, 10 °C for 15 min); application of pectinesterases (Novoshape®, commercial enzyme from <i>Aspergillus aculeatus</i> , at 10 °C for 1 h).	7.85 mg.g ⁻¹ (purity not mentioned)	(Ramos-De-La-Peña et al., 2014)
	High pressure; Enzymatic action	Application of pectinases (Pectinex Ultra SP-L®, commercial enzyme of <i>Aspergillus aculeatus</i>) combined with high hydrostatic pressure (130 MPa, at 9 °C for 15 min).	34 mg.g ⁻¹ (treatment without enzymes; purity not mentioned)	(Ramos-de-la-Peña et al., 2015)
	Solvent	Ether and hexane.	10 mg.g ⁻¹ (purity not mentioned)	(Djerassi et al., 1960)
	Solvent	Maceration with chloroform; distillation (rotary evaporator); acetone (to precipitate genipin); Hexane; refrigeration for 41 days.	0.9 mg.g ⁻¹ (purity not mentioned)	(Velásquez et al., 2014)
	Solvent	Methanol 80 % (v/v, in water) at 22 °C for 5 min (vortex).	3.4 mg.g ⁻¹ (purity not mentioned)	(Bentes and Mercadante, 2014)
<i>Eucommia ulmoides</i>	Irradiation; Enzymatic action; Solvent; Ultrasound	Irradiation of the aqueous extract (500 W for 10 min); application of cellulases from Imperial Jade Bio-Technology Co. (40 °C, pH = 0.39 for 24 h); Ethanol; Ultrasound (250 W for 30 min).	1.71 μ mol.g ⁻¹ of bark = 0.39 mg.g ⁻¹ of bark (purity not mentioned)	(Li et al., 2015)
<i>Apodytes dimidiata</i>	Solvent	Application of dichloromethane on 2.5 kg of bark	140 mg = 0.056 mg.g ⁻¹ of bark (purity not mentioned)	(Drewes et al., 1996; Kayonga, 1996)

4.1 Extraction through enzymatic action

Genipin extraction by enzymatic hydrolysis is basically done by the action of β -glycosidases, especially when the geniposide is used as source (Endo and Taguchi, 1973). However, β -glycosidase enzyme has a relatively high cost, being usual the employment of commercial fungal cellulases, which contain β -glycosidase enzyme in their enzymatic complex (Winotapun et al., 2013). Thus, as geniposide and genipin molecules only differ in C1, where the former has a glucose unit and the latter does not, genipin is formed after the cleavage and release of the glycosidic portion of geniposide (Ramos-de-la-Peña et al., 2016).

Some studies have shown lower conversion results of genipin using enzymes with other catalytic activities similar to β -glycosidases, such as β -dextranases ($1.18 \mu\text{mol.g}^{-1}$) and xylanases ($1.22 \mu\text{mol.g}^{-1}$) (Li et al., 2015). On the other hand, when other enzymes (such as β -glucanases, α -glycosidases or amylomaltases) are used without any additional treatment, they do not bring any significant benefit to genipin extraction (Cho et al., 2006).

It is important to emphasize that enzymes may be unstable when combined with harsh methodologies, with regard to the study of Ramos-de-la-Peña et al. (2015), who reported that the use of pectinases, in this case, the commercial enzyme Pectinex Ultra SP-L® (Novozymes), combined with high pressures (130 MPa) may favor inactivation of the enzyme catalytic activity. Therefore, the combination of different techniques with the enzymatic action should be studied on a case-by-case basis.

To date, the highest concentration of genipin obtained using enzymatic action was achieved by Winotapun et al. (2013), totalizing 58.83 mg.g^{-1} (85% of purity). The source for extraction was *Gardenia jasminoides*, submitted to a combined treatment of enzymes and solvents. Cellulases were used at 1% (m/v) concentration, in a two-phase medium containing ethyl acetate and aqueous solution (1:1, v/v) for 24 hours at 50 °C and pH 4. According to researchers, the use of cellulases helps in genipin extraction due to the simultaneous action of disruption of plant cells and release of the sugar molecules present in the geniposide.

On the other hand, the highest concentration of genipin extracted from *Genipa americana* (genipap) employing enzymes was 7.85 mg.g^{-1} , result obtained by Ramos-de-la-Peña et al. (2014). The treatment was conducted by ultrasonic action at 10 °C for

15 min, followed by enzymatic action using fungal pectin methylesterases. According to the researchers, both the low temperature of ultrasound process and the enzymatic treatment avoided the typical cross-linking of genipin with proteins.

Pectin methylesterase is capable of hydrolyzing methyl ester bonds of pectin, releasing methanol and pectic acid. Then, if a bivalent cation salt, such as Ca^{2+} , is added, there is crosslinking between the pectic acid polymers previously formed by the enzyme (Ni et al., 2005). Ramos-de-la-Peña et al. (2014) also report the formation of complexes after the addition of CaCl_2 , but in this case, between pectic polysaccharides and proteins. Thus, addition of pectin methylesterases may be a strategy to avoid the presence of free proteins in the reaction medium, consequently delaying crosslinking between genipin and proteins to reach high levels of genipin.

4.2 Extraction through solvents

Until 2011 most of the extractions of geniposide or genipin were carried out only with solvents (Djerassi et al., 1960; Wang et al., 2011; Zhou et al., 2005). At present, however, the use of solvents combined with other methods is the most commonly used (Dong et al., 2014; Wang et al., 2012; Winotapun et al., 2013; Yang et al., 2011; Zhu et al., 2014). Moreover, among the methods for genipin extraction, the most common is liquid-liquid two-phase aqueous system (TPAS) (Wan et al., 2014; Winotapun et al., 2013; Yang et al., 2011; Zhu et al., 2014).

TPAS is preferred because of the different polarities between genipin and geniposide. The geniposide, containing a molecule of glucose in its structure, is more polar than genipin (Zhou et al., 2005). Consequently, this ensures the greater amounts of genipin to be found in the more apolar solvent, whereas geniposide will stay in the more polar solvent.

Some works employed chloroform, however, when used in industrial processes, this organic solvent requires many later stages of purification, which, according to Ramos-de-la-Peña et al. (2014), render the obtention of the final product more difficult and expensive (Dong et al., 2014; Yang et al., 2011). Alternatively, other solvents are also capable of separating the geniposide/genipin effectively.

Furthermore, Zhu and collaborators (2014) tested TPAS formed by water plus four possible organic solvents: petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and n-butanol, in a 4:1 (v/v) ratio. Equal amounts of geniposide and genipin were added in these

systems to evaluate the solvents' ability to capture the compounds into their phases. The researchers found that the systems with petroleum ether or chloroform did not provide effective separation, since these solvents captured high levels of both genipin and geniposide. On the other hand, both n-butanol and ethyl acetate presented a similar content of genipin in its phases (of approximately 76%), yet ethyl acetate system presented higher content of geniposide in the aqueous phase than that using n-butanol (76.5% and 72.8%, respectively). As the permanence of the geniposide in the aqueous phase is crucial to guarantee a continuous enzymatic hydrolysis, the presence of ethyl acetate has proved to be of utmost importance for genipin isolation.

To date, the most efficient solvent for genipin extraction was presented by Winotapun et al. (2013), from *Gardenia jasminoides*, in a TPAS formed by buffer and ethyl acetate, which is also highlighted in item 4.1 ("Extraction through Enzymatic Action"). Meanwhile, the highest concentration of genipin extracted from gardenia, only using solvents, was 21.1 mg.g⁻¹, carried out in neutral pH buffer (Wang et al., 2011). From genipap, the best result was 10 mg.g⁻¹ of genipin, obtained by Djerassi et al. (1960), using ether and hexane.

4.3 Extraction through ultrasound

Some techniques for genipin extraction employ ultrasound (Ramos-de-la-Peña et al. 2014; Li et al. 2015; Ramos-de-la-Peña et al. 2015), which is based on the transformation of electrical energy into mechanical energy. Ultrasonic transducers cause mechanical vibrations at different frequencies, being able to propagate along the material in which they are in contact. The ultrasonic waves can cause cavitations in the internal part of the material, leading to cell rupture (Chemat et al., 2011). Thus, access to intracellular compounds is facilitated and advantages such as lower extraction time and higher extraction yield are observed (Melecchi et al., 2006).

The highest concentration of genipin achieved with employment of ultrasonic waves was performed by Ramos-De-La-Peña et al. (2014) from genipap, applying ultrasound in conditions of 285 W, 24 kHz, 10 °C for 15 min, followed by action of pectin methylesterases. Ultrasound has not yet been applied to obtain genipin starting directly from *Gardenia jasminoides* fruit.

5. Properties of genipin

With molecular formula C₁₁H₁₄O₅ and molar mass equal to 226.23 g.mol⁻¹, genipin has a melting point between 120 °C and 121 °C and absorption in the ultraviolet spectrum at approximately 240 nm (Carrillo-Ocampo et al., 2013; Djerassi et al., 1960). It is stable between pHs 4 to 9, and easily solubilizes in solvents, mainly in ethanol, diethyl ether and propylene glycol. Even though more hydrophobic than geniposide, it also has the capacity to solubilize in aqueous media, up to approximately 2 mg.mL⁻¹ (da Silva et al., 1998; Liu et al., 2006).

In addition, it is highly reactive towards primary amine groups and has two possible binding ends thereto, C-1 and C-2.

One possibility, through a nucleophilic attack on genipin's C-1, the amino group linkage to genipin's ester group occurs. Thus, an amide is formed and a methyl compound is released. In the second mechanism proposed, the reticulation reaction with the amino group starts with a nucleophilic attack on genipin's C-3, generating an opening on genipin's dihydropyran ring and the consequent formation of an aldehydic intermediate. This aldehyde intermediate group reacts with the newly formed secondary amine, generating a new heterocyclic compound (Butler et al., 2003; Kuo and Lin, 2006).

Due to its bi-bonding and coloration properties, genipin has a wide range of applications. Currently, a compound known to possess similar characteristics to those of genipin is glutaraldehyde. However, it presents some drawbacks, such as being 5 to 10 thousand times more cytotoxic and conferring less stability to crosslinked materials (using chitosan as biomaterial), when compared to genipin (M. C. Chen et al., 2009; Sung et al., 2001).

6. Applications of genipin

6.1 Natural crosslinker

Genipin is highly recognized for being a bifunctional agent (crosslinker) (Muzzarelli et al., 2015). Due to this ability, it may be a good tool for biochemical and medical industries, since it is able to covalently associate with different materials, such as chitosan, gelatin, collagen, casein, etc. (Chen and Yao, 2011; Lin et al., 2013; Muzzarelli, 2009; Silva et al., 2008; Song et al., 2009; Sundararaghavan et al., 2008). This addition of agents to different materials is called reticulation (and in some cases, activation), and is intended to increase the chemical and physical stability of the

material, as well as to add to the material the possibility of bifunctional reactions (Li and Bai, 2005; Mendes et al., 2011a).

Thus, genipin can be used for different purposes, such as to immobilize enzymes (Klein et al., 2016), to encapsulate substances (Lin et al., 2013; Peng et al., 2014), to stabilize oil-water emulsions (Karnchanajindanun et al., 2011), to confer hydrothermal stability to leather (Taylor et al., 2009), for gradual release of drugs in specific regions (M. C. Chen et al., 2009; Orive et al., 2014), tissue regeneration using human stem cells (Muzzarelli et al., 2016), as bioadhesive (Sung et al., 1999), in the treatment of cutaneous wounds (Rahimnejad et al., 2017) and as a possible substitute for metal stents (M. C. Chen et al., 2009). Studies also indicate that genipin reduces the degradation velocity in chitosan implants when compared with the same material crosslinked with glutaraldehyde (Bi et al., 2011).

6.1.1 Enzyme immobilization agent

Immobilization is intended to confine or maintain enzymes in a defined region (Silman and Katchalski, 1966). Therefore, immobilization must maintain the catalytic activity of the enzymes so that they can be reused continuously (Silman & Katchalski 1966, quoted by Katchalski-Katzir 1993). Enzyme immobilization with insoluble substrates is the most applied in the food industries (Guisan, 2006), while the most used supports are Eupergit C, alumina, silica, chitosan and cellulose.

Chitosan, gelatin and polyethylene glycol have important amino groups for immobilization through covalent bonds (Canilha, 2006). In the specific case of chitosan, the addition of small amounts of genipin can significantly increase the elasticity of the product, as well as its resistance in acidic medium (Peng et al., 2014). The increase in stability is due to the strong bonds formed between the materials. During genipin crosslinking of with chitosan, the support's amino group attacks genipin's carbonyl group, forming a stable amide bond. Lastly, the oxygen in the cyclic structure of genipin is replaced by a chitosan's nitrogen, generating the reticulated product (Mendes et al., 2011b).

Klein and collaborators (2016) have shown that it is possible to employ chitosan cross-linked with genipin to immobilize β -galactosidases. In the study, immobilization using genipin provided biocatalysis with satisfactory activity retention and thermal stability, being comparable to immobilization using glutaraldehyde. Furthermore, the

immobilized enzyme maintained 100% of its initial activity after 25 batches of lactose hydrolysis.

6.1.2 Colorant

Yet colorless or yellowish when isolated, genipin reacts with amino groups of proteins or amino acids, giving a coloration between violet and dark blue, thus becoming a possible source for production of a blue pigment (Ono et al., 2007; Touyama et al., 1994). This colorant has potential application either for textile dyeing or the food industry (Damasceno and Francisco, 2010). In fact, it is already used in Asia as a food coloring (Akao et al., 1995), although this use is not currently recognized by the Food and Drug Administration (FDA).

In 2014, the use of “Gardenia yellow” (an extract of *Gardenia jasminoides* Ellis with high content of crocetin and crocin), and consequently of genipin, was evaluated by the Codex Alimentarius Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) for the first time. The experts concluded that because the obtained product has not yet been subjected to a representative and internationally recognized long-term toxicological or carcinogenic test, the use of the gardenia extract could not yet be approved. According to them, some specifications still should be established prior to the approval. These include the need for information on its manufacturing process (including purification steps, drying losses assessment, analysis methods), analytical data on the substance composition (including the total amount of coloring matter), on the relevant compounds with known biological activity (such as geniposide and genipin), and from at least five different batches of commercial materials that support those specifications, as well as the stability of the components in food.

Later, in March 2015, Colombia wrote a request to JECFA to produce “Jagua (*Genipa americana*) extract”, which is intended to be manufactured by a local company for the use in the food industry as a blue colorant. According to the applicant, the inclusion of the extract is pertinent, since it has already been authorized by Colombian health authorities (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, INVIMA) since March 2014, after evaluation by the Specialized Committee in Food and Beverages of the country. The company suggests applying 100 mg to 300 mg extract to a kilogram of product.

The first use of genipin as a colorant dates back to the 16th century, by Brazilian natives (Marcondes, 2005), which was firstly reported by Hans Staden, a German who was held captive by Tupinambá Indian tribe in São Paulo region. In the narrative, he describes a tree called “jenipapo ivá”, in which a fruit similar to the apple grows. According to him, the natives chewed this fruit, squeezed it and collected its juice. When rubbing the extract on the skin, at first it “looked like water”, but after some time, the skin became as black as if it were paint. He further tells that the coloring lasted until the ninth day, even being washed many times in this period (Staden, 1557). Nowadays, some Brazilian tribes still paint their bodies using this technique.

Bentes and collaborators (2015) studied genipap pigment formation by exposing the fruits to the air for two hours. They verified that the amino acids present in the fruit did not participate in the formation of the pigment, since their amounts in the samples did not show significant differences before and after fruit oxidation. According to Paik et al. (2001), the pigment has peculiar characteristics: it exhibits high stability to heat, light and pH changes, being much more stable than phycocyanin, a blue pigment extracted from blue-green algae belonging to Cyanobacteria, cyprinids and cryptophytes phyla (Eriksen, 2008; Fujikawa et al., 1987).

Many studies have focused in this coloring application: production of pigment for textile dyeing (Cho et al., 2006); water-soluble pigment made with egg protein (Yang et al., 2012); and blue colorants based on taurine (Koga et al., 1989) methylamine (Touyama et al., 1994) and glycine (Fujikawa et al., 1987), some of which are protected by patents. According to Renhe et al. (2009), the highest amount of pigment from genipap grinding is obtained at pH 4, using ethanolic solvents and water, at 75 °C and 55 °C, respectively.

The current non-existence of a natural blue pigment that is stable and allowed in foods is an aggravating factor for the food industry, that is, only synthetic blue colorants, such as bright blue (E133) and indigo blue (E132), are used in food products (Penalber et al., 1996; Renhe et al., 2009).

With regard to laboratory applications, due to its coloring property, genipin can also be used as an alternative and simple tool for spectrophotometric quantification of amino acids (Lee et al., 2003).

