

**Cuantificación de ésteres de forbol en partes
estructurales de semilla descascarada en ocho
accesiones de *Jatropha curcas***

Roldan Dinael Chún Díaz

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2013

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Cuantificación de ésteres de forbol en partes
estructurales de semilla descascarada en ocho
accesiones de *Jatropha curcas***

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Roldan Dinael Chún Díaz

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2013

Cuantificación de ésteres de forbol en partes estructurales de semilla descascarada en ocho accesiones de *Jatropha curcas*

Presentado por:

Roldan Dinael Chún Díaz

Aprobado:

Francisco Bueso, Ph.D.
Asesor Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Departamento de Agroindustria
Alimentaria.

Renán Pineda, Ph.D.
Asesor

Raúl Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Cuantificación de ésteres de forbol en partes estructurales de semilla descascarada en ocho accesiones de *Jatropha curcas*.

Roldan Dinael Chún Díaz

Resumen: Los ésteres de forbol (EF) presentes en la semilla de *Jatropha curcas* son compuestos tóxicos causantes de activar la quinasa C y promotores de cáncer. El objetivo de este estudio fue cuantificar y comparar la cantidad (mg/g de parte) de EF en las partes estructurales (cotiledones, tegumento y embrión) de ocho accesiones de *J. curcas* Mexicana no tóxica y Puebla (México); Criolla Salvadoreña e India Salvadoreña (El Salvador); Embrapa y Bravo × Malí (Brasil); 111 y Arturo Araujo (Honduras). Para extraer los EF se utilizó el método de King (2009) y se cuantificó el extracto por cromatografía líquida de alta presión. Se usó el diseño de parcelas divididas donde las parcelas principales fueron las accesiones y las sub parcelas fueron las partes estructurales de la semilla descascarada con una prueba de separación de medias LSMeans para determinar diferencias significativas ($P < .05$) entre accesiones y parte estructural. Todas las accesiones fueron tóxicas porque excedieron del valor considerado como no tóxico (0.10 mg de EF/g de semilla en base seca). Las accesiones con mayor contenido de EF fueron Mexicana no tóxica e India Salvadoreña con 7.56 ± 0.36 y 7.36 ± 0.16 mg/g de semilla y la menor fue Puebla con 3.15 ± 0.10 mg/g de semilla. Los cotiledones presentaron valores significativamente más altos de EF (6 mg/g) que el tegumento y embrión. Las ocho accesiones evaluadas fueron tóxicas y los cotiledones presentaron mayor contenido de EF. Se recomienda evaluar el efecto del refinamiento en el contenido de EF del aceite.

Palabras claves: Cotiledones, forbol 12-miristato 13-acetato, tóxica.

Abstract: Phorbol esters (PE) present in *Jatropha curcas* seed are toxic compounds causing activation of promoter's kinase C and cancer. The objective of this study was to quantify and compare the amount (mg/ g of part) of PE in structural parts (cotyledons, tegument and embryo) from eight accessions: Mexicana no tóxica and Puebla (Mexico); Criolla Salvadoreña and India Salvadoreña (El Salvador); Embrapa and Bravo × Malí (Brasil) and 111 and Arturo Araujo (Honduras). To extract PE the King (2009) method was used and the extract was quantified by high pressure liquid chromatography. A split plot was used design where the main plots were the accessions and the sub plots were the structural parts of the seed. An LSMeans mean separation test was performed to determine significant differences ($P < .05$) between accessions and structural parts. All accessions were toxic because they exceeded the value considered non-toxic (PE 0.10 mg/g of dry seed). Accessions with the highest content of PE were Mexican “nontoxic” and India Salvadoreña with 7.56 ± 0.36 and 7.36 ± 0.16 mg/g seed respectively and the lowest was Puebla (3.15 ± 0.10 mg/g seed). The cotyledons had significantly higher values of PE (6 mg/g) than tegument and embryo. The eight accessions tested were toxic and cotyledons had higher PE content. It is recommended to evaluate the effect of oil refining on PE content.

Key words: Cotyledons, phorbol 12-myristate 13-acetate, toxic.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
4. CONCLUSIONES.....	13
5. RECOMENDACIONES.....	14
6. LITERATURA CITADA	15
7. ANEXOS.....	17

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros		Página
1.	Contenido de ésteres de forbol (mg/g de parte) en diferentes partes estructurales de <i>Jatropha curcas</i>	2
2.	Diseño experimental.....	4
3.	Porcentaje de humedad en semilla de ocho accesiones de <i>Jatropha curcas</i>	8
4.	Rendimiento promedio (g) de partes estructurales con base en 100 g de semilla entera descascarada en ocho accesiones de <i>Jatropha curcas</i>	9
5.	Resumen de análisis de varianza del efecto de factores en el contenido de ésteres de forbol en ocho accesiones de <i>Jatropha curcas</i>	9
6.	Contenido de ésteres de forbol en semilla entera descascarada en ocho accesiones de <i>Jatropha curcas</i> y porcentaje de distribución en cada parte estructural.	10
7.	Contenido de ésteres de forbol (mg/g de parte) en tres partes estructurales de semilla descascarada en ocho accesiones de <i>Jatropha curcas</i>	12
Figuras		Página
1.	Diagrama de flujo de extracción de ésteres de forbol.	5
2.	Cromatograma de ésteres de forbol y forbol-12-miristato 13-acetato (PMA), King (2009).	7
Anexos		Página
1.	Cromatograma de estándar interno, forbol-12-miristato 13-acetato (PMA).....	17
2.	Cromatograma de cotiledones de la accesión Mexicana no Tóxica.....	17
3.	Cromatograma de cotiledones de la accesión Embrapa.	18
4.	Cromatograma de tegumento de la accesión Criolla Salvadoreña.	18
5.	Cromatograma de tegumento de la accesión Bravo × Malí.	19
6.	Cromatograma de embrión de la accesión Bravo × Malí.....	19
7.	Cromatograma de embrión de la accesión 111.	20
8.	Cromatograma de embrión de la accesión India Salvadoreña.	20
9.	Contenido de ésteres de forbol (mg/g de parte) en partes estructurales de semilla descascarada en ocho accesiones de <i>Jatropha curcas</i>	21

1. INTRODUCCIÓN

La *Jatropha curcas* es una planta oleaginosa que pertenece a la familia de la Euphorbiaceae, originaria de México y Centroamérica cultivado en terrenos áridos, soportando normalmente temperaturas de 35°C y ligeramente temperaturas bajas de 18°C, precipitaciones de 250-1500 mm, pero se desarrolla mejor en regiones con precipitaciones entre 600 a 800 msnm, los frutos de *Jatropha curcas* son de forma ovoide y drupácea con un diámetro de 1.5-3 cm y longitud de 2.5-4 cm, carnoso de color verde-amarillo, cuando es secada se torna café oscura o negra y dehiscente. El desarrollo del fruto es de 90 días desde la floración hasta la maduración de la semilla, el punto óptimo para cosechar el fruto es cuando cambia a color amarillo, cada inflorescencia produce en promedio 10 frutos y estas contiene tres almendras de las cuales se extrae el aceite (Alfonso 2008).

Los rendimientos de semilla de *Jatropha curcas* generalmente son de 30-40% de testa y 60-70% de almendra. La parte de interés es la almendra, esta tiene cantidades de aceite desde 37-39% y de proteína de 22-35%, pero en la torta después de la extracción de aceite el contenido de proteína es de 48-64% (King *et al.* 2009).

Usualmente el aceite de *Jatropha curcas* es tóxico para consumo, la mayoría de las variedades que existen son tóxicas. Uno de los componentes tóxicos que contiene el aceite son los ésteres de forbol. Se han reportado diversos casos de intoxicación provocado por la semilla de *Jatropha curcas* en humanos y en animales que presentan diversos síntomas tales como irritación cutánea, tumores, hemorragia gastrointestinal, cambio microscópico en riñones, pulmones, corazón e hígado y otros síntomas de este componente; se menciona que por cada semilla que contenga entre 43-59% de aceite, se encuentra 1-2% de ésteres de forbol causantes de activar la quinasa C encontrada en los organismos celulares que causan los síntomas arriba mencionados (Wink 1997).

La concentración de ésteres de forbol varía de 2 a 3 mg/g de semilla y de 2 a 4 mg/g de aceite (Li *et al.* 2010), los ésteres de forbol son moléculas anfipáticas y tienen tendencia a unirse a los receptores de membrana de fosfolípidos (Goel 2007). Valores de ésteres de forbol encontrados en semillas de *Jatropha curcas* menor a 0.018 mg/g de semilla se considera como no tóxica; mientras que para la semilla tóxica el rango es de 0.86 a 1.48 mg/g de semilla (Verdugo *et al.* 2010).

Se han realizado estudios para verificar cuál de las partes estructurales de *Jatropha curcas* contiene mayor contenido de ésteres de forbol. King *et al.* (2009), realizó cuantificaciones en la testa, tegumento, cotiledones y embrión, el análisis indicó que los ésteres de forbol no fueron uniformemente distribuidos dentro de las semillas de *Jatropha curcas*, los

ésteres de forbol eran ausentes en la testa, y sólo pequeñas cantidades (< 0.30 mg/g) fueron encontrados en el embrión, la concentración más alta de ésteres de forbol se observó en el tegumento (2.75 mg/g), mientras que los cotiledones contenía 0.347 mg/g. Sin embargo Sosa (2012) separó los cotiledones, testa y embrión en las variedades Cabo Verde, Criolla Mexicana e Hindú Salvadoreña (Cuadro 1) y afirma que los cotiledones fueron la parte estructural de la semilla que presentó mayor contenido de ésteres de forbol y la variedad con mayor contenido de ésteres de forbol, fue la Cabo Verde seguida por la Hindú Salvadoreña.

Cuadro 1. Contenido de ésteres de forbol (mg/g de parte) en diferentes partes estructurales de *Jatropha curcas*.

Variedad	Parte estructural	Ésteres de forbol mg/g
Cabo Verde	cotiledones	0.40
	cáscara	0.20
	embrión	0.10
Hindú Salvadoreña	cotiledones	0.33
	cáscara	0.10
	embrión	0.10
Criolla Mexicana	cotiledones	0.16
	cáscara	0.10
	embrión	0.10

Fuente: Sosa, 2012.

Para el estudio se establecieron los siguientes objetivos:

- Cuantificar la cantidad de ésteres de forbol en las partes estructurales de la semilla de *Jatropha curcas* de ocho accesiones procedentes de Honduras, Brasil, El Salvador y México.
- Comparar la cantidad total de ésteres de forbol por parte estructural por cada una de las accesiones.
- Clasificar las accesiones como tóxicas o no tóxicas con base en la cantidad total de ésteres de forbol.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano (LAAZ), departamento de Agroindustria Alimentaria, lugar en donde se realizó la extracción y cuantificación de los ésteres de forbol. El lugar del estudio está ubicado a 32 km al Este de la ciudad de Tegucigalpa, Honduras. Las semillas de las accesiones utilizadas para el estudio fueron obtenidas del banco germoplasma del proyecto de *Jatropha* Zamorano- Syngenta luego de haber realizado tres cosechas en los meses de julio (3 y 26) y agosto (19) del 2013.

Materiales. Para el análisis de las extracciones se utilizaron:

- Semilla descascarada de *Jatropha curcas* de las accesiones: Embrapa, Puebla Bravo × Malí, 111, Arturo Araujo, Mexicana no tóxica, Criolla Salvadoreña e India Salvadoreña.
- Acetonitrilo para cromatografía líquida LiChrosolv, AX0145, Merck®
- Ácido Fórmico grado reactivo, $\geq 95\%$, F0507, Sigma Aldrich®
- Forbol 12-miristato 13-acetato, $\geq 99\%$ (TLC) polvo, P8139, Sigma Aldrich®
- Filtros para jeringa 0.45 μm PTFE (Polietraflouroetileno)
- Hexano CHROMOMSOLV, Grado HPLC $\geq 99.99\%$, 650552, Sigma Aldrich®
- Isopropanol CHROMOSOLV Plus, Grado HPLC $\geq 99.99\%$, 190764, Sigma Aldrich®
- Metanol grado HPLC $\geq 99\%$, 106007400 Merck
- Nitrógeno UHP, Infra
- Pipetas, AS DIN, Tol. ± 0.03 , Marienfield de 5 y 10 ml
- Tubos cónicos de borosilicato Pyrex de 14 ml
- Viales Agilent Technologies de 1.5 ml.