6.1.3 Biomedical materials

Several works report that crosslinking with genipin increases the stability of the sample materials. Therefore, studies in the biomedical area make use of genipin as an activating agent for this purpose. Results found by McGann et al. (2016) indicate that genipin, when used in cartilages, conferred greater flexibility and resistance to chemical degradation, also reducing collagen degradation rate due to less mechanical wear. When crosslinked with genipin, the material exhibited approximately 159 % higher stability than the control after 6 hours of treatment. In another study, led by Kirking et al. (2014), the crosslinking of genipin with the lamellar part of a bone structure resulted in 59% higher bone strength than the control. These works suggest that crosslinking with both collagen and bone lamella may be promising preventive treatments to delay the progression of degeneration, as occurs in joint trauma (osteoarthritis).

Another proven application in the biomedical area was performed by Sung et al. (2001), through an experiment that evaluated genipin and glutaraldehyde fixation to a sterile and lyophilized biological tissue. In this study, the crosslinking was evaluated through the concentrations of free amino groups in the system for up to 6 months. In this period, genipin showed to be a better agent, since the presence of free amino groups in the glutaraldehyde system reached approximately 6 moles of NH₂ per mole of collagen, whereas in the crosslinking of genipin only 3 moles were detected. Therefore, genipin has a capacity of attachment to amino groups about twice as high as glutaraldehyde. According to them, this variation occurs due to the structural differences conferred by the different activation agents at the time of crosslinking.

6.3 Natural Medicinal Agent

Iridoids, in general, have pharmacological activities and can be highlighted by their anti-inflammatory, analgesic, antibacterial, antifungal and antitumoral potentials, besides presenting possible sedative, tranquilizing, hepatoprotective and sleep-inducing activities (Nascimento, 2008). Thus, genipin, among other applications, is also recognized for presenting different medicinal effects (Yang et al., 2011).

Studies indicate that genipin can stimulate the activity of UCP-2 decoupling protein, present in the internal membrane of the mitochondria, which is directly involved in the negative regulation of insulin secretion. As the activity of UCP-2 is also involved in the development of various types of cancer, genipin can be used either as an

indirect agent against diabetes mellitus or in the treatment of some cancers (Zhang et al., 2006). In addition, genipin may increase the expression of a receptor responsible for the proliferation of peroxisomes, which are capable of inhibiting vascular cell molecules responsible for adhering lymphocytes, monocytes, eosinophils and basophils to the vascular endothelium, thus avoiding possible development of atherosclerosis (Alves and Ming, 2015; Hwa et al., 2011). By regulating the glycolysis and gluconeogenesis cycles and the Krebs cycle, it may aid in treatments against depression (Chen et al., 2015). It is also cited as having antithrombotic effects, providing protection against liver damage and having the ability to inhibit gastric lesions (Lee et al., 2009; Suzuki et al., 2001).

7. Conclusions and Future Perspectives

Genipin presents a wide range of applications: in food, chemical, textile and pharmaceutical industries. Due to this, its extraction has been increasingly explored, either by employment of different plant sources or different extraction techniques combined. Many species have iridoids in their composition, yet there is still a wide range of possibilities to be explored as promising sources of genipin. It is important to thoroughly evaluate extraction methods to ensure better release of its precursor and even better yields of separation, which facilitates its final purification. At the moment, extractions from *Genipa americana* and *Gardenia jasminoides*, using solvents and enzymes, have shown to be the most effective. Nevertheless, it is believed that studies on this topic can still be improved, so that in the future most of the highly cytotoxic substances used nowadays are substituted by genipin.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) from Brazilian government.

References

Akao, T., Kobashi, K., Aburada, M., 1995. Enzymic studies on the animal and intestinal bacterial metabolism of geniposide. *Biol. Pharm. Bull.* 17, 1573–1576. doi:10.1248/bpb.17.1573

Alves, R. E.; Chitarra, A. B.; Chitarra, M.I.F., 1995. Postharvest physiology of acerola (*Malpighia emarginata* DC) fruits: Maturation changes, respiratory activity and refrigerated storage at ambient and modified.

Alves, L., Ming, L., 2015. Chemistry and pharmacology of some plants mentioned in the letter of Pero Vaz de Caminha. *Ethnobiol. Conserv.* 3, 1–15. doi:10.15451/ec2015⁻¹-4.3⁻¹-15

Andre, P., Tranchant, J.-F., Garcia, M., 2010. Coloring Materials And Their Use In Compositions, In Particular Cosmetic Compositions. Draft Patent. US20100196298 A1, DE102009059296A1, WO2010076545A1.

Bentes, Á. de S., de Souza, H.A.L., Amaya-Farfan, J., Lopes, A.S., de Faria, L.J.G., 2015. Influence of the composition of unripe genipap (*Genipa americana* L.) fruit on the formation of blue pigment. *J. Food Sci. Technol.* 52, 3919–3924. doi:10.1007/s13197-014⁻¹651-9

Bentes, Á. de S., Mercadante, A.Z., 2014. Influence of the stage of ripeness on the composition of iridoids and phenolic compounds in genipap (*Genipa Americana* l.). *J. Agric. Food Chem.* 62, 10800–10808. doi:10.1021/jf503378k

Bi, L., Cao, Z., Hu, Y., Song, Y., Yu, L., Yang, B., Mu, J., Huang, Z., Han, Y., 2011. Effects of different cross-linking conditions on the properties of genipin-cross-linked chitosan/collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22, 51–62. doi:10.1007/s10856-010-4177-3

Bispo, V.M., 2009. Estudo do Efeito da Reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA. Universidade Federal de Minas Gerais Curso.

Butler, M.F., Ng, Y.F., Pudney, P.D. a, 2003. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 41, 3941–3953. doi:10.1002/pola.10960

Canilha, L., 2006. Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos 1 48–57.

Carrillo-Ocampo, D., Bazaldúa-Gómez, S., Bonilla-Barbosa, J.R., Aburto-Amar, R., Rodríguez-López, V., 2013. Anti-inflammatory activity of iridoids and verbascoside isolated from *Castilleja tenuiflora*. *Molecules* 18, 12109–12118. doi:10.3390/molecules181012109

Chemat, F., Zill-E-Huma, Khan, M.K., 2011. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction, in: *Ultrasonics Sonochemistry*. Elsevier B.V., pp. 813–835. doi:10.1016/j.ultsonch.2010.11.023

Chen, J. li, Shi, B. yun, Xiang, H., Hou, W. jing, Qin, X. mei, Tian, J. sheng, Du, G. hua, 2015. ¹H NMR-based metabolic profiling of liver in chronic unpredictable mild stress rats with genipin treatment. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 115, 150–158. doi:10.1016/j.jpba.2015.07.002

Chen, K.-Y., Yao, C.-H., 2011. Repair of bone defects with gelatin-based composites: A review. *BioMedicine* 1, 29–32.

Chen, M.C., Liu, C.T., Tsai, H.W., Lai, W.Y., Chang, Y., Sung, H.W., 2009. Mechanical properties, drug eluting characteristics and in vivo performance of a genipin-crosslinked chitosan polymeric stent. *Biomaterials* 30, 5560–5571. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.06.039

Chen, Q.C., Zhang, W.Y., Youn, U., Kim, H., Lee, I., Jung, H.-J., Na, M., Min, B.-S., Bae, K., 2009. Iridoid Glycosides From *Gardeniae Fructus* for Treatment of Ankle Sprain. *Phytochemistry* 70, 779–784.

Cho, Y.J., Kim, S.Y., Kim, J., Choe, E.K., Kim, S.I., Shin, H.J., 2006. One-step enzymatic synthesis of blue pigments from geniposide for fabric dyeing. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 11, 230–234. doi:10.1007/BF02932035

Corrêa, M.P., Penna, L. de A., 1984. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, 1st ed.

da Silva, A.P., de Lima, C.L.C., Vieites, R.L., 1998. Caracterização química e física do jenipapo (*Genipa americana* L.) armazenado. *Sci. Agric.* 55. doi:10.1590/S0103-90161998000100006

da Silva, A.V.C., Yagui, P., Almeida, C.S., Feitosa, R.B., 2009. Caracterização físico-química de jenipapo. *Comun. Técnico - Embrapa Tabuleiros Costeiros* 99, 1–4.

Damasceno, S., Francisco, A. De, 2010. Sustentabilidade do processo de tingimento do tecido de algodão orgânico. *XXX Encontro Nac. Eng. Produção*.

de Figueiredo, R.W., Maia, G.A., de Holanda, L.F.F., Monteiro, J.C.S., 1986. Características Físicas E Químicas Do Jenipapo. *Pesq. agropec. bras.* 21, 421–428.

Dewick, P.M., 1997. The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. *Nat. Prod. Rep.* 14, 111–144.

Djerassi, C., Gray, J.D., Kincl, F.A., 1960. Naturally occurring oxygen heterocyclics. IX. Isolation and characterization of genipin. *J. Org. Chem.* 25, 2174–2177.

Dong, Y., Liu, L., Bao, Y., Hao, A., Qin, Y., Wen, Z., Xiu, Z., 2014. Biotransformation of geniposide in *Gardenia jasminoides* to genipin by *Trichoderma harzianum* CGMCC 2979. *Cuihua Xuebao/Chinese J. Catal.* 35, 1534–1546. doi:10.1016/S1872-2067(14)60134-0

Endo, T., Taguchi, H., 1973. The Constituents of *Gardenia jasminoides*, geniposide and genipin-gentiobioside. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 21, 2684–2688. doi:10.1248/cpb.37.3229

Eriksen, N.T., 2008. Production of phycocyanin - A pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 1–14. doi:10.1007/s00253-008-1542-y

Estrella, E., Botto, M.P., 1995. Plantas medicinales amazonicas: realidad y perspectivas. Medicinal plants from the Amazon Region: reality and perspectives.

Fernandes, F.A., Rodrigues, S., 2012. Ultrasound as pre-Treatment for drying of genipap (*genipa americana* L.). *Int. J. Food Eng.* 8. doi:10.1515/1556-3758.2480

Fujikawa, S., Fukui, Y., Koga, K., Kumada, J. ichi, 1987. Brilliant skyblue pigment formation from gardenia fruits. *J. Ferment. Technol.* 65, 419–424. doi:10.1016/0385-6380(87)90138-5

Gomes, J.B.M., Leeuwen, J. Van, Ferreira, S.A.N., Falcão, N.P. de S., Ferreira, C.A.C., 2010. Nove Espécies Frutíferas da Várzea e Igapó para Aquicultura, Manejo da Pesca e Recuperação de Áreas Ciliares. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Guisan, J.M., 2006. Immobilization of enzymes and cells. *Food Microbiol.* doi:10.1385/0896033864

Hervé, D., Gwenaëlle, J., 2013. Dyeing process using a composition comprising a glycosyl iridoid compound and a nucleophile or an amino or thio polymer, composition and devices therefor. WO2013045701 A2.

Hwa, J.S., Mun, L., Kim, H.J., Seo, H.G., Lee, J.H., Kwak, J.H., Lee, D.U., Chang, K.C., 2011. Genipin selectively inhibits TNF- α -activated VCAM⁻¹ but not

ICAM¹ expression by upregulation of PPAR- γ in human endothelial cells. Korean J. Physiol. Pharmacol. 15, 157–162. doi:10.4196/kjpp.2011.15.3.157

Inouye, H., Ueda, S., Aoki, Y., Takeda, Y., 1969. Zur biosynthese der iridoidglucosides. Tetrahedron Lett. 10, 2351–2354.

Jensen, S.R., 1991. Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids, J.B. Harbo. ed, Clarendon Press, Oxford.

Karnchanajindanun, J., Srisa-Ard, M., Baimark, Y., 2011. Genipin-cross-linked chitosan microspheres prepared by a water-in-oil emulsion solvent diffusion method for protein delivery. Carbohydr. Polym. 85, 674–680. doi:10.1016/j.carbpol.2011.03.035

Katchalski-Katzir, E., 1993. Immobilized enzymes--learning from past successes and failures. Trends Biotechnol. 11, 471–8. doi:10.1016/0167-7799(93)90080-S

Kim, J., Kim, H.-Y., Lee, S.-M., 2013. Protective Effects of Geniposide and Genipin against Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury in Mice. Biomol. Ther. (Seoul). 21, 132–7. doi:10.4062/biomolther.2013.005

Kirking, B., Hedman, T., Criscione, J., 2014. Changes in the interfacial shear resistance of disc annulus fibrosus from genipin crosslinking. J Biomech. 47, 1–13. doi:10.1016/j.jbiomech.2013.10.019

Klein, M.P., Hackenhaar, C.R., Lorenzoni, A.S.G., Rodrigues, R.C., Costa, T.M.H., Ninow, J.L., Hertz, P.F., 2016. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and β -d-galactosidase immobilization. Carbohydr. Polym. 137, 184–190. doi:10.1016/j.carbpol.2015.10.069

Koga, K., Fujikawa, S., Fukui, Y., 1989. Natural blue dye composition and colorant using the same: prepared by reacting taurine and genipin. US4878921 A.

Kuo, Y.C., Lin, C.Y., 2006. Effect of genipin-crosslinked chitin-chitosan scaffolds with hydroxyapatite modifications on the cultivation of bovine knee chondrocytes Biotechnology and bioengineering 95, 132–144.

Lee, J.H., Lee, D.U., Jeong, C.S., 2009. *Gardenia jasminoides* Ellis ethanol extract and its constituents reduce the risks of gastritis and reverse gastric lesions in rats. Food Chem Toxicol. 47, 1127–1131.

Lee, S.-W., Lim, J.-M., Bhoo, S.-H., Paik, Y.-S., Hahn, T.-R., 2003. Colorimetric determination of amino acids using genipin from *Gardenia jasminoides*. *Anal. Chim. Acta* 480, 267–274. doi:10.1016/S0003-2670(03)00023-0

Li, L., Guo, Y., Zhao, L., Zu, Y., Gu, H., Yang, L., 2015. Enzymatic Hydrolysis and Simultaneous Extraction for Preparation of Genipin from Bark of *Eucommia ulmoides* after Ultrasound, Microwave Pretreatment. *Molecules* 20, 18717–18731. doi:10.3390/molecules201018717

Li, N., Bai, R., 2005. A Novel Amine-Shielded Surface Cross-Linking of Chitosan Hydrogel Beads for Enhanced Metal Adsorption Performance. *Ind. Eng. Chem. Res.* 47, 6692–6700. doi:10.1021/ie050145k

Lin, Y.H., Tsai, S.C., Lai, C.H., Lee, C.H., He, Z.S., Tseng, G.C., 2013. Genipin-cross-linked fucose-chitosan/heparin nanoparticles for the eradication of *Helicobacter pylori*. *Biomaterials* 34, 4466–4479. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.02.028

Liu, H., Gao, L., Liu, M., Li, Q., Jiang, Y., Zhang, S., 2006. Characterization and determination of genipin⁻¹-gentiobioside in gardenia fruit by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection following electrospray ionization mass spectrometry. *Microchem. J.* 84, 38–43. doi:10.1016/j.microc.2006.04.009

Liu, X., Lou, H., 2007. Synthesis of monoterpene alkaloid derivatives from the iridoid glucoside geniposide. *Nat. Prod. Res.* 21, 1157–1164.

Marcondes, S., 2005. Brasil, amor à primeira vista!: viagem ambiental no Brasil do século XVI ao XXI.

Martins, D., Nunez, C.V., 2015. Secondary Metabolites from Rubiaceae Species. *Molecules* 20, 13422–13495. doi:10.3390/molecules200713422

McGann, M.E., Bonitsky, C.M., Jackson, M.L., Ovaert, T.C., Trippel, S.B., Wagner, D.R., 2016. Genipin crosslinking of cartilage enhances resistance to biochemical degradation and mechanical wear. *J Orthop Res. (HHS Public Access)* 33, 1527–5418. doi:10.1002/jor.22939

Melecchi, M.I.S., Péres, V.F., Dariva, C., Zini, C.A., Abad, F.C., Martinez, M.M., Caramão, E.B., 2006. Optimization of the sonication extraction method of *Hibiscus tiliaceus* L. flowers. *Ultrason. Sonochem.* 13, 242–250. doi:10.1016/j.ultsonch.2005.02.003

Mendes, A.A., De Castro, H.F., Rodrigues, Dasciana de S.; Adriano, W.S., Tardioli, P.W., Mammarella, Enrique J.; Giordano, Roberto de C.; Giordano, R. de L.C., 2011a. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: Influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 1055–1066. doi:10.1007/s10295-010-0880-9

Mendes, A.A., de Oliveira, P.C., de Castro, H., Giordano, R. de L.C., 2011b. Aplicação de Quitosana como Suporte para a Imobilização de Enzimas de Interesse Industrial. *Quim. Nova* 34, 831–840.

Mitova, M.I., Anchev, M.E., Handjieva, N. V., Popov, S.S., 2002. Iridoid patterns in *Galium L.* and some phylogenetic considerations. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 57, 226–234.

Muzzarelli, R.A.A., El Mehtedi, M., Bottegoni, C., Gigante, A., 2016. Physical properties imparted by genipin to chitosan for tissue regeneration with human stem cells: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 93, 1366–1381. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.03.075

Muzzarelli, R. a a, 2009. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydr. Polym.* 77, 1–9. doi:10.1016/j.carbpol.2009.01.016

Muzzarelli, R., El Mehtedi, M., Bottegoni, C., Aquili, A., Gigante, A., 2015. Genipin-Crosslinked Chitosan Gels and Scaffolds for Tissue Engineering and Regeneration of Cartilage and Bone. *Mar. Drugs* 13, 7314–7338. doi:10.3390/md13127068

Nascimento, F.G., 2008. Avaliação qualitativa e quantitativa por CLAE de iridóides na *Allamanda schottii*. Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI).

Ni, L., Lin, D., Barrett, D.M., 2005. Pectin methylesterase catalyzed firming effects on low temperature blanched vegetables. *J. Food Eng.* 70, 546–556. doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.10.009

Ono, M., Ishimatsu, N., Masuoka, C., Yoshimitsu, H., Tsuchihashi, R., Okawa, M., Kinjo, J., Ikeda, T., Nohara, T., 2007. Three New Monoterpenoids from the Fruit of *Genipa americana*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 55, 632–634. doi:10.1248/cpb.55.632

Orive, G., Santos, E., Pedraz, J.L., Hernández, R.M., 2014. Application of cell encapsulation for controlled delivery of biological therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 67–68, 3–14. doi:10.1016/j.addr.2013.07.009

Paik, Y.S., Lee, C.M., Cho, M.H., Hahn, T.R., 2001. Physical stability of the blue pigments formed from geniposide of gardenia fruits: Effects of pH, temperature, and light. *J. Agric. Food Chem.* 49, 430–432. doi:10.1021/jf000978f

Parmar, V.S., Sharma, S.K., 2000. Novel Constituents of Gardenia Species - A Review. *J. Sci. Ind. Res.* 59, 893–903.

Penalber, T.J. de A., Sadala, M.A.C., Castro, M.S., Faria, L.J.G. de, 1996. Ensaios de extração e aplicação de corantes do fruto do jenipapeiro (*Genipa americana*). *Rev. Bras. Corantes Nat.* 2, 129–135.

Peng, C., Zhao, S.Q., Zhang, J., Huang, G.Y., Chen, L.Y., Zhao, F.Y., 2014. Chemical composition, antimicrobial property and microencapsulation of Mustard (*Sinapis alba*) seed essential oil by complex coacervation. *Food Chem.* 165, 560–568. doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.126

Queiroz, S.E.E., da Silva, E.A.A., Davide, A.C., José, A.C., Silva, A.T., Fraiz, A.C.R., Faria, J.M.R., Hilhorst, H.W.M., 2012. Mechanism and control of *Genipa americana* seed germination. *Physiol. Plant.* 144, 263–276. doi:10.1111/j.1399-3054.2011.01554.x

Rahimnejad, M., Derakhshanfar, S., Zhong, W., 2017. Biomaterials and tissue engineering for scar management in wound care. *Burn. Trauma* 5, 4. doi:10.1186/s41038-017-0069-9

Ramos-de-la-Peña, A.M., Montañez, J.C., Reyes-Vega, M. de la L., Hendrickx, M.E., Contreras-Esquivel, J.C., 2015. Recovery of genipin from genipap fruit by high pressure processing, *LWT - Food Science and Technology.* doi:10.1016/j.lwt.2015.04.038

Ramos-de-la-Peña, A.M., Renard, C.M.G.C., Montañez, J., Reyes-Vega, M. de la L., Contreras-Esquivel, J.C., 2016. A review through recovery, purification and identification of genipin. *Phytochem. Rev.* 15, 37–49. doi:10.1007/s11101-014-9383-z

Ramos-de-la-Peña, A.M., Renard, C.M.G.C., Wicker, L., Montañez, J.C., García-Cerda, L.A., Contreras-Esquivel, J.C., 2014. Environmental friendly cold-

mechanical/sonic enzymatic assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana*). *Ultrason. Sonochem.* 21, 43–9. doi:10.1016/j.ultsonch.2013.06.008

Ramos-De-La-Peña, A.M., Renard, C.M.G.C., Wicker, L., Montañez, J.C., García-Cerda, L.A., Contreras-Esquível, J.C., 2014. Environmental friendly cold-mechanical/sonic enzymatic assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana*). *Ultrason. Sonochem.* 21, 43–49. doi:10.1016/j.ultsonch.2013.06.008

Renhe, I.R.T., Stringheta, P.C., Silva, F.F., de Oliveira, T.V., 2009. Obtenção de corante natural azul extraído de frutos de jenipapo. *Pesqui. Agropecu. Bras.* doi:10.1590/S0100-204X2009000600015

Rodrigues, I., Renhe, T., 2008. Extração e Estabilidade do Corante Azul de Jenipapo (*Genipa americana* L.). Universidade Federal de Viçosa (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos).

Sampaio-Santos, M.I., Kaplan, M.A.C., 2001. Biosynthesis Significance of Iridoids in Chemosystematics. *J. Braz. Chem. Soc.* 12, 144–153. doi:10.1590/S0103-50532001000200004

Silman, I., Katchalski, E., 1966. . *Atom Roy Bzochem* 35, 773–908.

Silva, S.S., Motta, A., Rodrigues, M.T., Pinheiro, A.F.M., Gomes, M.E., Mano, J.F., Reis, R.L., Migliaresi, C., 2008. Novel genipin-cross-linked chitosan/silk fibroin sponges for cartilage engineering strategies. *Biomacromolecules* 9, 2764–2774.

Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R., 2004. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*.

Song, F., Zhang, L.M., Yang, C., Yan, L., 2009. Genipin-crosslinked casein hydrogels for controlled drug delivery. *Int. J. Pharm.* 373, 41–47. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.02.005

Staden, H., 1557. *Hans Staden: The True Story of His Captivity 1557*.

Sundararaghavan, H.G., Monteiro, G.A., Lapin, N.A., Chabal, Y.J., Miksan, J.R., Shreiber, D.I., 2008. Genipin-induced changes in collagen gels: Correlation of mechanical properties to fluorescence. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* 87, 308–320. doi:10.1002/jbm.a.31715

Sung, H.W., Huang, D.M., Chang, W.H., Huang, L. I, Tsai, C.C., Liang, I.L., 1999. Gelatin-derived bioadhesives for closing skin wounds: an in vivo study. *J Biomater Sci Polym Ed.* 10, 751–771.

Sung, H.W., Liang, I.L., Chen, C.N., Huang, R.N., Liang, H.F., 2001. Stability of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin). *J. Biomed. Mater. Res.* 55, 538–546. doi:10.1002/1097-4636(20010615)55:4<538::AID-JBM1047>3.0.CO;2-2

Suzuki, Y., Kondo, K., Ikeda, Y., Umemura, K., 2001. Antithrombotic effect of geniposide and genipin in the mouse thrombosis model. *Planta Med.* 67, 807–810. doi:10.1055/s-2001-18842

Tao, W., Zhang, H., Xue, W., Ren, L., Xia, B., Zhou, X., Wu, H., Duan, J., Chen, G., 2014. Optimization of supercritical fluid extraction of oil from the fruit of *Gardenia jasminoides* and its antidepressant activity. *Molecules* 19, 19350–19360. doi:10.3390/molecules191219350

Taylor, M.M., Bumanlag, L.P., Marmer, W.N., Brown, E.M., 2009. Potential Application for Genipin-Modified Gelatin in Leather Processing. *J. Am. Leather Chem. Assoc.* 104, 79–91.

Tian, J.-S., Cui, Y.-L., Hu, L.-M.H., Gao, S., Chi, W., Dong, T.-J., Liu, L.-P., 2010. Antidepressant-like effect of genipin in mice. *Neurosci. Lett.* 479, 236–239.

Touyama, R., Takeda, Y., Inoue, K., Kawamura, I., Yatsuzuka, M., Ikumoto, T., Shincu, T., Yokoi, T., Inouye, H., 1994. Studies on the blue pigments produced from genipin and methylamine. I. Structures of the brownish-red pigments, intermediates leading to the blue pigments. *Chem. Pharm. Bull.* 42, 668–673. doi:10.1248/cpb.37.3229

Ueda, S., Iwahashi, Y., Tokuda, H., 1991. Production of anti-tumor-promoting iridoid glucosides in *Genipa americana* and its cell cultures. *J. Nat. Prod.* 54, 1677–1680.

Uesato, S., Ueda, S., Kobayashi, K., Inouye, H., 1984. Biosynthetic pathway of iridoid glucosides in *Gardenia jasminoides* f. *grandiflora* cell suspension cultures after iridodial cation formation. *Tetrahedron Lett.* 25, 573–576.

von Poser, G.L., 1997. Iridóides carbocíclicos: importância taxonômica e biossíntese. UFRGS.

Wan, L., Yao, Z., Ni, F., Wei, M., Zhou, Z., Wang, H., Sun, Y., Zhong, Z., 2014. Biosynthesis of genipin from gardenoside catalyzed by β -glucosidase in two-phase medium. *CIESC J.* 65.

Wang, R., Peng, L., Zhao, J., Zhang, L., Guo, C., Zheng, W., Chen, H., 2015. Gardenamide a protects RGC-5 cells from H₂O₂-induced oxidative stress insults by activating PI3K/Akt/eNOS signaling pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 22350–22367. doi:10.3390/ijms160922350

Wang, S.C., Lee, S.C., Hung, C.H., Liao, H.J., Huang, C.M., Tsai, T.H., 2011. Using orthogonal arrays to obtain efficient and reproducible extraction conditions of geniposide and genipin in gardenia fruit with liquid chromatography-mass spectrometry determinations. *J. Food Drug Anal.* 19, 486–494.

Wang, X.S., Wu, Y.F., Dai, S.L., Chen, R., Shao, Y., 2012. Ultrasound-assisted extraction of geniposide from *Gardenia jasminoides*. *Ultrason. Sonochem.* 19, 1155–1159. doi:10.1016/j.ultsonch.2012.03.012

Winotapun, W., Opanasopit, P., Ngawhirunpat, T., Rojanarata, T., 2013. One-enzyme catalyzed simultaneous plant cell disruption and conversion of released glycoside to aglycone combined with in situ product separation as green one-pot production of genipin from gardenia fruit. *Enzyme Microb. Technol.* 53, 92–96. doi:10.1016/j.enzmictec.2013.05.001

Xiao, W., Li, S., Wang, S., Ho, C.-T., 2017. Chemistry and bioactivity of *Gardenia jasminoides*. *J. Food Drug Anal.* 25, 43–61. doi:10.1016/j.jfda.2016.11.005

Xu, W., Yu, J., Feng, W., Su, W., 2016. Selective Extraction of Gardenia Yellow and Geniposide from *Gardenia jasminoides* by Mechanochemistry. *Molecules* 21, 540. doi:10.3390/molecules21050540

Yang, D., Zhou, M., Wei, W., Zhu, H., Fan, X., 2012. Short Communication: Preparation of a genipin blue from egg protein and genipin. *Nat. Prod. Res.* 26, 765–769.

Yang, Y.S., Zhang, T., Yu, S.C., Ding, Y., Zhang, L.Y., Qiu, C., Jin, D., 2011. Transformation of geniposide into genipin by immobilized b-glucosidase in a two-phase aqueous-organic system. *Molecules* 16, 4295–4304. doi:10.3390/molecules16054295

Zhang, C.Y., Parton, L.E., Ye, C.P., Krauss, S., Shen, R., Lin, C.T., Porco, J.A., Lowell, B.B., 2006. Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced ?? cell dysfunction in isolated pancreatic islets. *Cell Metab.* 3, 417–427. doi:10.1016/j.cmet.2006.04.010

Zhou, M., Zhuo, J., Wei, W., Zhu, J., Ling, X., 2012. Simple and effective large-scale preparation of geniposide from fruit of *Gardenia jasminoides* Ellis using a liquid-liquid two-phase extraction. *Fitoterapia* 83, 1558–1561. doi:10.1016/j.fitote.2012.09.001

Zhou, T., Fan, G., Hong, Z., Chai, Y., Wu, Y., 2005. Large-scale isolation and purification of geniposide from the fruit of *Gardenia jasminoides* Ellis by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 1100, 76–80. doi:10.1016/j.chroma.2005.09.026

Zhu, Y., Zhao, B., Huang, X., Chen, B., Qian, H., 2014. A substrate fed-batch biphasic catalysis process for the production of natural crosslinking agent genipin with *Fusarium solani* ACCC 36223. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 814–819. doi:10.4014/jmb.1407.07045

CAPÍTULO 6: CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente dissertação de Mestrado teve como objetivo extrair a genipina a partir dos frutos da *Genipa americana* L. (jenipapo) empregando técnicas sustentáveis. Por meio de uma pesquisa bibliográfica, foi possível notar que a maior concentração de genipina já extraída, partindo-se diretamente de um fruto, foi obtida empregando ação enzimática e dois solventes, capazes de formar um sistema bifásico aquoso (SAB) (Winotapun et al. 2013). Essa extração até então, não tinha sido empregada para o jenipapo, mas sim em frutos da espécie *Gardenia jasminoides*. A partir de 32 jenipapos foi possível obter aproximadamente 2 kg do pó da fruta. Com a fonte vegetal em mãos, diversas extrações enzimáticas em SAB (tampão e acetato de etila) foram conduzidas com o intuito de cada vez mais aumentar a obtenção de genipina. Para isso, previamente, quatro enzimas comerciais foram avaliadas quanto às suas atividades enzimáticas.

A Celluclast se destacou por ser a enzima comercial mais “equilibrada”, pois apresentou atividades de celulase, pectinase e β -glicosidase intermediárias às Pectinex (que foram mais baixas) e à Lallzyme Beta (que foram mais altas). Foi possível observar que desde a primeira extração, utilizando concentrações de 5 % (v/v, m/v), as enzimas Celluclast e Lallzyme Beta foram as melhores para a extração de genipina. Assim, estas duas enzimas comerciais foram testadas em outras duas concentrações, na qual as duas foram avaliadas à 1 % e também à 10 % (v/v, m/v). A concentração inicial empregada, de 5 %, foi escolhida por ser a mais indicada pelos fornecedores das enzimas comerciais, enquanto que a de 1 % e a de 10 % foram avaliadas por serem empregadas por diferentes pesquisadores neste tipo de extração. Através da extração utilizando 1 % de Celluclast (v/v) foi possível obter 72 mg de genipina por grama de jenipapo, 18 % mais que a melhor extração presente na literatura ($\sim 59 \text{ mg.g}^{-1}$), que usou este mesmo percentual de enzima (porém com celulasas de *Aspergillus niger*) (Winotapun et al. 2013). Isso pode significar que o jenipapo na maturação verde possivelmente possui um maior teor de geniposídeo do que os frutos da gardênia.

O emprego da Celluclast e da Lallzyme Beta a 10 % (v/v e m/v) apresentou concentrações ainda maiores, 97 mg.g^{-1} e 83 mg.g^{-1} , respectivamente. Nestas condições, a Celluclast possibilitou a extração de, pelo menos, 14 mg.g^{-1} de genipina a mais que a

Lallzyme Beta. Procurando uma explicação para este fato, três hipóteses foram levantadas:

- Segundo estudo conduzido por Cho e colaboradores (2006), extrações empregando celulases oriundas do *Aspergillus niger* extraem menores teores de genipina do que quando utilizadas celulases de *Trichoderma viride*. Como, segundo os fornecedores, a Lallzyme Beta é produzida pelo *A. niger* e a preparação da Celluclast é obtida do *T. reesei* (mesmo gênero do *T. viride*), os resultados obtidos nas extrações indicam que as celulases da Lallzyme Beta possivelmente são menos atuantes do que as da Celluclast. Isso indica que as celulases possuem um papel importante na extração da genipina. O jenipapo possui 45 g de celulose em 100 g de fruto verde (Martina, 1931, citado por Figueiredo et al. 1986), um alto teor para parede celular vegetal (Habibi et al. 2009). Assim, o uso de celulases é de suma importância para hidrolisar todos esses polissacarídeos do fruto e liberar o geniposídeo para ser hidrolisado pelas β -glicosidases, formando a genipina;
- A β -glicosidase é altamente inibida por seu produto, a glicose (Gong et al. 2011). Além do fato da glicose estar presente naturalmente no fruto, 47 g.100g⁻¹ de jenipapo verde (Martina, 1931, citado por Figueiredo et al. 1986), ela ainda é liberada de mais duas formas, através da hidrólise da celulose e da hidrólise do geniposídeo para formação da genipina (Yang et al. 2011). Como a Lallzyme Beta possui altos teores de celulases em comparação com a Celluclast (11 vezes mais), é possível observar que a ação das suas β -glicosidases na extração é estabilizada, possivelmente pela inibição por seu produto, em menos tempo comparada à extração empregando Celluclast (120 min e 150 min, respectivamente), justificando os menores teores de genipina obtidos empregando a Lallzyme Beta;
- Por último, as pectina metil esterases (pertencentes ao grupo das pectinases) hidrolisam ligações éster metílicas da pectina, libertando metanol e ácido péctico. A formação do ácido péctico, por sua vez, evita indiretamente a reticulação típica da genipina com proteínas, já que na presença de cátions bivalentes (como Ca²⁺) são capazes de formar complexos do tipo resíduo péctico-Ca-proteína, capturando proteínas que poderiam reticular com a genipina (Ramos-de-la-Peña et al. 2014). Possivelmente os complexos são formados pelo próprio cálcio presente no jenipapo, liberado durante a extração, pois o fruto é rico neste macroelemento (46,3

mg.g⁻¹ do fruto verde) (Figueiredo et al. 1986). Isso explica a menor concentração de genipina obtida empregando a Lallzyme, já que a Celluclast possui 808 U de pectina metil esterases por mililitro (Macedo et al. 2014), enquanto que a Lallzyme não possui nenhuma atividade para esta enzima (Dal Magro, Dalagnol, et al. 2016).