Equipo. El equipo para las extracciones de ésteres de forbol fueron:

- Balanza Ohaus AR2140
- Centrífuga IEC, Modelo K
- Columna Eclipse Plus C18 150 x 4.6 mm 5 micrón, PN 959993-902
- Dispensador de gas Flexivap Work Station, 100A YH12, Glass-Col®
- HPLC Agilent Technologies, Serie 1100/1200, Detector DAD
- Micropipeta Evol, SGE Analytical Science 5011^a
- Microcentrífuga Eppendorf, Modelo 5418
- Plataforma rotatoria, VWR Shaker Model 5000 STD 120V
- Vortex Fisher, Genie 2, Cat No. 12-812

Diseño experimental. El diseño del estudio fue parcelas divididas (Cuadro 2) con tres repeticiones (cosechas), donde las parcelas principales fueron las accesiones (Embrapa, Bravo × Malí, 111, Arturo Araujo, Mexicana no tóxica, Puebla, Criolla Salvadoreña e India Salvadoreña) y las sub parcelas fueron las partes estructurales de la semilla descascarada (cotiledones, tegumento y embrión). Para el estudio se analizaron 24 tratamientos con tres repeticiones consideradas como las cosechas (3, 26 de julio y 19 de agosto del 2013), obteniendo en total 72 unidades experimentales.

Cuadro 2. Diseño experimental.

Repetición	HN		BR		SAL		MEX	
	AA	111	Em	Br	Cr	Ind	Mnt	Puebla
1	TEG	TEG	TEG	TEG	TEG	TEG	TEG	TEG
	COT	COT	COT	COT	COT	COT	COT	COT
	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB
2	TEG	TEG	TEG	TEG	TEG	TEG	TEG	TEG
	COT	COT	COT	COT	COT	COT	COT	COT
	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB
3	TEG	TEG	TEG	TEG	TEG	TEG	TEG	TEG
	COT	COT	COT	COT	COT	COT	COT	COT
	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB

HN: Honduras, BR: Brasil, SAL: El Salvador, MEX: México, AA: Arturo Araujo, Em: Embrapa, Cr: Criolla Salvadoreña, Ind: India Salvadoreña, Mnt: Mexicana no tóxica, P: Puebla, TEG: tegumento, COT: cotiledones y EMB: embrión.

Rendimiento de partes estructurales. Con base en 100 g de almendra se determinó el rendimiento de cada parte estructural, se separó el tegumento, cotiledones y embrión. Para determinar los rendimientos se pesaron las partes estructurales, los resultados se expresaron en g de parte estructural/100 g de almendra.

Determinación de humedad AOAC 952.08. Los resultados de humedad se determinaron en porcentaje de humedad. Se evaluó el análisis por duplicado para las ocho accesiones de *Jatropha curcas*. Los cálculos de humedad se realizaron por medio de la Ecuación 1 y los resultados se reportaron en base seca.

$$100 - \left(\frac{\text{Peso de muestra seca (g)}}{\text{Peso de muestra húmeda (g)}} * 100 \right) \quad [1]$$

Extracción de ésteres de forbol. Para extraer se recurrió al método desarrollado por King (2009) descrito en la Figura 1, pero se realizó una ligera modificación al cambiar la columna Phenomenex Luna 5u C18 100A 150 x 2mm 5 micrón por Columna Eclipse Plus

C18 150 x 4.6 mm 5 micrón, los tiempos de detección de ésteres de forbol se alargó por ocho minutos de acuerdo al cromatograma del método (Figura 2). Durante el experimento, cada parte estructural de la semilla y tres blancos por tanda fueron expuestos al proceso de extracción de ésteres de forbol.