Após estes experimentos, a Celluclast 10 % (v/v) foi escolhida e empregada em outras extrações de genipina avaliando diferentes pHs (3, 3,7, 5,5, 7,3 e 8) e temperaturas (30 °C, 36 °C, 50 °C, 64 °C e 70 °C) através de um planejamento experimental. Ambos os fatores, pH e temperatura apresentaram efeito negativo na extração de genipina, ou seja, quando ambos são aumentados, o efeito é negativo para a obtenção de genipina. Quanto a significância dos fatores na extração, ambos mostraram ser significativos ao nível de confiança de 5 %.

Com o intuito de melhor visualizar os rendimentos das extrações nos diferentes pHs e temperaturas, um gráfico foi plotado. Os resultados podem ser visualizados na Figura 19.

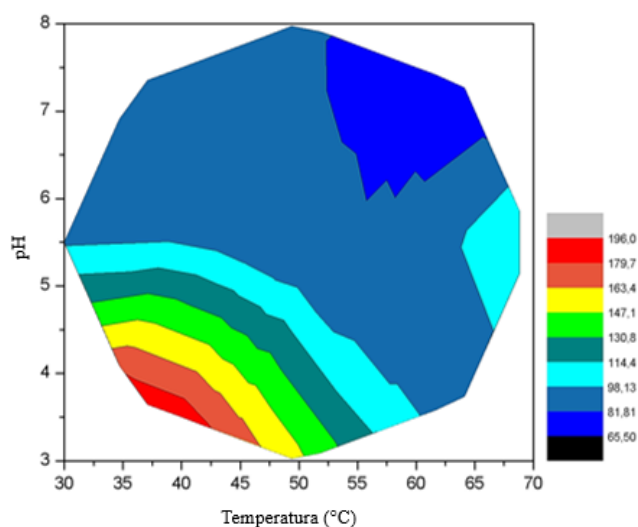


Figura 19. Influência do pH e da temperatura na extração de genipina empregando 10 % de Celluclast (v/v) por 150 min. Fonte: elaborado pela autora.

Foi notado que, com o aumento das variáveis, o teor de genipina extraído encontrado era menor. A maioria das enzimas são instáveis em pHs e temperaturas mais elevados. Enquanto que condições mais amenas mantêm mais facilmente a conformação das enzimas e conseqüentemente, suas atividades. Possivelmente, nas condições elevadas de pH e temperatura, as enzimas encontravam-se desestabilizadas e não tão atuantes para romper a parede celular vegetal, liberar o geniposídeo e hidrolisá-lo, explicando os baixos níveis de extração de genipina.

Além do mais, foi observado que em condições de temperatura e pHs mais elevados, após a extração e centrifugação do sistema, muitas amostras apresentaram colorações atípicas, que ainda não haviam sido visualizadas nas extrações anteriores (Figura S1, no artigo - Capítulo 4). Nas condições de pH 5,5/50 °C e de pH 3,7/64 °C foi observado o aparecimento de uma coloração mais acinzentada que a normal na fase aquosa (inferior), enquanto que nas condições de pH 8/50 °C, de pH 7,3/64 °C e de pH 5,5/70 °C foram visualizadas a formação da pigmentação azul. Pode-se constatar que a coloração atípica formada era acarretada por reações de *crosslinking* entre a genipina e proteínas, podendo estas serem as enzimas comerciais desnaturadas ou as próprias enzimas ou outras proteínas presentes no jenipapo - com exceção de seus aminoácidos, pois Bentes e colaboradores (2015) comprovaram, através da oxidação do fruto, que estes não participam na formação natural do pigmento azul.

Isso ocorreu também, porque o aumento de pH facilita a desprotonação dos grupos amino (-NH₂), aumentando a probabilidade de interação entre proteína-genipina na fase aquosa, impedindo sua transferência para a fase orgânica. O mesmo não foi visualizado a 36 °C e pH 3,7, uma vez que nessa condição a probabilidade de reação da genipina com a proteína é baixa, devido ao baixo pH, pois desta forma os grupos amino das proteínas encontram-se protonados (-NH₃). É importante ressaltar que o uso de aminoácido para detecção da genipina (Ramos-Ponce et al. 2010) vai depender do comportamento do mesmo em diferentes pHs. No geral, quando o pKa (constante de ionização que mede a tendência de um grupo liberar um próton) do aminoácido é menor que o pH em que está inserido, o mesmo encontra-se protonado, e quando o pKa é maior que o pH do meio, o mesmo encontra-se desprotonado, neste último caso as chances de *crosslinking* é maior. No laboratório, foi testada essa possibilidade de quantificação utilizando a glicina (pKa igual a 9,6), a metodologia pode ser encontrada no Apêndice C (Moura *et al.*, 2013).

Ainda com relação às extrações obtidas através do planejamento experimental, ao empregar a condição de 36 °C e pH 3,7, foi possível obter 196 mg.g⁻¹ com elevado grau de pureza (97 %), a partir disso, diversas bateladas foram conduzidas para extrair uma maior quantidade de genipina. Ao secar as amostras com nitrogênio gasoso foi possível notar que o material apresenta coloração amarela e consistência de resina, esperada, já que produtos comerciais passam por processos de cristalização e refinamento antes de serem comercializados. A genipina utilizada para realizar a curva de calibração, por

exemplo, possui 98 % de pureza e apresenta-se em forma de pó e é branca. Porém, é de elevado custo, aproximadamente 29 mil reais a grama, desta forma a técnica empregada mostrou-se ser uma ótima opção para reduzir o custo deste produto, até então de alto valor agregado.

Com o pó de genipina em mãos, estudos de sua estabilidade como agente de ativação foram conduzidos e comparados com o seu principal substituto, o glutaraldeído. Para isso, inicialmente solicitou-se a confecção de moldes de Teflon® para que fosse possível a coagulação da quitosana (biopolímero idealizado como suporte), a posterior ativação do gel de quitosana com os respectivos agentes de ativação e também que fosse de tamanho prático e compatível com os equipamentos utilizados para a comparação. Imagens do molde podem ser visualizadas abaixo (Figura 20).

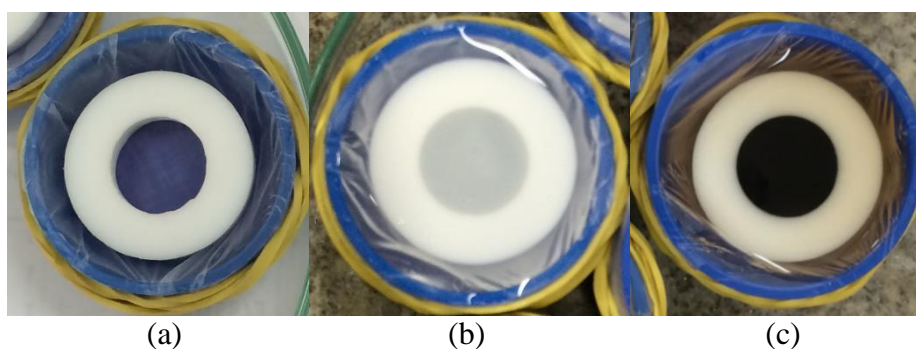


Figura 20. Molde de Teflon® dentro de uma tampa de tubo *Falcon* de 50 mL, envolvido com parafilme e preso por atilho (a); Molde contendo quitosana e submerso em solução coagulante (b); Molde após a retirada do coagulante e acréscimo da solução de genipina (c). Fonte: elaborado pela autora.

Nove moldes foram confeccionados pelo Departamento de Física (UFRGS), os quais apresentam exatos 13 mm de diâmetro interno e 4 mm de altura. Após a ativação dos géis de quitosana com genipina e glutaraldeído, as amostras foram destacadas dos moldes e submetidas à análise do perfil de textura (TPA, *Texture Profile Analysis*) e à análise reológica.

A TPA pode ser utilizada para avaliar as características texturais de diferentes materiais e complementar outros testes, como as análises sensoriais e outras medições instrumentais (Szczeniak 2002). Neste trabalho, os resultados obtidos na TPA complementaram uma análise reológica. Com os géis de quitosana produzidos, ambos foram submetidos aos testes texturais e reológicos. Na TPA, três características foram

avaliadas, dureza, coesividade e gomosidade, ambas obtidas após duas compressões (Figura 21).

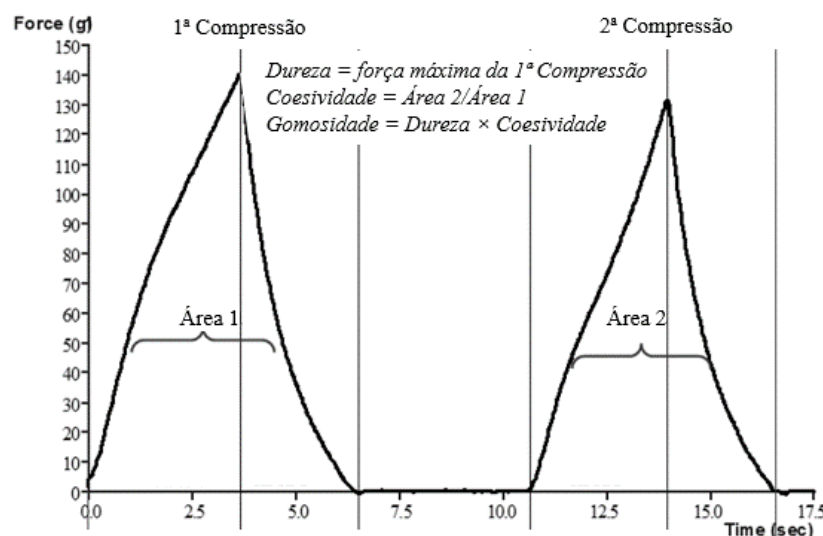


Figura 21. Curvas típicas da TPA e equações das características texturais avaliadas neste estudo. Fonte: adaptado de Pons & Fizman (1996).

Pela análise reológica, foi determinado o módulo de cisalhamento complexo (G^*), que representa a resistência total a deformação do material. As propriedades reológicas são classificadas em dois tipos: os não oscilatórios, no qual a viscosidade absoluta é uma relação entre a tensão e a taxa de deformação, e os oscilatórios, no qual a viscosidade do material é dependente tanto no módulo elástico (G') como do viscoso (G''), gerando assim a viscosidade complexa. O sistema empregado neste estudo foi o oscilatório, que gera os módulos da viscosidade complexa (G' e G''). Esse tipo de sistema impõe sobre a amostra, normalmente, ou uma varredura de tensão ou de deformação, neste caso, foi aplicada a de deformação, para avaliar a estrutura dos géis produzidos. A estimação de G^* na varredura de deformação mede o quão resistente à deformação é o material, em outras palavras, a máxima estabilidade a deformação, verificada através da constância do comportamento de G' em comparação com G'' . Este parâmetro é estimado utilizando a seguinte equação (Eq. 1):

$$G^* = \sqrt[2]{G'^2 + G''^2} \quad (\text{Eq. 1})$$

A máxima deformação obtida é considerada como aquela em que G^* varia entre somente 90 % e 100 % do resultado da primeira deformação; já que, geralmente, assumem-se ideais as deformações inferiores a 10 % (Machado 2012).

Os resultados de ambas as análises mostraram que a utilização de genipina 0,5 % (*m/v*) como agente de ativação propicia aos géis de quitosana uma propriedade textural superior e características reológicas (estabilidade à deformação) similares do que quando comparado com 3 % de glutaraldeído (*v/v*). Adicionalmente, as imobilizações das β -galactosidases modelos mostraram atividade de hidrólise pelo menos 10 vezes maior quando o suporte foi ativado com genipina 0,5 % (*m/v*) do que quando ativado com glutaraldeído 3 % (*v/v*). Esses resultados são devido a estrutura da genipina, que possivelmente por ser volumosa possibilita um melhor arranjo de *crosslinking* e uma melhor conformação do sítio ativo das enzimas do que glutaraldeído, já que este é constituído de uma cadeia pequena, linear e muito reativa (ver Figura 5 do Capítulo 4) (Giacomini et al. 1998).

Em relação às eficiências de imobilização (ou retenção de atividade) alcançadas, diversos fatores podem estar interligados à esses baixos índices. Os resultados obtidos foram de 8 % e 3 % no suporte ativado com genipina e 7 % e 46 % com glutaraldeído, para as β -galactosidases de *K. lactis* e *A. oryzae*, respetivamente. Segundo Klein e colaboradores (2012), os fatores mais comuns são o bloqueio do sítio ativo pelo próprio efeito de imobilização; a presença de muitas moléculas ao redor da enzima, reduzindo o acesso do substrato aos sítios ativos; a presença de proteínas na superfície do suporte, que podem sofrer alterações na sua conformação da enzima para uma conformação menos ativa; e a sobrecarga do suporte, quando altas concentrações de enzima foram disponibilizadas, podendo haver a consequente formação de uma multicamada de moléculas de enzimas na superfície das partículas.

Após a conclusão da extração, avaliação e aplicação da genipina, foi iniciado estudo para a construção de uma β -galactosidase recombinante visando a síntese de prebióticos. Neste caso, galacto-oligosacarídeos (GOS), que são prebióticos formados por galactose e glicose capazes de beneficiarem os probióticos. São considerados carboidratos não digeríveis que têm sido estudados e referenciados como benéficos para a manutenção de uma microbiota probiótica saudável. Os resultados obtidos nesta etapa de desenvolvimento da β -galactosidase recombinante foram abordados no Apêndice D.

Através dos resultados obtidos nesta Dissertação de Mestrado, sendo eles positivos ou negativos, pretendeu-se contribuir tanto com informações pertinentes à área de extração de genipina e de imobilização de enzimas, empregando a genipina como agente de ativação, quanto contribuir para futuros trabalhos envolvendo técnicas de

biologia molecular. Os aspectos mais relevantes em relação aos resultados encontrados estão sumarizados na *Conclusão*.

CONCLUSÃO

Como conclusão geral, pode-se afirmar que o presente trabalho atingiu todos os objetivos propostos. Grande parte do mesmo proporcionou resultados conclusivos, conhecimento e experiência na área de imobilização de enzimas. Os principais resultados atingidos estão relacionados abaixo:

- A presença de celulases é crucial para uma eficiente obtenção de genipina a partir do jenipapo;
- A ação enzimática juntamente com o sistema aquoso bifásico (SAB) mostraram-se ótimas ferramentas para extração e purificação da genipina;
- A enzima comercial Celluclast é capaz de extrair mais genipina do que as enzimas comerciais Lallzyme Beta, Pectinex Smash XXL e Pectinex Ultra Color;
- pHs e temperaturas elevados dificultam a extração de genipina;
- A condição de 36 °C e pH 3,7, utilizando Celluclast à 10 % (v/v), proporcionou a maior concentração de genipina extraída, aproximadamente 196 miligramas de genipina por grama de jenipapo com alto grau de pureza (97 %);
- Ainda que usada em menor concentração, a genipina confere aos géis de quitosana maior estabilidade ao material do que quando comparado com o glutaraldeído em concentrações mais elevadas;
- A hidrólise da lactose pelas β -galactosidases de *K. lactis* e *A. oryzae* imobilizadas em partículas de quitosana ativadas com genipina mostraram-se pelo menos 10 vezes superiores do que as com glutaraldeído.

DESDOBRAMENTOS

Como desdobramentos deste trabalho tem-se:

- A possibilidade de solicitação de patente do método de extração da genipina e sua utilização como agente de ativação e possível formadora de géis de quitosana estáveis (Capítulo 4);
- E, atualmente dois estudantes do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA/UFRGS) e um vinculado da empresa Quatro G Pesquisa e Desenvolvimento Ltda (TECNO PUC) utilizam a genipina extraída. Sendo um dos estudos para emprego da genipina em biofilmes e os outros dois aplicando-a como agente de ativação para imobilização de enzimas.