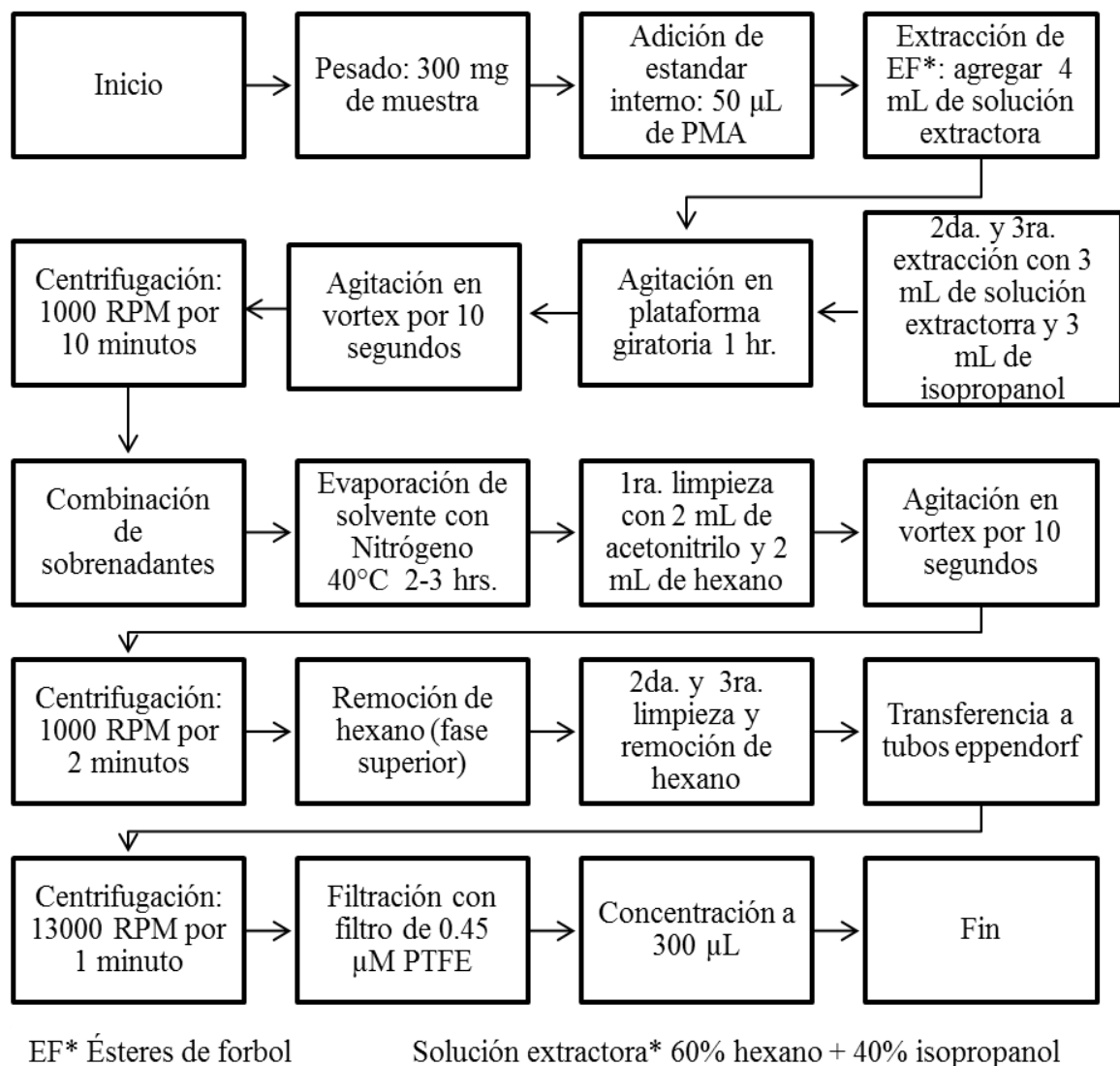


Figura 1. Diagrama de flujo de extracción de ésteres de forbol.

Se eliminó la testa de 20 semillas de *Jatropha curcas* golpeándolas con una mano de mortero para obtener almendras, por cada almendra se procedió a la eliminación de tegumento y separación de cotiledones y embrión. Posteriormente, para cada parte estructural de la almendra se pesó alrededor de 300 mg en tubos cónicos de boro silicato de vidrio. Se agregó 50 µl de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) como estándar interno en una relación 1 mg PMA/ml MeOH, después se extrajo añadiendo 4 ml de una solución de hexano-isopropanol (3:2).

Las muestras se llevaron al vortex durante 10 segundos y luego agitado durante una hora en una plataforma rotatoria, después centrifugados a 1000 RPM durante 10 minutos y posteriormente se extrajo el supernadante de la muestra a otro tubo. Se realizaron dos extracciones más, utilizando 3 ml de la solución hexano-isopropanol (3:2) y 3 ml de isopropanol, luego de nuevo se llevó al vortex durante 10 segundos y centrifugado a 1000 RPM por 10 minutos, al final se combinaron los tres supernadantes, luego se removió el solvente a través de un flujo de nitrógeno a 40°C durante 2-3 horas.

El extracto fue disuelto en 2 ml de acetonitrilo, se mezcló con la mano y luego se agregó 2 ml de hexano y llevado al vortex por 10 segundos, se centrifugo la muestra a 1000 RPM durante 2 minutos para permitir la separación de fases, la fase superior (hexano) fue removida y desechada, posterior a esto, se lavó la muestra 2 veces más, éstos 2 últimos lavados fueron sólo con hexano y centrifugado a 1000 RPM por 2 minutos.

La fase de acetonitrilo fue transferida a un tubo eppendorf y centrifugado a 13000 RPM durante 1 minuto, se realizó una filtración del acetonitrilo utilizando filtro de 0.45 µm PTFE (Millex®-LH) y por último se concentró el extracto a un volumen de 300 µl, a 40°C, usando Flexivap Work Station®.

Análisis de cromatografía. Para identificar y cuantificar los ésteres de forbol, de acuerdo al método de King (2009) se utilizó un Cromatógrafo Líquido de Alta Presión (HPLC) marca Agilent serie 1100/1200, con una columna Eclipse Plus C18 150 x 4.6 mm 5 micrón. Para la fase móvil se usaron dos solventes, la primera conformada por agua con 0.1% de ácido fórmico (solvente A) y la segunda por acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico (solvente B), a un flujo constante de 0.5 ml/min, previo a la lectura se preparó un vial con 100% de acetonitrilo como lavado de la jeringa. Se usó un gradiente de 0-5 minutos con 95% solvente A y 5% de solvente B, de 5-40 minutos, 20% solvente A y 80% Solvente B y de 40-60, 100% de solvente B.

Cuantificación de ésteres de forbol. Para la cuantificación se usó un detector de diodos (DAD 1100) a una longitud de onda de 240 nm, para calcular la cantidad ésteres de forbol se utilizó la Ecuación 2 expresado en mg/g de parte estructural y semilla, estos se calcularon en base seca utilizando el porcentaje de materia seca de cada accesión y para identificar los ésteres de forbol y el estándar interno (PMA) se hizo referencia a los tiempos de elusión de la Figura 2. La materia seca se calculó por diferencia usando los resultados de porcentaje de humedad que fueron calculados por el método de la AOAC 952.08 (1996). Para calcular los resultados en base seca se usó la Ecuación 3.

$$\frac{50 \mu\text{g}}{\text{área PMA}} + \text{área de EF} + \frac{710.9}{616.9} \quad [2]$$

$$\frac{\text{Ecuación 2}}{\% \text{ de materia seca}} \quad [3]$$

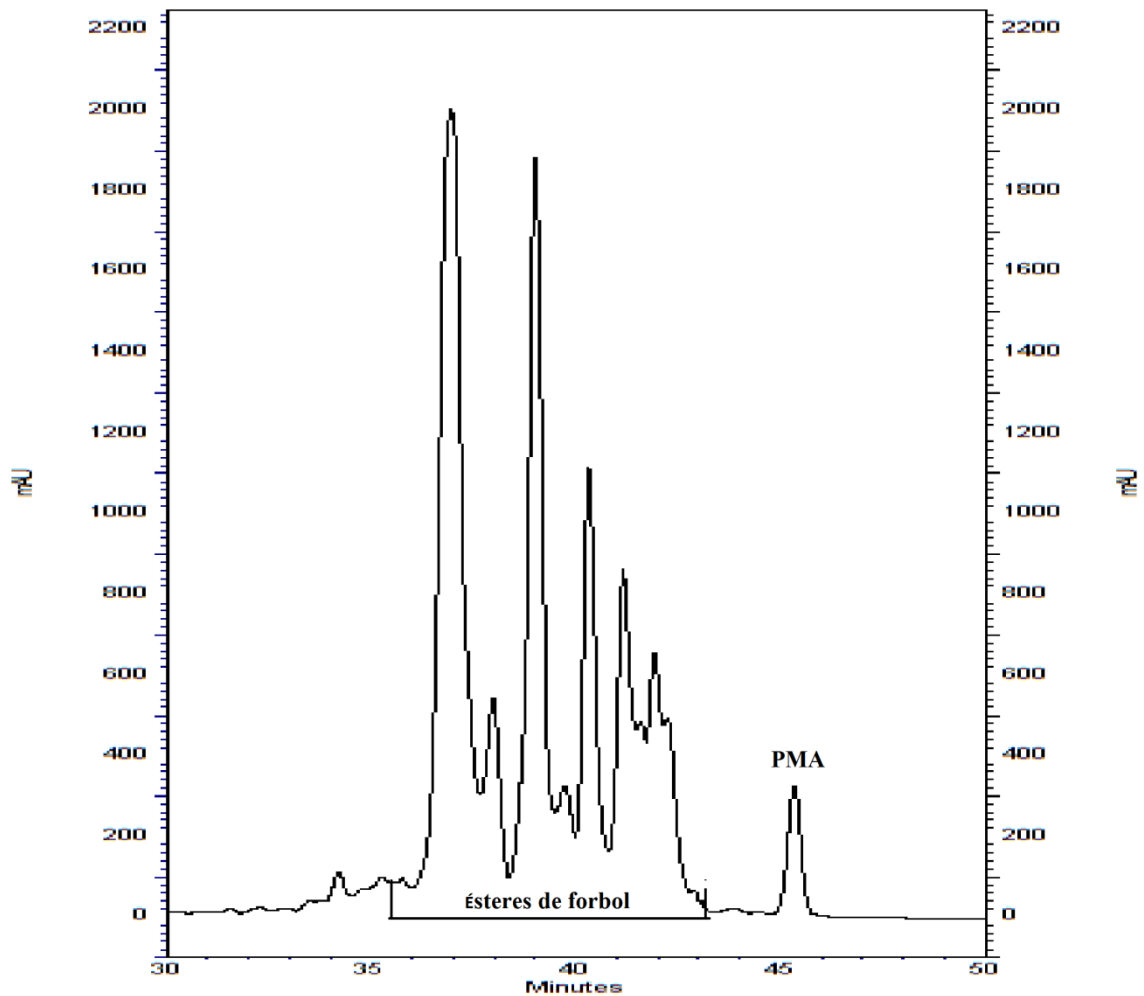


Figura 2. Cromatograma de ésteres de forbol y forbol-12-miristato 13-acetato (PMA), King (2009).

Análisis estadístico. Los resultados fueron analizados con el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.1[®]), para encontrar diferencias significativas entre las partes estructurales de semillas y entre las accesiones de cada país. Se hizo uso de LSMeans como prueba de separación de medias.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de humedad. Se muestra en el Cuadro 3 el contenido de humedad de cada accesión, en donde se observó que no existieron diferencias significativas ($P=0.004$) en el porcentaje de humedad entre las ocho accesiones (Mexicana no tóxica, Puebla, Criolla Salvadoreña, India Salvadoreña, Embrapa, Bravo x Malí, 111 y Arturo Araujo). Azza y Ferial (2010), determinaron el contenido de humedad en semilla de *Jatropha curcas* y como resultado obtuvieron 4.56%. Los resultados obtenidos de humedad se duplicaron de acuerdo a la literatura, semillas con valores menores a 10% de humedad es lo recomendable para la estabilidad durante el almacenamiento (Makkar *et al.* 1998). De acuerdo a Martínez-Herrera *et al.* (2006), el contenido de materia seca encontrado en cuatro variedades de *Jatropha curcas* (Castillo de Teayo, Pueblillo, Cotzacocalcos y Morelos) fue entre 88.7-97.8%.

Cuadro 3. Porcentaje de humedad en semilla de ocho accesiones de *Jatropha curcas*.

Accesión	Humedad (%)	Materia Seca (%) [€]
	Media±DE[¥]	
Mexicana no tóxica	13.1 ^a ±6.2	86.9
Puebla	8.7 ^a ±6.5	91.3
Criolla Salvadoreña	15.2 ^a ±9.4	84.8
India Salvadoreña	11.3 ^a ±5.6	88.7
Embrapa	11.8 ^a ±5.0	88.2
Bravo × Malí	13.0 ^a ±9.9	87.0
111	12.5 ^a ±5.0	87.5
Arturo Araujo	12.3 ^a ±4.7	87.7

^aMedias con la misma letra en la misma columna indica que no hubo diferencia significativa entre ellas ($P>0.05$)

[¥]DE = Desviación Estándar

[€]Materia seca, se determinó por diferencia con base en 100%

Rendimiento de partes estructurales. Se observa en el Cuadro 4, las diferencias estadísticas ($P=0.009$) de masas promedio de partes estructurales de las accesiones Mexicana no tóxica, Puebla, Criolla Salvadoreña, India Salvadoreña, Embrapa, Bravo x Malí, 111 y Arturo Araujo; las cuales fueron útiles para calcular el valor real de ésteres de forbol en cada parte estructural de la semilla.

La parte estructural con mayor rendimiento fueron los cotiledones de la accesión Criolla Salvadoreña y la menor fue Bravo × Malí. Devappa *et al.* (2011), reportó masas similares de cotiledones (97.4 g/100 g de semilla), tegumento (1.7 g/100 g de semilla) y embrión (0.9 g/100 de semilla). Variedades como Cabo Verde e Hindú Salvadoreña, mostraron rendimientos de embrión con 0.78 g, además la masa de la semilla puede ser afectada por la precipitación anual de la región y madurez fisiológica de la semilla (Makkar *et al.* 2008).

Cuadro 4. Rendimiento promedio (g) de partes estructurales con base en 100 g de semilla entera descascarada en ocho accesiones de *Jatropha curcas*.