PERSPECTIVAS

Como perspectivas tem-se:

- Desenvolvimento da β -galactosidase recombinante de *Bacillus circulans*;
- Avaliação da enzima recombinante quanto a síntese de galacto-oligossacarídeos (GOS);
- Formulação de “novos” prebióticos a partir da lactulose (oligômeros de frutose e galactose).

APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO 4

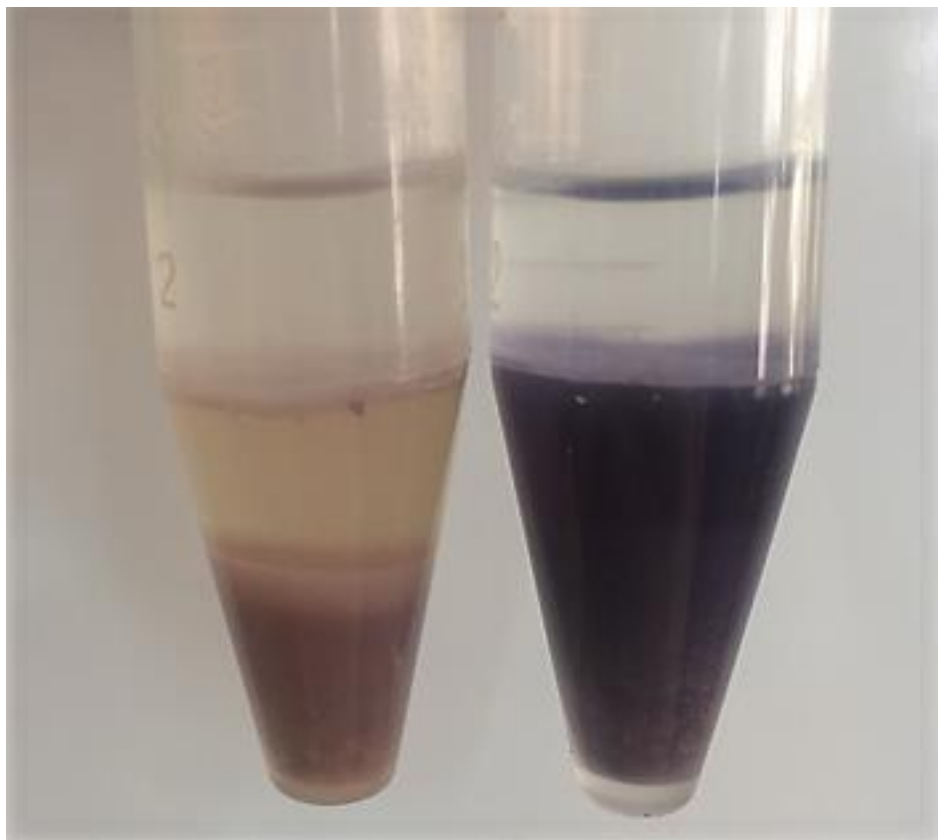


Figure A1. Extraction of genipin at 36 °C with pH 3.7 (tube on the left) and at 64 °C with pH 7.3 (tube on the right).

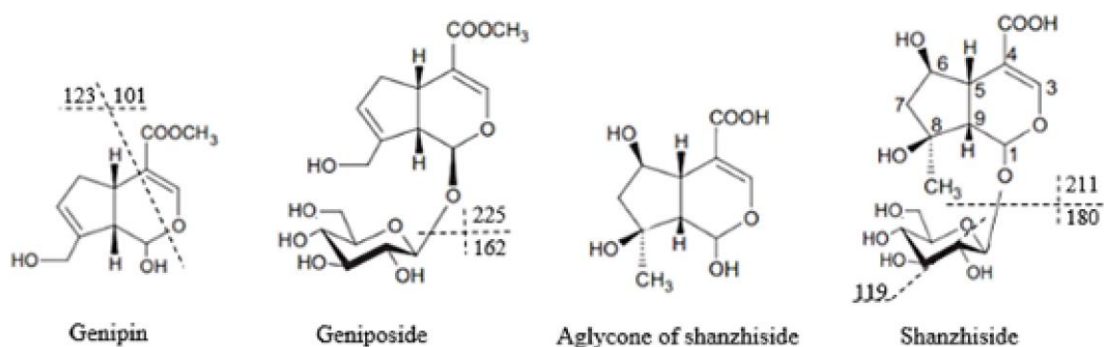


Figure A2. Fragmentation mechanism of the compounds identified in the organic phase from the enzyme-assisted extraction in TPAS and from the direct extraction.

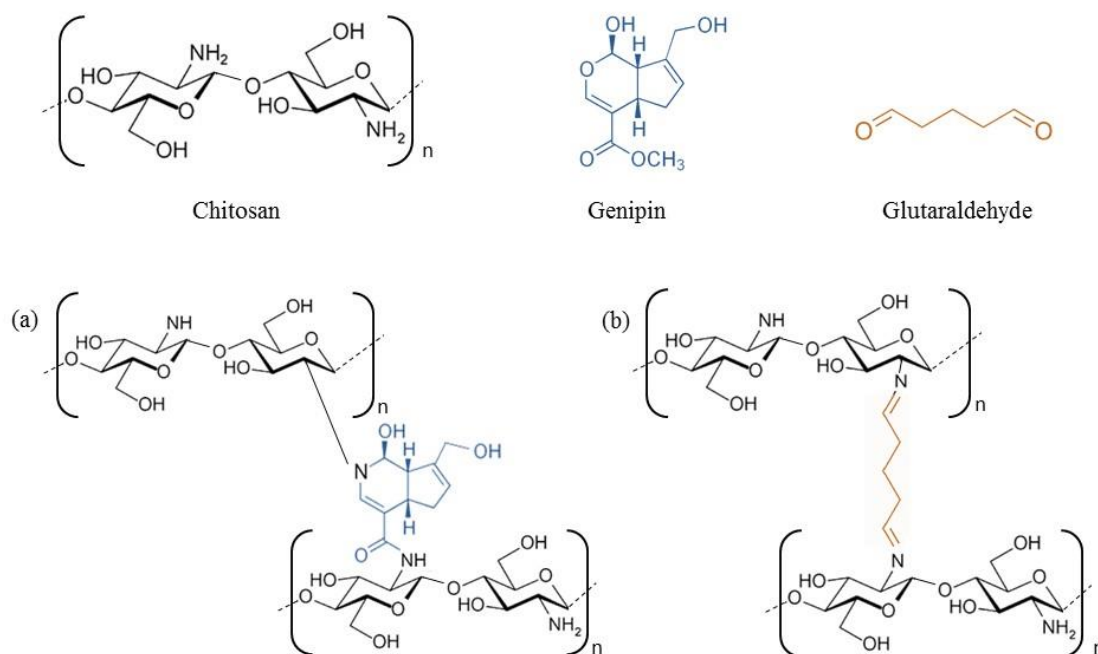


Figure A3. Schematic illustration of chitosan gels crosslinked with genipin (a) and with glutaraldehyde (b).

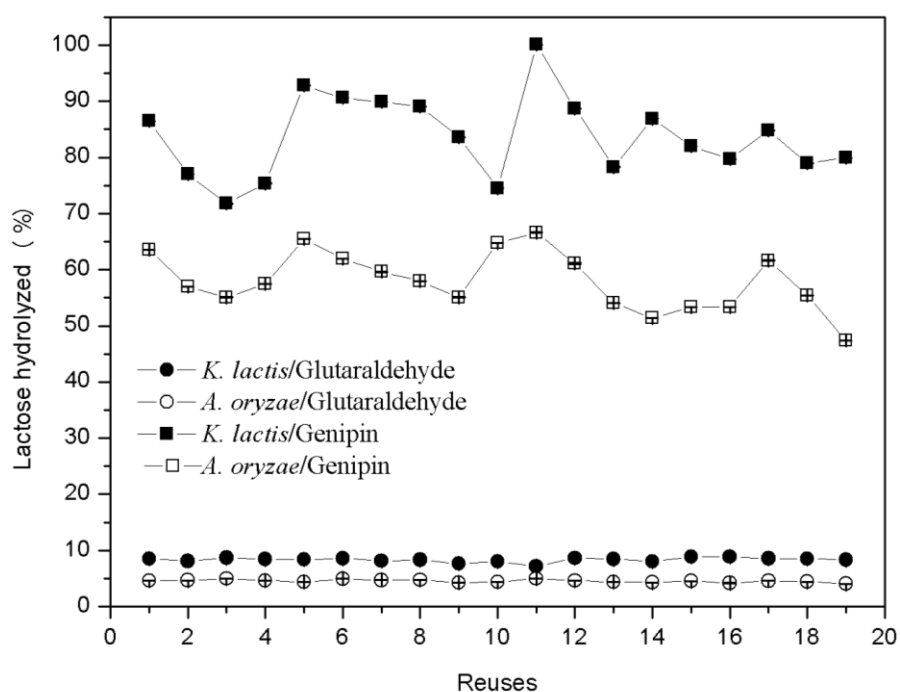


Figure A4. Repeated batch of lactose hydrolysis using lactose 5 % (w/v) at 40 °C during 90 min using β -galactosidases immobilized on chitosan activated with genipin or glutaraldehyde.

APÊNDICE B – METODOLOGIA DO ESTUDO DA CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE BGAD-D DE B-GALACTOSIDASE DE *BACILLUS CIRCULANS* VISANDO A SÍNTESE DE GOS

Os materiais e métodos aqui apresentados serão divididos em 2 partes: Materiais e métodos utilizados (a) e a serem utilizados (b).

a. Material e Métodos utilizados

1. Cultivo do *Bacillus circulans* e purificação do DNA

O *Bacillus circulans* utilizado neste trabalho foi obtido liofilizado da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) sob identificação INCQS 00427. O microrganismo liofilizado foi ressuscitado em 1 mL de solução salina 0,9 % e incubado por 18 h a 37 °C sob agitação (150 rpm) em frasco Erlenmeyer contendo meio de cultura composto por 5 g de peptona, 5 g de extrato de levedura, 0,2 g de sulfato de magnésio (MgSO₄), 1 g de fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄) e lactose 10 % (*m/v*), para 1 L de água destilada (*m/v*).

Subsequentemente, o *Bacillus circulans* foi incubado em outra formulação contendo 5 g de peptona, 3 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl, 30 g de glicose, 5 g de lactose para 1 L de água destilada (*m/v*), a 30 °C por 48 h a 180 rpm. 1 mL desse cultivo foi centrifugado a 3.000 × g por 15 min e a partir do pellet realizou-se a extração do DNA utilizando o kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega®). O DNA obtido foi mantido congelado para posterior uso. Algumas amostras foram mantidas congeladas em glicerol 20 % (*v/v*) para garantir a manutenção do estoque do microrganismo.

2. Desenho dos *primers* e amplificação do gene de interesse

Um par de oligonucleotídeos de DNA foi desenhado com base na sequência genômica de uma β-galactosidase de *Bacillus circulans* ATCC 31382 (*GenBank*: AB605256.1). Cada *primer* possui uma região com sítios de reconhecimento para enzimas de restrições específicas, determinadas com auxílio da ferramenta online

NEBcutter V2.0, que consistiram em *NdeI* para o *forward* e *Sall* para o *reverse* (Tabela 1).

Tabela B1. Sequência dos *primers* desenhados e seus sítios de restrições, no sentido 5'-3'.

<i>Primer</i>	Sequência de nucleotídeos e sítio de restrição
<i>Forward</i>	5' tataca [▼] tatgggaacagtgagctatgatgg 3' <i>NdeI</i>
<i>Reverse 2</i>	5' gcg [▼] tgcagctcatggtcttatggcgttac 3' <i>Sall</i>

Fonte: elaborado pela autora.

A análise da especificidade dos *primers* foi avaliada através do site *Primer3* e de um alinhamento no *ClustalW*, do site da *Simgene*, com o genoma para posterior síntese e utilização na reação em cadeia da polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). Para a PCR foram utilizados 1,5 µL do DNA genômico purificado, 37 µL de água ultrapura, 1 µL do *primer forward* (10 pmoles), 1 µL do *primer reverse* (10 pmoles), 1 µL de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP) numa concentração de 10 mM, 2,5 µL de DMSO, 5 µL do tampão da enzima (10x) e 2,5 U da enzima *Pfu DNA polimerase* (Agilent®). As condições da PCR estão descritas na Tabela 2.

Tabela B2. Condições da PCR.

Temperatura do ciclo	Tempo do ciclo	Número de ciclos
95 °C	2'	1
95 °C	30''	} 25
“x” °C ^a	30''	
72 °C	3'	
72 °C	10'	1

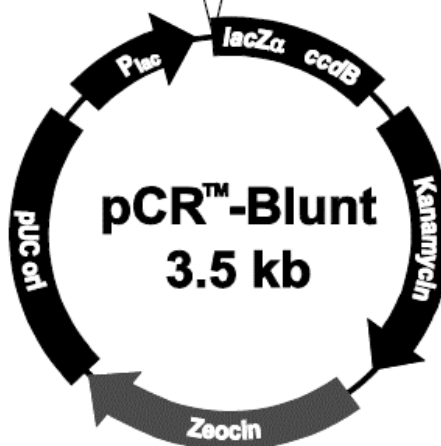
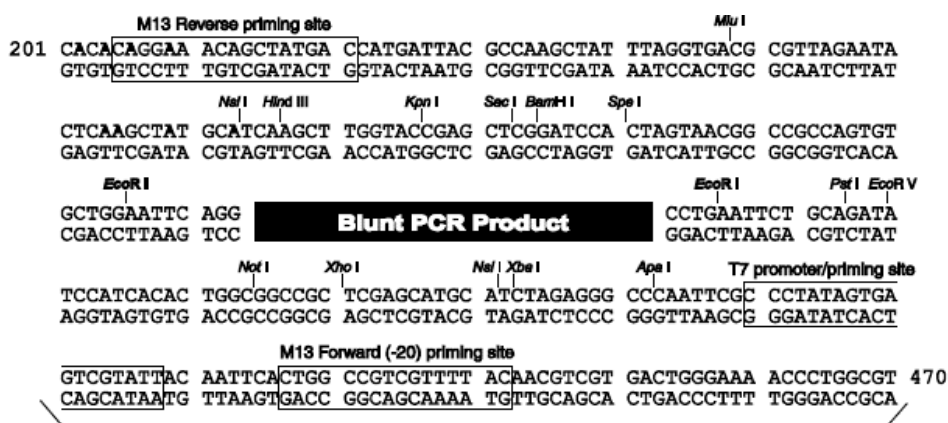
^aTemperaturas de reações testadas: 46 °C, 48 °C, 50 °C, 52 °C e 55 °C. Fonte: elaborado pela autora.

Na amplificação, com volume final de 50 µL, dos quais 10 µL foram estocados e 40 µL foram utilizados para a eletroforese em gel de agarose 1,2 % (*m/v*). Na amostra foram misturados 10 µL de bromofenol contendo cresol red que foram então aplicadas no gel submerso em tampão TAE 1x (40 mM de Tris-acetato pH 8,0; 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético, EDTA). Como padrão foi utilizado o marcador de DNA *Ladder 1 kB plus* para comparação das bandas apresentadas pelos fragmentos. A migração do DNA foi realizada pela aplicação de uma diferença de potencial de 80 V por 40 min. Posteriormente, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta (UV) e a banda correspondente à amplificação (2436 pb) foi recortada e purificada, utilizando o kit comercial *Wizard SV Gel and PCR clean-up system* (Promega®). A partir desse

material foi realizada uma reamplificação, uma nova corrida em gel de agarose e uma outra purificação para obter-se uma quantidade maior do gene de interesse.

3. Clonagem do gene BgaD-D

Com o protocolo de amplificação estabelecido, o gene de interesse foi ligado ao vetor de clonagem *pCR-Blunt* (Invitrogen®, Figura 1), específico para clonagem de produtos de PCR. Este vetor possui um gene letal que possibilita somente o crescimento de células transformadas contendo o plasmídeo com o gene de interesse. Para realizar a ligação do gene ao vetor foi utilizado o kit *Zero Blunt® pCR Cloning* (Invitrogen®).



Comments for pCR™-Blunt 3512 nucleotides

Lac promoter/operator region: bases 95-216
 M13 Reverse priming site: bases 205-221
LacZ-alpha ORF: bases 217-570
 T7 promoter priming site: bases 400-419
 M13 Forward (-20) priming site: bases 427-442
 Fusion joint: bases 571-579
ccdB lethal gene ORF: bases 580-882
 Kanamycin resistance ORF: bases 1231-2025
 Zeocin resistance ORF: bases 2231-2605
 pUC origin: bases 2673-3386

Figura B1. Mapa do *pCR-Blunt*®. Fonte: Invitrogen®.