País	Accesión	g de parte estructural/100 g de semilla		
		Cotiledones	Tegumento	Embrión
		Media±DE [¥]	Media±DE [¥]	Media±DE [¥]
México	Mexicana no tóxica	96.5 ^{cd} ±0.4	2.4 ^a ±0.3	1.1 ^{ab} ±0.1
	Puebla	96.8 ^{bcd} ±0.1	2.1 ^{ab} ±0.1	1.1 ^{ab} ±0.1
El Salvador	Criolla Salvadoreña	97.5 ^a ±0.2	1.7 ^{cd} ±0.2	0.9 ^b ±0.1
	India Salvadoreña	97.5 ^{ab} ±0.2	1.6 ^c ±0.1	1.0 ^b ±0.1
Brasil	Embrapa	97.1 ^{abc} ±0.3	2.0 ^{abc} ±0.2	0.9 ^b ±0.1
	Bravo x Malí	96.2 ^d ±0.4	2.4 ^a ±0.3	1.4 ^a ±0.2
Honduras	111	96.6 ^{bcd} ±0.3	2.1 ^{ab} ±0.2	1.2 ^{ab} ±0.1
	Arturo Araujo	97.1 ^{abc} ±0.2	1.9 ^{abc} ±0.1	1.0 ^b ±0.1
CV (%)		0.3	9.5	11.7

^{abcd}Medias con diferente letra en la misma columna indica que hubo diferencias significativas entre ellas (P<0.05).

[¥]DE=Desviación estándar.

CV (%) = Coeficiente de Variación

Ésteres de forbol en la semilla entera de *Jatropha curcas*. Se determinó que existieron diferencias estadísticas en el contenido de ésteres de forbol en las accesiones (P=0.0001), en las partes estructurales (P=0.0001) y en la interacción accesión × parte (P=0.0001). En el Cuadro 5 se muestra que el contenido de ésteres de se vio afectado mayormente por la parte estructural.

Cuadro 5. Resumen de análisis de varianza del efecto de factores en el contenido de ésteres de forbol en ocho accesiones de *Jatropha curcas*.

Fuente de variación	Valor F	Pr>F [∞]
Accesión	50.16	<0.0001
Parte	441.79	<0.0001
Accesión × Parte	72.05	<0.0001

[∞]=Probabilidades significativas a < 0.05.

En las ocho accesiones (Cuadro 6) existieron diferencias significativas ($P < 0.0001$), la Mexicana no tóxica presentó alto contenido de ésteres de forbol (7.56 mg/g de semilla), seguido por Bravo × Malí (5.72 mg/g de semilla) y las accesiones con menor contenido fueron Puebla y Arturo Araujo (3.15-3.65 mg/g de semilla). Devappa *et al.* (2012), cuantificaron ésteres de forbol en cotiledones representado en esta parte con 85.7% y tegumento de 2.45-10% del total, mientras Verdugo *et al.* (2010) reportaron que el contenido de ésteres de forbol en el embrión representa el 0.8 a 2% del contenido total por g de semilla, pero He *et al.* (2011) encontraron que el embrión de una semilla de *Jatropha curcas* puede tener <0.8% de ésteres de forbol por g de semilla, lo que concuerda con los resultados obtenidos.

Cuadro 6. Contenido de ésteres de forbol en semilla entera descascarada en ocho accesiones de *Jatropha curcas* y porcentaje de distribución en cada parte estructural.

Accesión	Ésteres de forbol (mg/g de semilla) [‡]	% de distribución en parte estructural		
		Cotiledones	Tegumento	Embrión
	Media [€] ± DE [¥]			
Mexicana no tóxica	7.56 ^a ± 0.36	98.4	0.9	0.7
India Salvadoreña	7.36 ^a ± 0.16	99.0	0.5	0.5
Bravo × Malí	5.72 ^b ± 0.66	98.3	0.7	1.0
Embrapa	4.68 ^c ± 0.56	98.7	0.8	0.5
111	4.18 ^{cd} ± 0.40	97.7	1.1	1.2
Criolla Salvadoreña	3.78 ^{cd} ± 0.41	97.7	1.4	1.0
Arturo Araujo	3.65 ^d ± 0.20	97.3	1.6	1.1
Puebla	3.15 ^d ± 0.10	94.8	3.4	1.1

^{abcd}Medias con diferente letra en la misma columna indica que hubo diferencias significativas entre ellas ($P < 0.05$).

[‡]Equivalente a Forbol 12-miristato 13-acetato.

[€]Medias en base seca

[¥]DE=Desviación estándar.

En el Cuadro 6, se muestra que todas las accesiones son tóxicas porque 0.10 mg de ésteres de forbol/g de semilla es considerado como umbral máximo para las semillas categorizadas como "comestibles" o "no tóxicas" (Makkar *et al.* 1998), generalmente las variedades consideradas como "tóxicas" oscilan con valores de ésteres de forbol entre 2 a 4 mg/g de semilla y estos son frecuentes en todo el mundo (Rakshit *et al.* 2012), por lo tanto estas accesiones no podrían utilizarse directamente como alimentación animal ni después de la extracción de aceite.

Valores de ésteres de forbol en variedades no tóxicas de Morelos, Jalisco, Quintana Roo, Yucatán e Hidalgo fueron de 0.041, 0.026, 0.078, 0.060 y 0.154 mg/g de semilla respectivamente. En las variedades Bahía y Piauí de Brasil, el contenido de ésteres de forbol fue 0.92 y 3.32 mg/g de semilla (Vischi *et al.* 2013). Germoplasmas de India e Isla

México, mostraron altas concentraciones de ésteres de forbol entre 2.07 y 5.98 mg/g de semilla (Sosa-Segura *et al.* 2012), mientras en las variedades de México como Castillo de Teayo, Pueblillo y Morelos no se detectó ésteres de forbol, pero en la variedad Cotzacoalcos la concentración fue de 3.85 mg/g de semilla. La concentración de los ésteres de forbol y otros antinutrientes en la semilla de *Jatropha curcas* y otras partes de la planta depende del genotipo, del suelo y las condiciones climáticas (Martinez-Herrera *et al.* 2006).

Ésteres de forbol en partes estructurales de la semilla de *Jatropha curcas*. En el Cuadro 7, se muestra que las partes estructurales de la semilla con mayor cantidad de ésteres de forbol fueron los cotiledones de Mexicana no tóxica e India Salvadoreña, pero menor contenido en Puebla. En tegumento, la accesión con mayor contenido fue Puebla y los de menor fueron India Salvadoreña y 111, lo que concuerda con King *et al.* (2009) porque encontró valores de 2.75 mg de ésteres de forbol/g de semilla. Mientras en el embrión se encontró valores altos en Puebla y Mexicana no tóxica, pero el menor fue Embrapa.

Cuadro 7. Contenido de ésteres de forbol (mg/g de parte) en tres partes estructurales de semilla descascarada en ocho accesiones de *Jatropha curcas*.