Células de *Escherichia coli* (DH10B) eletrocompetentes foram transformadas com o vetor recombinante (pCR-Blunt::BgaD-D) por eletroporação. Para isso, em uma cubeta foram colocados 3 µL da ligação e 100 µL de DH10B, a qual, posteriormente, foi submetida a 2,45 kV, 200 Ω e 25 µF. 500 µL de meio SOC (caldo super ideal) foram acrescentados a amostra e as células transformadas foram cultivadas a 37 °C (*overnight*) em meio de cultura Luria-Bertani (LB) sólido contendo 30 mg.L⁻¹ de canamicina. Esse antibiótico impede que células não transformadas se multipliquem, visto que o pCR-Blunt contém um gene de resistência a canamicina (Sambrook & Russel 2001; Silva et al. 2003).

Todas as colônias bacterianas crescidas foram cultivadas separadamente a 37 °C (*overnight*, 180 rpm) em tubos *falcon* contendo 10 mL de meio Luria-Bertani (LB) com 50 mg.mL⁻¹ de canamicina. Após, as células recombinantes foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado, e o plasmídeo recombinante foi extraído utilizando o kit de purificação Qiaprep Spin Miniprep (QIAgen®). O vetor plasmidial contendo o gene BgaD-D foi digerido utilizando as enzimas de restrição, *NdeI* e *Sall*, seguindo o protocolo do fabricante (New England BiolABS®). A digestão foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1,2 % (*m/v*), a banda correspondente ao gene foi removida e purificada como anteriormente para que posteriormente este possa ser ligado ao vetor de expressão (Sambrook & Russel 2001).

b. Material e Métodos a serem utilizados

1. Subclonagem do gene BgaD-D

O gene será submetido a uma segunda ligação, no vetor de expressão *pET-30a(+)* (Novagen®) (Figura 2). A metodologia de ligação do gene ao vetor é a mesma descrita para vetor de clonagem. Para confirmação do inserto, o plasmídeo recombinante (*pET-30a(+):BgaD-D*) será purificado e submetido a uma digestão com as enzimas de restrição para posterior análise por eletroforese em gel de agarose. Assim que confirmado a presença do gene, uma alíquota será quantificada através do equipamento *Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer* e encaminhada para sequenciamento com o intuito de verificar a integridade do gene.

Com a confirmação da sequência gênica, serão realizados os testes de expressão da enzima recombinante. A *E. coli* é escolhida nesta etapa por ser uma hospedeira de fácil manipulação, rápido crescimento e que toleram diferentes produções de proteínas heterólogas. As células de uma determinada cepa de *E. coli* serão submetidas a eletroporação na presença do plasmídeo (pET-30a(+):*BgaD-D*). As células serão incubadas a 37 °C e 180 rpm em meio LB até apresentarem OD de 0,5, momento no qual a expressão será induzida com 1mM de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactosídeo). Como o plasmídeo contém o promotor T7 antes do gene, quando induzido por IPTG é capaz de expressar 30 % mais do gene de interesse em relação a massa total de proteínas bacterianas produzidas (Rosano & Ceccarelli 2014).

Serão efetuadas coletas de amostras do meio a cada 3 horas (até 24 h), as quais serão submetidas a avaliação da atividade de β -galactosidase (conforme descrito no item 2.7 do Capítulo 4). Após a obtenção das melhores condições de expressão, as células serão rompidas e centrifugadas. Ambas as frações solúveis e insolúveis da amostra serão analisadas por eletroforese vertical em SDS-PAGE e assim que verificada a presença da enzima, a banda correspondente será recortada e submetida a um protocolo de purificação para ser analisada por espectrometria de massa. Este procedimento confirmará a identidade da banda recortada, através da comparação dos peptídeos que formam esta proteína com a sequência da base de dados.

Assim que confirmada, células serão cultivadas em maior escala para iniciar o processo de purificação da enzima. As células serão rompidas, centrifugadas e a amostra contendo a enzima será submetida à cromatografia usando o sistema *Äkta Purifier* (GE Healthcare®), no qual serão testadas diversas matrizes de colunas (Amersham 2001). Após eluição, as amostras serão analisadas por SDS-PAGE, para que seja estabelecido o protocolo de purificação que garanta a obtenção da enzima na sua forma homogênea e ativa. A técnica de Bradford será empregada para determinação do teor de proteína (Bradford 1976) e testes de atividade enzimática e determinação das constantes cinéticas serão conduzidos.

APÊNDICE C – QUANTIFICAÇÃO DE GENIPINA UTILIZANDO GLICINA

No laboratório, foi testada a possibilidade de quantificação da genipina utilizando a glicina (pKa igual a 9,6) (Moura *et al.*, 2013). Assim, uma curva de calibração foi construída de 50 mg.L⁻¹ a 300 mg.L⁻¹ utilizando a genipina comercial (dissolvida em metanol 45 %, v/v; pH verificado: 6,9) (Figura 1).

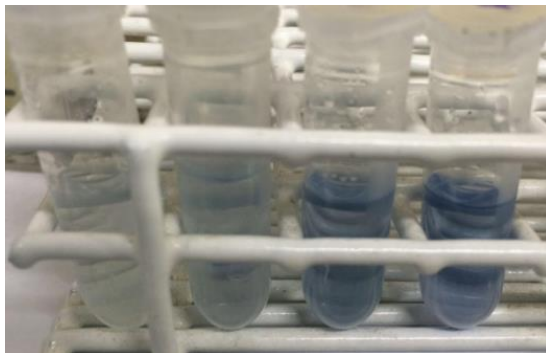


Figura C1. Curva de calibração utilizando glicina para quantificação de genipina. Fonte: elaborado pela autora.

Para isso, as soluções padrões de genipina (ou amostras que se deseja quantificar) foram incubadas a 80 °C por 1 h, em seguida, 500 µL foram apanhados e adicionados em 500 µL de uma solução de glicina (1 g.L⁻¹). As amostras foram colocadas em banho-maria a 100 °C por 30 min, para induzir a reticulação, após foram refrigeradas com gelo e mantidas por 5 min a temperatura ambiente para posterior leitura no espectrofotômetro. Após a varredura de absorbâncias, foi constatado que em 600 nm pode ser feita a leitura da quantificação de genipina utilizando glicina. A equação obtida encontra-se abaixo (Eq. 1).

$$Genipina (mg/L) = \frac{(Abs Amostra - Abs Branco) + 0,0121}{0,0016} \quad (Eq. 1)$$

APÊNDICE D – RESULTADOS PARCIAIS DO ESTUDO DA CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE BGAD-D DE B-GALACTOSIDASE DE *BACILLUS CIRCULANS* VISANDO A SÍNTESE DE GOS

O DNA de *Bacillus circulans* foi utilizado no desenvolvimento deste estudo por possuir um futuro promissor para aplicação em produtos da indústria alimentícia. Para isso, foram construídos diferentes *primers* para deletar grande parte do gene que codifica a β-galactosidase de *B. circulans*, a fim de obter somente a porção BgaD-D (ver item 2.3.3.1, “β-galactosidase de *Bacillus circulans*”). Os *primers* desenhados e suas características estão na Tabela 1.

Tabela D1. *Primers* testados para amplificação da região BgaD-D da β-galactosidase de *Bacillus circulans* (sentido 5'-3').

Primer	Sequência de nucleotídeos e sítio de restrição	Características
<i>Forward</i>	5'- tataca [▼] tatgggaaacagtgagctatgatgg -3' <i>NdeI start codon</i>	Desenvolvido com base em estudos já existentes (Bultema et al. 2014) T _m = 58 °C
<i>Reverse 1</i>	5'- tttg [▼] tcgacttatggcggttacgtaaatac -3' <i>SalI stop codon</i>	Desenvolvido com base em estudos já existentes (Bultema et al. 2014) T _m = 58 °C Formação de <i>hairpin</i>
<i>Reverse 2</i>	5'- gcg [▼] tcgacgtcatggtcttatggcggttac -3' <i>SalI stop codon</i>	Desenvolvido para uma maior parte do <i>primer</i> anelar no DNA T _m = 63 °C muito similar à temperatura de desnaturação
<i>Reverse 3</i>	5'- gcg [▼] tcgacttatggcggttac 3' <i>SalI stop codon</i>	Desenvolvido para baixar a T _m T _m = 54 °C.
<i>Reverse 4</i>	5'- ga [▼] gatctttatggcggttacgtaaatacgcctc -3' <i>BglIII stop codon</i>	Desenvolvido com outro sítio de restrição e com uma sequência maior de anelamento ao gene de interesse T _m = 60 °C

Fonte: elaborado pela autora.

O uso do *start codon* no *primer forward* é inserido para sinalizar o início do gene, bem como o uso do *stop codon* nos *primers* reversos é utilizado para sinalizar o fim do gene, uma ilustração foi desenvolvida para melhor entendimento (Figura 1).

microrganismo foi cultivado e uma única colônia foi observada. A colônia foi isolada e incubada para posterior purificação do DNA plasmidial, com o intuito de verificar novamente a presença do gene. A clivagem do gene do DNA plasmidial foi realizada utilizando a enzima de restrição *EcoRI*. Porém, após a PCR e análise do gel de agarose, foi observado que a região de interesse não foi amplificada. Ao se avaliar o *primer reverse 1* no *software Gene Runner*, foi possível ver que este formava um *hairpin* (dobra), anelando nele mesmo, o que possivelmente acarretava as baixas ampliações do gene de interesse. Assim, dois outros *primers* reversos foram desenvolvidos.

Depois de inúmeras tentativas de ampliações, foi obtido resultados similares empregando o *primer reverse 2*. Nas PCRs conduzidas com o *primer reverse 2*, bandas de aproximadamente 2500 pb foram visualizadas empregando 5 % de DMSO e 50 °C na amplificação. A banda foi purificada, reamplificada, purificada, clonada e novamente utilizada para transformar em células de *E. coli* eletrocompetentes com auxílio do vetor pCR-Blunt®. Após a incubação, 8 colônias cresceram, assim, ambas foram submetidas a purificação do DNA plasmidial e clivadas tanto empregando a *EcoRI* quanto empregando *NdeI/SalI*. Contudo, somente bandas em torno de 1000 pb foram visualizadas. Quando à utilização do *primer reverse 3*, nenhum resultado positivo foi encontrado.

Então, partiu-se para o quarto e último *primer* testado, o *primer reverse 4*, o qual foi desenvolvido com a proposta de inserção de um sítio de restrição de outra enzima, a *BglIII*, e com uma extensão maior completar ao gene de interesse, para evitar o anelamento do mesmo em outras partes do DNA. Porém, nenhum resultado satisfatório foi obtido. Como possíveis problemas enfrentados, destaca-se a dificuldade de desenvolver um *primer* reverso que não anele em si mesmo (formação de *hairpins*), e com uma T_m muito alta.

Em relação às características gerais das colônias de *B. circulans*, estas são conhecidas por serem arredondadas (característico de bactérias), possuírem formato de bastonete, serem gram-variáveis (Vidhyalakshmi et al. 2016; Adam et al. 2015), crescerem anaerobicamente, serem catalase positivas e oxidase negativas (Nakamura & Swezey 1983). Neste trabalho, a cepa utilizada foi aberta em meio estéril e cultivada com todos os cuidados para evitar contaminação, mas não foram realizados testes profundos de identificação da mesma, somente análise da morfologia das colônias, visualização microscópica e teste de gram (gram negativas) (Figura 3).

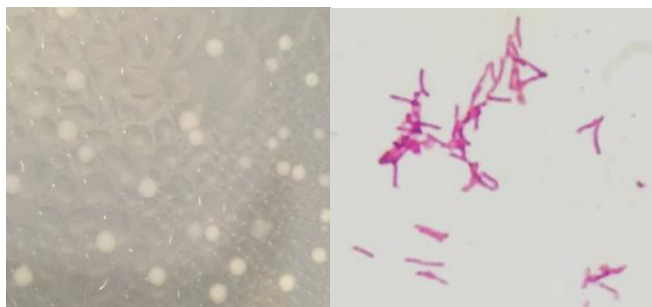


Figura D3. Características das colônias da cepa utilizada neste trabalho (a) e sua análise microscópica (b). Fonte: elaborado pela autora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, 2008. *Síntese e Caracterização de Hidrogéis Biodegradáveis à base de Quitosana com Morfologia Controlada com Potencial Aplicação como Carreadores de Fármacos*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Adam, N., Ahmed, M. & El-sanosi, M.S., 2015. *The effect of Bacillus larvicidal toxins On mammals*. University of Bahr-Elgazal.
- Adrio, J.L. & Demain, A.L., 2010. Recombinant organisms for production of industrial products. *Bioengineered Bugs*, 1(2), pp.116–131.
- Aider, M., de Halleux, D. & Belkacemi, K., 2007. Production of granulated sugar from maple syrup with high content of inverted sugar. *Journal of Food Engineering*, 80(3), pp.791–797.
- Akao, T., Kobashi, K. & Aburada, M., 1995. Enzymic studies on the animal and intestinal bacterial metabolism of geniposide. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 17(12), pp.1573–1576.
- Almeida, C.S., 2013. *Propagação e conservação in vitro de acessos de jenipapeiro*. Universidade Federal de Sergipe.
- Alves, R. E.; Chitarra, A. B.; Chitarra, M.I.F., 1995. *Postharvest physiology of acerola (Malpighia emarginata DC) fruits: Maturation changes, respiratory activity and refrigerated storage at ambient and modified,*
- Alves, L. & Ming, L., 2015. Chemistry and pharmacology of some plants mentioned in the letter of Pero Vaz de Caminha. *Ethnobiology and Conservation*, 3(February), pp.1–15. Available at: <http://www.ethnobiococonservation.com/index.php/ebc/article/view/57/62>.
- Amersham, 2001. *Protein Purification: Handbook AA.*, Amersham Pharmacia Biotech.
- Andre, P., Tranchant, J.-F. & Garcia, M., 2010. Coloring Materials And Their Use In Compositions, In Particular Cosmetic Compositions. *Draft Patent*.
- Arantes, V. & Saddler, J.N., 2010. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for biofuels*, 3(4), pp.1–11.
- Barbosa, Mariana; German, J. Bruce; Lebrilla, Carlito B.; Mills, David; Freeman-

- Sharkey, Samara; King, W.R., 2017. US20170000811A1.
- Barreto, G.P.M., Benassi, M.T. & Mercadante, A.Z., 2009. Bioactive compounds from several tropical fruits and correlation by multivariate analysis to free radical scavenger activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(10), pp.1856–1861.
- Bentes, Á. de S., 2014. *Compostos bioativos de jenipapo, laranja e mang : composição e desenvolvimento de métodos de extração*. Unicamp.
- Bentes, Á. de S. et al., 2015. Influence of the composition of unripe genipap (*Genipa americana* L.) fruit on the formation of blue pigment. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6), pp.3919–3924.
- Bentes, Á. de S. & Mercadante, A.Z., 2014. Influence of the stage of ripeness on the composition of iridoids and phenolic compounds in genipap (*Genipa Americana* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(44), pp.10800–10808.
- Bernard, P. et al., 2001. Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: application to phospholipase A(2) inhibitors. *Phytochemistry*, 58, pp.865–874.
- Beto, J.A., 2015. The role of calcium in human aging. *Clinical nutrition research*, 4(1), pp.1–8.
- Bhat, M.K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18(5), pp.355–383.
- Bispo, V.M., 2009. *Estudo do Efeito da Reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA*. Universidade Federal de Minas Gerais Curso.
- Boon, M.A., Janssen, A.E.M. & Van 't Riet, K., 2000. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2–4), pp.271–281.
- Borges, E.S. & Rezende, C.M., 2000. Main aroma constituents of genipap (*Genipa americana* L.) and bacuri (*Platonia insignis* M.). *Journal of Essential Oil Research*, 12(1), pp.71–74.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical*

Biochemistry, 72(1–2), pp.248–254.

- Brasil, A.S. et al., 2016. Evaluation of Physicochemical Quality of Frozen Fruit Pulp Marketed in the City of Cuiabá-MT. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 38(1), pp.167–175.
- Bultema, J.B., Kuipers, B.J.H. & Dijkhuizen, L., 2014. Biochemical characterization of mutants in the active site residues of the β -galactosidase enzyme of *Bacillus circulans* ATCC 31382. *FEBS Open Bio*, 4, pp.1015–1020. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fob.2014.11.002>.
- Butler, M.F., Ng, Y.F. & Pudney, P.D. a, 2003. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 41(24), pp.3941–3953.
- Cabral, J.M.S., M.R., A.-B. & Gama, M., 2003. Engenharia Enzimática. *Lidel – edições técnicas, Lda*.
- CampoVivo, 2012. *Cresce a comercialização do jenipapo na Ceasa/ES*, Available at: <http://campovivo.com.br/sem-categoria/Cresce-a-comercializacao-do-jenipapo-na-Ceasa-ES/>.
- Canilha, L., 2006. Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos 1. , pp.48–57.
- Cantone, S. et al., 2013. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. *Chemical Society reviews*, 42(15), pp.6262–76.
- Cao, L., 2005. Immobilised enzymes: Science or art? *Current Opinion in Chemical Biology*, 9(2), pp.217–226.
- Carrillo-Ocampo, D. et al., 2013. Anti-inflammatory activity of iridoids and verbascoside isolated from *Castilleja tenuiflora*. *Molecules*, 18(10), pp.12109–12118.
- Cech, T.R. & Bass, B.L., 1986. Biological catalysis by RNA. *Ann Rev Biochem*, 55, pp.599–629.
- Chaplin, M.F. & Bucke, C., 1990. Enzyme Technology. *Cambridge University Press*,

pp.1–280.