Accesión y parte estructural	Ésteres de forbol (mg/g de unidad) ¹	Coefficiente de variación
	Media²±DE³	
Mexicana cotiledones	7.71 ^a ±0.37	4.81
India Salvadoreña cotiledones	7.48 ^a ±0.16	2.15
Bravo × Malí cotiledones	5.84 ^b ±0.68	11.62
Puebla embrión	5.33 ^{cd} ±0.11	2.02
Puebla tegumento	4.97 ^d ±0.42	12.36
Mexicana embrión	4.84 ^d ±0.16	3.35
Embrapa cotiledones	4.75 ^{de} ±0.57	11.62
111 embrión	4.34 ^{ef} ±0.12	2.70
Arturo Araujo embrión	4.28 ^f ±0.25	5.80
111 cotiledones	4.22 ^f ±0.12	9.84
Criolla Salvadoreña embrión	4.10 ^f ±0.13	11.03
Bravo × Malí embrión	4.05 ^f ±0.44	10.88
Criolla Salvadoreña cotiledones	3.79 ^f ±0.42	12.88
India Salvadoreña embrión	3.69 ^f ±0.13	3.47
Arturo Araujo cotiledones	3.65 ^f ±0.21	5.67
Arturo Araujo tegumento	3.10 ^{gh} ±0.20	6.41
Puebla cotiledones	3.09 ^h ±0.10	3.24
Criolla Salvadoreña tegumento	3.07 ^h ±0.36	11.85
Mexicana no tegumento	2.76 ^h ±0.21	7.51
Embrapa embrión	2.69 ^h ±0.06	2.13
India Salvadoreña tegumento	2.40 ^{hi} ±0.13	10.63
111 tegumento	2.11 ⁱ ±0.24	11.25
Embrapa tegumento	1.97 ⁱ ±0.21	10.63
Bravo × Malí tegumento	1.63 ^j ±0.04	2.72

^{abc}Medias con diferente letra en la misma columna indica que hubo diferencia significativa entre ellas (P<0.05).

¹Equivalente a Forbol 12-miristato 13-acetato.

²Medias en base seca.

³D.E.= Desviación estándar.

4. CONCLUSIONES

- Las ocho accesiones evaluadas (Mexicana no tóxica, Puebla, Criolla Salvadoreña, India Salvadoreña, Embrapa, Bravo × Malí, 111 y Arturo Araujo) presentaron concentraciones de ésteres de forbol consideradas como tóxicas.
- Todas las accesiones (Mexicana no tóxica, Puebla, Criolla Salvadoreña, India Salvadoreña, Embrapa, Bravo × Malí, 111 y Arturo Araujo) presentaron mayor contenido de ésteres de forbol en los cotiledones.
- Los cotiledones de la accesión Puebla, el tegumento de la accesión Bravo × Malí y el embrión de la accesión Embrapa presentaron los valores más bajos de ésteres de forbol.

5. RECOMENDACIONES

- Cuantificar la cantidad de ésteres de forbol de las 163 accesiones restantes del banco germoplasma de *Jatropha curcas* del Proyecto Syngenta-Zamorano.
- Determinar el efecto del clima en ésteres de forbol de semilla de *Jatropha curcas*, si las condiciones climáticas afectan el contenido de estos.
- Realizar la cuantificación de ésteres de forbol de todas las variedades existentes de *Jatropha curcas* de la región, para identificar y realizar un mapeo de las variedades tóxicas y no tóxicas de Honduras y Centro América.
- Evaluar el efecto de la extracción y refinamiento sobre la concentración de ésteres de forbol en el aceite.
- Determinar la cantidad de ésteres de forbol en la torta y el aceite extraídos a partir de la semilla, para calcular el porcentaje de toxicidad de ambos productos.
- Evaluar el efecto de tratamientos térmicos y químicos para destoxificar la torta a partir de la extracción de aceite.
- Simplificar el método de extracción de ésteres de forbol desarrollado por King (2009) para aceites.

6. LITERATURA CITADA

Alfonso, J. 2008. Manual para el cultivo del piñón (*Jatropha curcas*) en Honduras. La Lima, Cortés. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA): Fundación Strohm: Gota Verde. 30 p.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1996. AOAC Official Method 952.08 Solids (Total) in Seafood, 35(1): 13.

Azza, A. y A. Ferial. 2010. Nutritional quality of *Jatropha curcas* seeds and effect of some physical and chemical treatments on their anti-nutritional factors. African Journal of Food Science, 4(3): 93-103.

Devappa, R., H. Makkar y K. Becker. 2011. Localisation of antinutrients and qualitative identification of toxic components in *Jatropha curcas* seed. Journal of Science of Food and Agriculture, 92:1519-1525

Goel, G., P. Harinder, G. Francis y K. Becker. 2007. Phorbol Esters: Structure, Biological Activity, and Toxicity in Animals. International Journal of Toxicology, 26:279-288.

He, W. 2011. Biochemical and genetic analyses of *Jatropha curcas* L. seed composition. Ph. D. Thesis, University of York, 149 p.

King, A., W. He, J. Cuevas, M. Freudenberger, D. Raimaramana and I. Graham. 2009. Analysis of seed phorbol-ester and curcumin content together with genetic diversity in multiple provenances of *Jatropha curcas* L. from Madagascar and Mexico. Plant Physiology and Biochemistry, 49:1183-1190.

Li, C., R. Devappa, J. Liu, J. Lv. H.P.S. Makkar y K. Becker. 2010. Toxicity of *Jatropha curcas* phorbol esters in mice. Food and Chemical Toxicology, 48:620-625.

Makkar, H., A. Aderibigbe y K. Becker. 1998. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. Food Chemistry Journal, 62(2):207-215.

Makkar, H., J. Martínez-Herrera y K. Becker. 2008. Variations in the seed number per fruit, seed physical parameters and contents of oil and phorbol ester in toxic and non-toxic genotypes of *Jatropha curcas*. Journal of Plant Science, 3(3):260-265.

Martínez-Herrera, J., P. Siddhuraju, G. Francis, G. Dávila-Ortíz y K. Becker. 2006. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from México. Food Chemistry Journal, 96:80-90.

Rakshit, D., S. Rajesh, V. Kumar, H. Makkar y K. Becker. 2012. Activities of *Jatropha curcas* phorbol esters in various bioassays. Ecotoxicology and Environmental Safety Journal. 78:57-62.