- Chemat, F., Zill-E-Huma & Khan, M.K., 2011. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. In *Ultrasonics Sonochemistry*. Elsevier B.V., pp. 813–835.
- Chen, J. li et al., 2015. ¹H NMR-based metabolic profiling of liver in chronic unpredictable mild stress rats with genipin treatment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 115, pp.150–158.
- Chen, K.-Y. & Yao, C.-H., 2011. Repair of bone defects with gelatin-based composites: A review. *BioMedicine*, 1(1), pp.29–32.
- Chen, M.C. et al., 2009. Mechanical properties, drug eluting characteristics and in vivo performance of a genipin-crosslinked chitosan polymeric stent. *Biomaterials*, 30(29), pp.5560–5571.
- Cho, Y.J. et al., 2006. One-step enzymatic synthesis of blue pigments from geniposide for fabric dyeing. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 11(3), pp.230–234.
- Cipolatti, E.P. et al., 2014. Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 99(January), pp.56–67.
- Coelho, V.P.D.M., Agra, M.D.F. & Barbosa, M.R.D.V., 2006. Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K.Schum. (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(2), pp.170–177.
- Coimbra, J.L. et al., 2006. Bematóides fitoparasitos associados a fruteiras nativas e exóticas na região do recôncavo da Bahia, Brasil. *Revista Magistra*, 18, pp.48–51.
- Corrêa, M.P. & Penna, L. de A., 1984. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas* 1st ed. I. B. de D. F. Ministério da Agricultura, ed.,
- Cravo, A.B., 1995. *Frutas e Ervas que Curam: Usos, Receitas e Dosagens* 5th ed. Hemus, ed., São Paulo.
- Dalla-Vecchia, R., Nascimento, M.D.G. & Soldi, V., 2004. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, 27(4), pp.623–630.
- Damasceno, S. & Francisco, A. De, 2010. Sustentabilidade do processo de tingimento do tecido de algodão orgânico. *XXX Encontro Nacional de Engenharia de Produção*.

- Dantas, A.C.V.L. et al., 2009. Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas. *Informação, Embrapa Tecnológica*, pp.275–291.
- Delprete, P.G., Smith, L.B. & Klein, R.M., 2005. *Rubiáceas: Flora Ilustrada Catarinense* 2nd ed. A. Reis, ed., Santa Catarina.
- Dewick, P.M., 1997. The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. *Natural Product Reports*, 14(2), pp.111–144.
- Dicosimo, Robert; McAuliffe, J.A.J.P. and & Bohlmann, G., 2013. Industrial use of immobilized enzymes. *Chem. Soc. Rev*, 42, pp.6437–6474.
- Djerassi, C., Gray, J.D. & Kincl, F.A., 1960. Naturally occurring oxygen heterocyclics. IX. Isolation and characterization of genipin. *Journal of Organic Chemistry*, 25(12), pp.2174–2177.
- Dong, Y. et al., 2014. Biotransformation of geniposide in *Gardenia jasminoides* to genipin by *Trichoderma harzianum* CGMCC 2979. *Cuihua Xuebao/Chinese Journal of Catalysis*, 35(9), pp.1534–1546.
- Drewes, S.E.I. molluscicidal compounds from *A. dimidiata* et al., 1996. Iridoid Molluscicidal Compounds from *Apodytes dimidiata*. *Journal of Natural Products*, 59(12), pp.1169–1170.
- Ekman, B. & Sjöholm, I., 1978. Improved stability of proteins immobilized in microparticles prepared by a modified emulsion polymerization technique. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67(5), pp.693–696.
- Elisabetsky, E. & Posey, D.A., 1989. Use of contraceptive and related plants by the Kayapo Indians (Brazil). *Journal of Ethnopharmacology*, 26(3), pp.299–316.
- Endo, T. & Taguchi, H., 1973. The Constituents of *Gardenia jasminoides*, geniposide and genipin-gentiobioside. *Chemical & Pharmaceutical bulletin*, 21, pp.2684–2688.
- Eriksen, N.T., 2008. Production of phycocyanin - A pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(1), pp.1–14.
- Estrella, E. & Botto, M.P., 1995. *Plantas medicinales amazonicas: realidad y perspectivas. Medicinal plants from the Amazon Region: reality and perspectives*,

- Faria, A.F. et al., 2010. Characterization and singlet oxygen quenching capacity of spray-dried microcapsules of edible biopolymers containing antioxidant molecules. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), pp.8004–8011.
- Fernandes, F.A. & Rodrigues, S., 2012. Ultrasound as pre-Treatment for drying of genipap (*genipa americana* L.). *International Journal of Food Engineering*, 8(3).
- de Figueiredo, R.W. et al., 1986. Características Físicas E Químicas Do Jenipapo. *Pesq. agropec. bras.*, 21(4), pp.421–428.
- Francis, J.K., 1993. *Genipa americana* L. Jagua, genipa. *Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station*, 58, pp.1–5.
- Frenzel, M. et al., 2015. Comparison of the galactooligosaccharide forming activity of different β -galactosidases. *LWT - Food Science and Technology*, 60, pp.1068–1071.
- Fujikawa, S. et al., 1987. Brilliant skyblue pigment formation from gardenia fruits. *Journal of Fermentation Technology*, 65(4), pp.419–424.
- Furtado, S.K., 2006. *Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do Paraná: testes in vitro e in vivo*. Universidade Federal do Paraná.
- Gabriela, R. et al., 2008. Atividade Antioxidante em Polpa e Semente de Jenipapo (*Genipa americana* L.). *Journal of Food Science*, (2001), pp.60–63.
- Garcia-Galan, C. et al., 2011. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 353(16), pp.2885–2904.
- Giacomini, C. et al., 1998. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: comparison of different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 4, pp.313–327.
- Gomes, J.B.M. et al., 2010. *Nove Espécies Frutíferas da Várzea e Igapó para Aquicultura, Manejo da Pesca e Recuperação de Áreas Ciliares*, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).
- Gomez, M.L.P.A., Lajolo, F.M. & Cordenunsi, B.R., 1999. Metabolismo de carboidratos durante o amadurecimento do mamão (*Carica papaya* L. Cv. Solo): influência da radiação gama. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 19(2), pp.246–

252.

- Gong, G. et al., 2011. Purification and Characterization of a β -Glucosidase from *Aspergillus niger* and Its Application in the Hydrolysis of Geniposide to Genipin. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 24(6), pp.788–794.
- Goraleb, K., Bueno, M.I.M.S. & Alexandre, T.L., 2008. Processo para Classificação e Determinação do Índice de Doçura em Açúcares ou Sacarídeos. , p.34.
- Goularte, V.D. da S. & Antunes, P.L., 1999. Caracterização físico química de maçãs fuji concentradas com açúcares e desidratadas. *Rev. Bras. de AGROCIÊNCIA*, 5(2), pp.149–151.
- Goulas, A., Tzortzis, G. & Gibson, G.R., 2007. Development of a process for the production and purification of ??- and ??-galactooligosaccharides from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *International Dairy Journal*, 17(6), pp.648–656.
- Grosová, Z., Rosenberg, M. & Rebroš, M., 2003. Perspectives and Applications of Immobilised β -Galactosidase in Food Industry – a Review. , 26(1), pp.1–14.
- Guarnaccia, R. et al., 1972. Geniposidic acid, an iridoid glucoside from *Genipa americana*. *Tetrahedron Letters*, 13(50), pp.5125–5127.
- Guisan, J.M., 2006. Immobilization of enzymes and cells. *Food Microbiology*.
- Habibi, Y., Mahrouz, M. & Vignon, M.R., 2009. Microfibrillated cellulose from the peel of prickly pear fruits. *Food Chemistry*, 115(2), pp.423–429. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.034>.
- Hamacek, F.R. et al., 2013. Valor Nutricional , Caracterização Física E Físico-Química De Jenipapo (*G Enipa Americana L .*) Do. *Braz. J. Food Nutr.*, 24(1), pp.73–77.
- Hamerski, L. et al., 2003. Iridoid glucosides from *Randia spinosa* (Rubiaceae). *Phytochemistry*, 63(4), pp.397–400.
- Hanefeld, U., Gardossi, L. & Magner, E., 2009. Understanding enzyme immobilisation. *Chem Soc Rev*, 38(2), pp.453–468. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19169460>.
- Hansen, D.D. et al., 2008. Chemical characterization of native jenipapo fruits from Recôncavo Baiano region aiming in natura fruit consumption and industrialization.

Revista Brasileira De Fruticultura, 30, pp.964–969.

- Hardisson, A. et al., 2001. Mineral composition of the banana (*Musa acuminata*) from the island of Tenerife. *Food Chemistry*, 73(2), pp.153–161.
- Harris, J.M., Epting, K.L. & Kelly, R.M., 2010. N-Terminal fusion of a hyperthermophilic chitin-binding domain to xylose isomerase from *Thermotoga neapolitana* enhances kinetics and thermostability of both free and immobilized enzymes. *Biotechnology Progress*, 26(4), pp.993–1000.
- Hervé, D. & Gwenaëlle, J., 2013. Dyeing process using a composition comprising a glycosyl iridoid compound and a nucleophile or an amino or thio polymer, composition and devices therefor.
- Hsieh, H.J., Liu, P.C. & Liao, W.J., 2000. Immobilization of invertase via carbohydrate moiety on chitosan to enhance its thermal stability. *Biotechnology Letters*, 22(18), pp.1459–1464.
- Husain, Q., 2010. Beta galactosidases and their potential applications: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 30(1), pp.41–62.
- Hwa, J.S. et al., 2011. Genipin selectively inhibits TNF- α -activated VCAM¹ but not ICAM¹ expression by upregulation of PPAR- γ in human endothelial cells. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 15(3), pp.157–162.
- Inouye, H. et al., 1969. Zur biosynthese der iridoidglucosides. *Tetrahedron Lett.*, 10(28), pp.2351–2354.
- Ishikawa, K. et al., 2015. Crystal structure of β -galactosidase from *Bacillus circulans* ATCC 31382 (BgaD) and the construction of the thermophilic mutants. *FEBS Journal*, 31382, p.n/a-n/a.
- Ispas, C., Sokolov, I. & Andreescu, S., 2009. Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(2), pp.543–554.
- Jayani, R.S., Saxena, S. & Gupta, R., 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 40(9), pp.2931–2944.
- JECFA, 2014. *Evaluation of food additives (including flavouring agents)*. Joint FAO/WHO expert committee on food additives,

- JECFA, 2015. *Propuestas de adiciones y cambios a la lista de prioridades de los aditivos alimentarios propuestos para su evaluación por el JECFA (Respuestas)*,
- Jensen, S.R., 1991. *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids* J.B. Harbo.,
- Johannes, T.W. & Zhao, H., 2006. Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. *Current Opinion in Microbiology*, 9(3), pp.261–267.
- Jouppila, K.; Kansikas, J.; Roos, Y.H., 1997. Glass Transition, Water Plasticization, and Lactose Crystallization in Skim Milk Powder. *Journal of Dairy Science*, 80(12), pp.3152–3160.
- Juang, R.S., Wu, F.C. & Tseng, R.L., 2001. Solute adsorption and enzyme immobilization on chitosan beads prepared from shrimp shell wastes. *Bioresource Technology*, 80(3), pp.187–193.
- Katchalski-Katzir, E., 1993. Immobilized enzymes--learning from past successes and failures. *Trends in biotechnology*, 11(11), pp.471–8.
- Kayonga, L., 1996. *Molluscides and Other Compounds From Indigenous Plants*. University of Natal, Pietermaritzburg.
- Kirking, B., Hedman, T. & Criscione, J., 2014. Changes in the interfacial shear resistance of disc annulus fibrosus from genipin crosslinking. *J Biomech.*, 47(1), pp.1–13.
- Klein, M.P. et al., 2016. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and β -d-galactosidase immobilization. *Carbohydrate Polymers*, 137, pp.184–190.
- Klein, M.P. et al., 2012. Effect of the support size on the properties of b-galactosidase immobilized on chitosan: Advantages and disadvantages of macro and nanoparticles. *Biomacromolecules*, 13(8), pp.2456–2464.
- Klein, M.P. et al., 2013. High stability of immobilized β -d-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), pp.465–470.
- Klibanov, A.M., 1979. Enzyme stabilization by immobilization. *Anal Biochem.*, 93(1), pp.1–25.

- Koga, K., Fujikawa, S. & Fukui, Y., 1989. Natural blue dye composition and colorant using the same: prepared by reacting taurine and genipin.
- Kouam, S.F. et al., 2013. Monoterpenes with antibacterial activities from a Cameroonian medicinal plant *Canthium Multiflorum* (Rubiaceae). *Fitoterapia*, 91, pp.199–204.
- Krajewska, B., 2004. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, pp.126–139.
- Kumar, M., 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, 46(1), pp.1–27.
- Kuo, Y.C. & Lin, C.Y., 2006. Effect of genipin-crosslinked chitin-chitosan scaffolds with hydroxyapatite modifications on the cultivation of bovine knee chondrocytes *Biotechnology and bioengineering*. , 95(1), pp.132–144.
- Lavinia, C.G., Sigurdson, G.T. & Giusti, M.M., 2015. Hue Expression and Shelf-Life Stability Studies of Natural Blue Food Color in.
- Lee, J.H., Lee, D.U. & Jeong, C.S., 2009. *Gardenia jasminoides* Ellis ethanol extract and its constituents reduce the risks of gastritis and reverse gastric lesions in rats. *Food Chem Toxicol.*, 47(6), pp.1127–1131.
- Lee, S.-W. et al., 2003. Colorimetric determination of amino acids using genipin from *Gardenia jasminoides*. *Analytica Chimica Acta*, 480(2), pp.267–274.
- Li, L. et al., 2015. Characterization of the cross-linked enzyme aggregates of a novel β -galactosidase, a potential catalyst for the synthesis of galacto-oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(3), pp.894–901.
- Li, L. et al., 2015. Enzymatic Hydrolysis and Simultaneous Extraction for Preparation of Genipin from Bark of *Eucommia ulmoides* after Ultrasound, Microwave Pretreatment. *Molecules*, 20, pp.18717–18731.
- Li, N. & Bai, R., 2005. A Novel Amine-Shielded Surface Cross-Linking of Chitosan Hydrogel Beads for Enhanced Metal Adsorption Performance. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 47(17), pp.6692–6700.
- Lin, Y.H. et al., 2013. Genipin-cross-linked fucose-chitosan/heparin nanoparticles for the eradication of *Helicobacter pylori*. *Biomaterials*, 34(18), pp.4466–4479.

- Liu, X. & Lou, H., 2007. Synthesis of monoterpene alkaloid derivatives from the iridoid glucoside geniposide. *Natural Product Research*, 21(13), pp.1157–1164.
- Liu, Y. et al., 2016. Stability and catalytic properties of lipase immobilized on chitosan encapsulated magnetic nanoparticles cross-linked with genipin and glutaraldehyde. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91(5), pp.1359–1367.
- Lorenzi, H., 1992. *Árvores brasileiras: manual de identificação de plantas arbóreas nativas do Brasil* Plantarum, ed., São Paulo.
- Machado, C.D., 2012. *Análise reológica de doce de manga enriquecido com resíduos provenientes do processamento da polpa*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Mahoney, R.R., 1998. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: A review. *Food Chemistry*, 63(2), pp.147–154.
- Mansur, R., 2012. Cresce a comercialização do jenipapo na Ceasa/ES.
- Marcondes, S., 2005. *Brasil, amor à primeira vista!: viagem ambiental no Brasil do século XVI ao XXI* E. P. LTDA, ed.,
- Marconi, W., 1989. Immobilized enzymes: their catalytic behaviour and their industrial and analytical applications. *Reactive Polymers*, 11, pp.1–19.
- Markets, M. and, 2016. Food Enzymes Market by Type, Application, Source, Form, & by Region - Global Forecasts to 2021. *Rohan, Mr.*
- Martins, A.R. & Burkert, C.A.V., 2009. Revisão: Galacto-oligosacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. *Brazilian Journal of Food Technology*, 12(3), pp.230–240.
- Martins, D. & Nunez, C.V., 2015. Secondary Metabolites from Rubiaceae Species. *Molecules*, 20, pp.13422–13495.
- McGann, M.E. et al., 2016. Genipin crosslinking of cartilage enhances resistance to biochemical degradation and mechanical wear. *J Orthop Res. (HHS Public Access)*, 33(11), pp.1527–5418.
- Melecchi, M.I.S. et al., 2006. Optimization of the sonication extraction method of *Hibiscus tiliaceus* L. flowers. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13(3), pp.242–250.
- Mendes, A.A., de Oliveira, P.C., et al., 2011. Aplicação de Quitosana como Suporte

- para a Imobilização de Enzimas de Interesse Industrial. *Química Nova*, 34(5), pp.831–840.
- Mendes, A.A., De Castro, H.F., et al., 2011. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: Influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(8), pp.1055–1066.
- Mitova, M.I. et al., 2002. Iridoid patterns in Galium L. and some phylogenetic considerations. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 57(3–4), pp.226–234.
- Mors, W.B., Rizzini, C.T. & Pereira, N.A., 2000. *Medicinal Plants of Brazil* R. A. Algonac: DeFillipps, ed.,
- Moura, S.M.S., de Sousa, S.R.S. & Júnior, A.M.C., 2016. *Genipa americana* L. : prospecção tecnológica. *Jornal Interdisciplinar de Biociências*, 1(2), pp.31–35.
- Mussatto, S.I. & Mancilha, I.M., 2007. Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, 68(3), pp.587–597.
- Muzzarelli, R. et al., 2015. Genipin-Crosslinked Chitosan Gels and Scaffolds for Tissue Engineering and Regeneration of Cartilage and Bone. *Marine Drugs*, 13(12), pp.7314–7338.
- Muzzarelli, R. a a, 2009. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers*, 77(1), pp.1–9.
- Nakamura, L.K. & Swezey, J., 1983. Taxonomy of *Bacillus circulans* Jordan 1890: Base Composition and Reassociation of Deoxyribonucleic Acid. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33(1), pp.46–52.
- Nascimento, F.G., 2008. *Avaliação qualitativa e quantitativa por CLAE de iridóides na Allamanda schottii*. Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI).
- Ni, L., Lin, D. & Barrett, D.M., 2005. Pectin methylesterase catalyzed firming effects on low temperature blanched vegetables. *Journal of Food Engineering*, 70(4), pp.546–556.
- Ono, M. et al., 2007. Three New Monoterpenoids from the Fruit of *Genipa americana*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 55(4), pp.632–634.

- Pacheco, P. & Pascoal, G.B., 2014. Centesimal compounds , physicochemical parameters in in natura jenipapo (*Genipa americana* L.). *Demetra: alimentação, nutrição & saúde*, 9(4), pp.1041–1054.
- Paik, Y.S. et al., 2001. Physical stability of the blue pigments formed from geniposide of gardenia fruits: Effects of pH, temperature, and light. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), pp.430–432.
- Pandey, S. et al., 2008. “Kashi Madhu”: A new muskmelon cultivar with high total soluble solids. *HortScience*, 43(1), pp.245–246.
- Parmar, V.S. & Sharma, S.K., 2000. Novel Constituents of Gardenia Species - A Review. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 59(November), pp.893–903.
- Passuello, F. & Boccaletti, S., 2016. Corporate Strategy on GMOs under Alternative Futures: The Case of a Large Food Retailer in Italy. *EuroChoices*, 15(1), pp.52–58.
- Pedrolli, D.B. et al., 2009. Pectin and Pectinases : Production , Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. , pp.9–18.
- Penalber, T.J. de A. et al., 1996. Ensaios de extração e aplicação de corantes do fruto do jenipapeiro (*Genipa americana*). *Revista Brasileira de Corantes Naturais*, 2, pp.129–135.
- Peng, C. et al., 2014. Chemical composition, antimicrobial property and microencapsulation of Mustard (*Sinapis alba*) seed essential oil by complex coacervation. *Food Chemistry*, 165, pp.560–568.
- Piedade, F., 2008. *Biopirataria e direito ambiental: estudo de caso do cupuaçu*. Universidade de São Paulo.
- Pino, J., Marbot, R. & Vazquez, C., 2005. Volatile constituents of genipap (*Genipa americana* L.) fruit from Cuba. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(6), pp.583–586.
- Pinto, A.B. et al., 2006. Volatile constituents from headspace and aqueous solution of genipap (*Genipa americana*) fruit isolated by the solid-phase extraction method. *Flavour and Fragrance Journal*, 21(3), pp.488–491.
- Pons, M. & Fiszman, S.M., 1996. Instrumental Texture Profile Analysis With Particular Reference To Gelled Systems. *Journal of Texture Studies*, 27(6), pp.597–624.

- Porto, R.G.C.L. et al., 2014. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Genipa Americana L. (Jenipapo) of the Brazilian Cerrado. *Journal of Agriculture and Environmental Sciences*, 3(4), pp.1–13.
- von Poser, G.L., 1997. *Iridóides carbocíclicos: importância taxonômica e biossíntese*. UFRGS.
- Pujana, M.A. et al., 2013. Biodegradable chitosan nanogels crosslinked with genipin. *Carbohydrate Polymers*, 94(2), pp.836–842.
- Queiroz, S.E.E. et al., 2012. Mechanism and control of *Genipa americana* seed germination. *Physiologia Plantarum*, 144(3), pp.263–276.
- Ragusa-Netto, J., 2006. Abundance and frugivory of the Toco toucan (*Ramphastos toco*) in a gallery Forest in Brazil's Pantanal. *Braz. J. Biol.*, 66(1), pp.133–142.
- Ramos-de-la-Peña, A.M. et al., 2016. A review through recovery, purification and identification of genipin. *Phytochemistry Reviews*, 15(1), pp.37–49.
- Ramos-de-la-Peña, A.M. et al., 2014. Environmental friendly cold-mechanical/sonic enzymatic assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana*). *Ultrasonics sonochemistry*, 21(1), pp.43–9.
- Ramos-de-la-Peña, A.M. et al., 2015. *Recovery of genipin from genipap fruit by high pressure processing*,
- Ramos-De-La-Peña, A.M. et al., 2014. Environmental friendly cold-mechanical/sonic enzymatic assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana*). *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(1), pp.43–49.
- Ramos-Ponce, L.M. et al., 2010. A simple colorimetric determination of the free amino groups in water soluble chitin derivatives using genipin. *Food Science and Biotechnology*, 19(3), pp.683–689.
- Renhe, I.R.T. et al., 2009. Obtenção de corante natural azul extraído de frutos de jenipapo. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 44(6), pp.649–652.
- Rodrigues, D.S. et al., 2008. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 51(3–4), pp.100–109.
- Rodrigues, I. & Renhe, T., 2008. *Extração e Estabilidade do Corante Azul de Jenipapo*

- (*Genipa americana* L .). Universidade Federal de Viçosa (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- Rosano, G.L. & Ceccarelli, E.A., 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(APR), pp.1–17.
- Sako, T., Matsumoto, K. & Tanaka, R., 1999. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal*, 9(1), pp.69–80.
- Salla, F., José, A.C. & Faria, J.M.R., 2016. Análise Ecofisiológica de *Genipa americana* L. em banco de sementes induzido. *CERNE*, 22(1), pp.93–100.
- Sambrook, J. & Russel, D.W., 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual* 3th ed.,
- Sampaio-Santos, M.I. & Kaplan, M.A.C., 2001. Biosynthesis Significance of Iridoids in Chemosystematics. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 12(2), pp.144–153.
- Sheldon, R.A., 2007. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 349(8–9), pp.1289–1307.
- Silman, I. & Katchalski, E., 1966. . *Atom Roy Bzochem*, 35, pp.773–908.
- da Silva, A.P., de Lima, C.L.C. & Vieites, R.L., 1998. Caracterização química e física do jenipapo (*Genipa americana* L.) armazenado. *Scientia Agricola*, 55(1).
- Silva, A.P., Lima, C.L.C. & Vieites, R.L., 1998. Caracterização química e física do jenipapo (*Genipa americana* L.) armazenado. *Scientia Agricola*, 55, pp.1–5.
- da Silva, A.V.C. et al., 2009. Caracterização físico-química de jenipapo. *Comunicado Técnico - Embrapa Tabuleiros Costeiros*, 99, pp.1–4.
- da Silva, M.R., 2008. *Estudo da estabilidade térmica da pele*. Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP).
- da Silva, N.M.C. et al., 2010. Thermophysical Characterization of Genipap Pulp. *International Journal of Food Engineering*, 6(3).
- Silva, R.G. et al., 2003. Cloning, overexpression, and purification of functional human purine nucleoside phosphorylase. *Protein Expression and Purification*, 27(1), pp.158–164.
- Silva, S.S.. et al., 2008. Novel genipin-cross-linked chitosan/silk fibroin sponges for

- cartilage engineering strategies. *Biomacromolecules*, 9(10), pp.2764–2774.
- Simões, C.M.O. et al., 2004. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*,
- Singh, N.K. et al., 2010. (Poir.): Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology -A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 4(1), pp.127–131.
- Song, F. et al., 2009. Genipin-crosslinked casein hydrogels for controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 373(1–2), pp.41–47.
- Song, J. et al., 2011. Cloning and expression of a β -galactosidase gene of *Bacillus circulans*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 75(6), pp.1194–1197.
- Song, J. et al., 2013. The discoidin domain of *Bacillus circulans* β -galactosidase plays an essential role in repressing galactooligosaccharide production. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 77(1), pp.73–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23291776>.
- Souza, C.N., 2007. *Características físicas, físico-químicas e químicas de três tipos de jenipapos (Genipa americana L.)*. Universidade Estadual de Santa Cruz.
- De Souza, V.R. et al., 2012. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. *Food Chemistry*, 134(1), pp.381–386.
- Staden, H., 1557. *Hans Staden: The True Story of His Captivity 1557* Malcolm Letts, ed.,
- Sundararaghavan, H.G. et al., 2008. Genipin-induced changes in collagen gels: Correlation of mechanical properties to fluorescence. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 87(2), pp.308–320.
- Sung, H.W. et al., 1999. Gelatin-derived bioadhesives for closing skin wounds: an in vivo study. *J Biomater Sci Polym Ed.*, 10(7), pp.751–771.
- Sung, H.W. et al., 2001. Stability of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin). *Journal of Biomedical Materials Research*, 55(4), pp.538–546.
- Suzuki, Y. et al., 2001. Antithrombotic effect of geniposide and genipin in the mouse thrombosis model. *Planta Medica*, 67(9), pp.807–810.

- Szczesniak, A.S., 2002. Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference*, 13(4), pp.215–225.
- Tanaka, S. et al., 2015. Monobody-mediated alteration of enzyme specificity. *Nature Chemical Biology*, 11(10), pp.762–764.
- Tischer, W. & Kasche, V., 1999. Immobilized enzymes: crystals or carriers? *Trends Biotechnology*, 17(8), pp.326–335.
- Touyama, R. et al., 1994. Studies on the blue pigments produced from genipin and methylamine. I. Structures of the brownish-red pigments, intermediates leading to the blue pigments. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 42(3), pp.668–673.
- Traoré, M. et al., 2008. A new oxygenated ursane derivative from *Canthium multiflorum*. *Planta Medica*, 74(5), pp.560–562.
- Ueda, S., Iwahashi, Y. & Tokuda, H., 1991. Production of anti-tumor-promoting iridoid glucosides in *Genipa americana* and its cell cultures. *Journal of natural products*, 54(6), pp.1677–1680.
- Uenojo, M. & Pastore, G.M., 2007. Pectinolytic enzymes. Industrial applications and future perspectives. *Quimica Nova*, 30(2), pp.388–394.
- Uesato, S. et al., 1984. Biosynthetic pathway of iridoid glucosides in *Gardenia jasminoides* f. *grandiflora* cell suspension cultures after iridodial cation formation. *Tetrahedron Letters*, 25(5), pp.573–576.
- UNCTAD, 2005. Market brief in the European Union for selected natural ingredients derived from native species: *Genipa americana* (Jagua , huito). *J. Food Sci. Technol. Conference on Trade and Development / BioTrade Facilitation Programme, United Nations*, pp.3919–3924.
- Valeri, S.V., Puerta, R. & Da Cruz, M.C.P., 2003. Efeitos do fósforo do solo no desenvolvimento inicial de *Genipa americana* L. *Scientia Forestalis/Forest Sciences*, 1(64), pp.69–77.
- Vasileva, N. et al., 2012. Immobilization of b-galactosidase on modified polypropilene membranes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(5), pp.710–719.
- Velásquez, C.L., Rivas, A. & Ocanto, I.S., 2014. Obtención de Genipina a partir de

- frutos de caruto (*Genipa americana* L .) del llano venezolano. *Avances en Química*, 9(2), pp.75–86.
- Venditti, A., Serrilli, A.M. & Bianco, A., 2013. Iridoids from *Bellardia trixago* (L.) All. *Natural product research*, 27(15), pp.1413–6.
- Vidhyalakshmi, R. et al., 2016. *Bacillus circulans* exopolysaccharide: Production, characterization and bioactivities. *International journal of biological macromolecules*, 87, pp.405–14.
- Vidya, B., Palaniswamy, M. & Gopalakrishnan, V.K., 2014. Screening and Optimization of B -Galactosidase From Fungal Strains By Using Agro Residues. , 3(6), pp.1809–1821.
- Volp, A.C.P., Renhe, I.R.T. & Stringueta, P.C., 2009. Pigmentos naturais bioativos. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 20(1), pp.157–166.
- Wan, L. et al., 2014. Biosynthesis of genipin from gardenoside catalyzed by β -glucosidase in two-phase medium. *CIESC Journal*, 65(9).
- Wang, R. et al., 2015. Gardenamide a protects RGC-5 cells from H₂O₂-induced oxidative stress insults by activating PI3K/Akt/eNOS signaling pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), pp.22350–22367.
- Wang, S.C. et al., 2011. Using orthogonal arrays to obtain efficient and reproducible extraction conditions of geniposide and genipin in gardenia fruit with liquid chromatography-mass spectrometry determinations. *Journal of Food and Drug Analysis*, 19(4), pp.486–494.
- Wang, X.S. et al., 2012. Ultrasound-assisted extraction of geniposide from *Gardenia jasminoides*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(6), pp.1155–1159.
- Ward, O.P., 1991. *Biotecnología de la fermentación: principios, procesos y productos*,
- Warmerdam, A. et al., 2013. Characterization of b-Galactosidase Isoforms from *Bacillus circulans* and Their Contribution to GOS Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170(2), pp.340–358.
- WHO, 2003. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. *World Health Organization technical report series*, 916, pp.1–6.
- Winotapun, W. et al., 2013. One-enzyme catalyzed simultaneous plant cell disruption

- and conversion of released glycoside to aglycone combined with in situ product separation as green one-pot production of genipin from gardenia fruit. *Enzyme and Microbial Technology*, 53(2), pp.92–96.
- Woodward, J. & Arnold, S.L., 1981. The inhibition of β -glucosidase activity in *Trichoderma reesei* C30 cellulase by derivatives and isomers of glucose. *Biotechnology and Bioengineering*, 23(7), pp.1553–1562.
- Xiao, W. et al., 2016. Chemistry and bioactivity of *Gardenia jasminoides*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(1), pp.43–61.
- Xu, L. et al., 2015. Chitosan in Molecularly-Imprinted Polymers: Current and Future Prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), pp.18328–18347.
- Xu, M. et al., 2008. Microbial transformation of geniposide in *Gardenia jasminoides* Ellis into genipin by *Penicillium nigricans*. *Enzyme and Microbial Technology*, 42, pp.440–444.
- Xu, W. et al., 2016. Selective Extraction of Gardenia Yellow and Geniposide from *Gardenia jasminoides* by Mechanochemistry. *Molecules*, 21(5), p.540.
- Yang, B. et al., 2014. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels*, 2, pp.421–449.
- Yang, D. et al., 2012. Short Communication: Preparation of a genipin blue from egg protein and genipin. *Natural Product Research*, 26(8), pp.765–769.
- Yang, Y.S. et al., 2011. Transformation of geniposide into genipin by immobilized β -glucosidase in a two-phase aqueous-organic system. *Molecules*, 16(5), pp.4295–4304.
- Zadow, J.G., 1993. Economic considerations related to the production of lactose and lactose by-products.
- Zhang, C.Y. et al., 2006. Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced cell dysfunction in isolated pancreatic islets. *Cell Metabolism*, 3(6), pp.417–427.
- Zhang, F. et al., 2011. Polymer-coated nanoparticles: A universal tool for biolabelling experiments. *Small*, 7(22), pp.3113–3127.
- Zhang, Y.-H.P. et al., 2011. Toward low-cost biomanufacturing through in vitro

synthetic biology: bottom-up design. *Journal of Materials Chemistry*, 21(47), p.18877.

Zhou, T. et al., 2005. Large-scale isolation and purification of geniposide from the fruit of *Gardenia jasminoides* Ellis by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1100(1), pp.76–80.

Zhu, Y. et al., 2014. A substrate fed-batch biphasic catalysis process for the production of natural crosslinking agent genipin with *Fusarium solani* ACCC 36223. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(6), pp.814–819.

路易斯·费尔南多·埃切韦里, 胡安·费尔南多·吉尔 & 埃斯特班·瓦尔加斯, 2015. Colorant compound derived from *genipa americana* genipin and glycine.