Sosa, I. 2012. Cuantificación de ésteres de forbol en la semilla entera y sus componentes estructurales de tres variedades de *Jatropha curcas*. Tesis Ingeniero Agroindustrial, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 30 p.

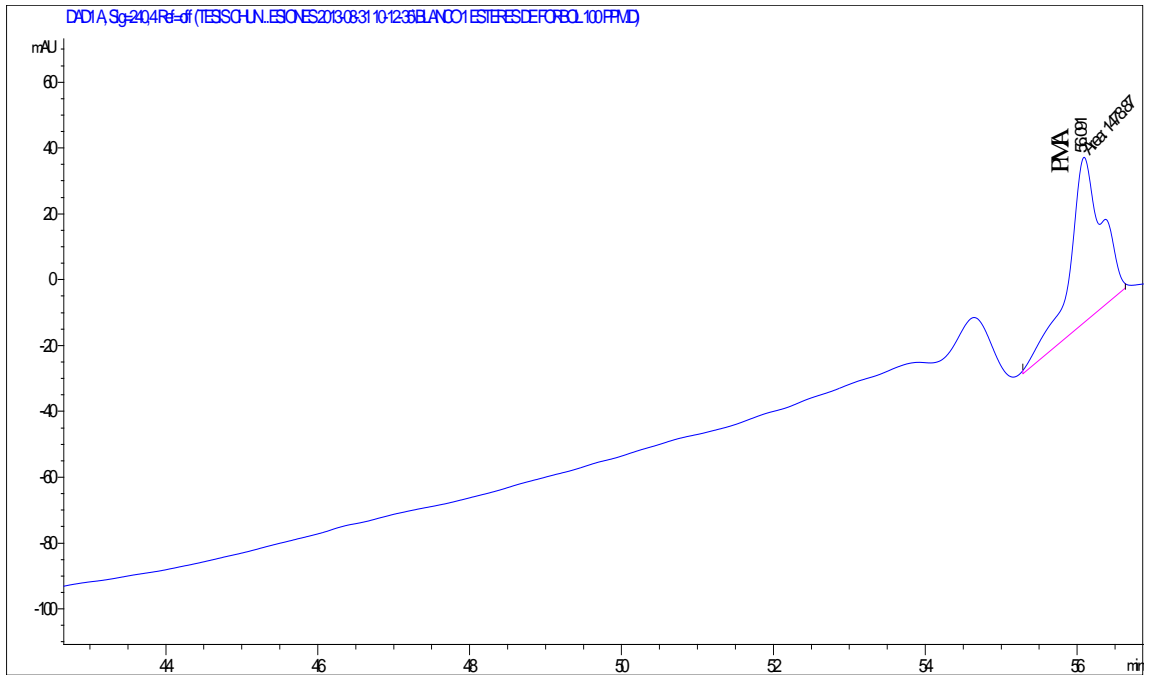
Sosa-Segura, M., M. Angulo-Escalante, J. Valdez-Torres, J. Heredia, T. Osuna-Enciso, R. Allende-Molar y B. Dave. 2012. Phenology, productivity, and chemical characterization of *Jatropha curcas* L. as tool for selecting non-toxic elite germplasm. African Journal of Biotechnology, 11(93):15988-15993.

Verdugo, A., M. Angulo, E. Salazar, I. Murillo y R. Vélez. 2010. Determinación de ésteres de forbol en germen de semillas de *Jatropha curcas* y *Jatropha platyphylla* colectadas en el estado de Sinaloa. CIAD (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo). Hermosillo, Sonora, México.

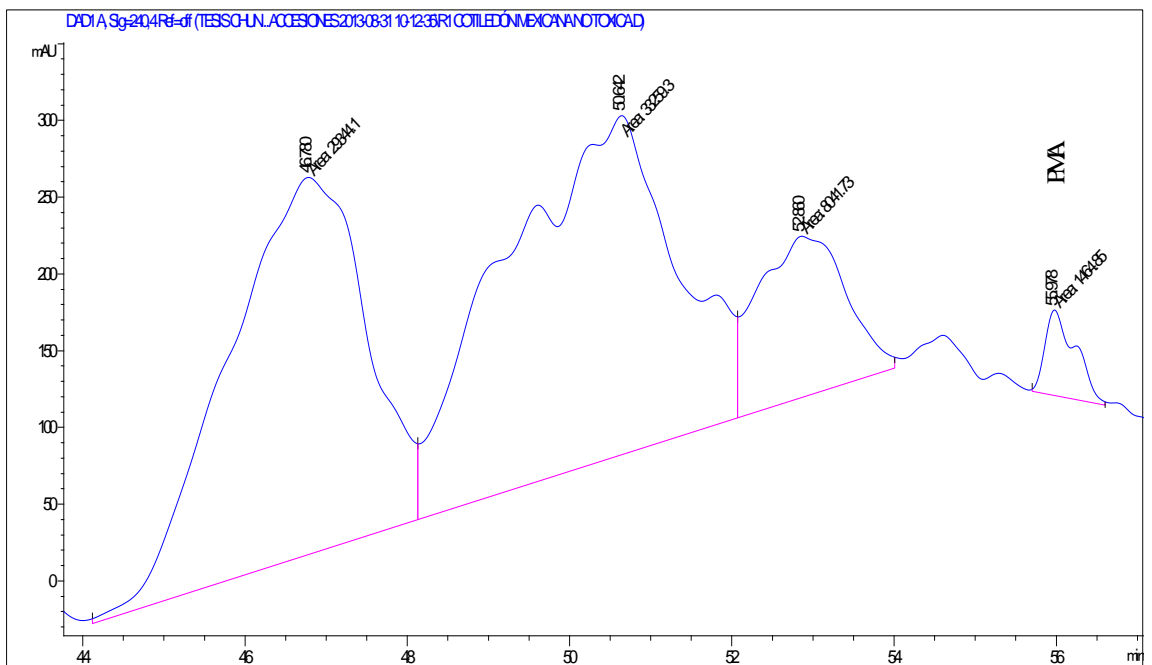
Vischi, M., S. Raranciuc y M. Baldini. 2013. Evaluation of genetic diversity between toxic and non toxic *Jatropha curcas* L. accessions using a set of simple sequence repeat (SSR) markers. African Journal of Biotechnology, 12(3): 265-274.

Wink, M. 1997. Phorbol Esters of *J. curcas*. Biological Activities and Potential. Applications. Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Heidelberg, Germany.

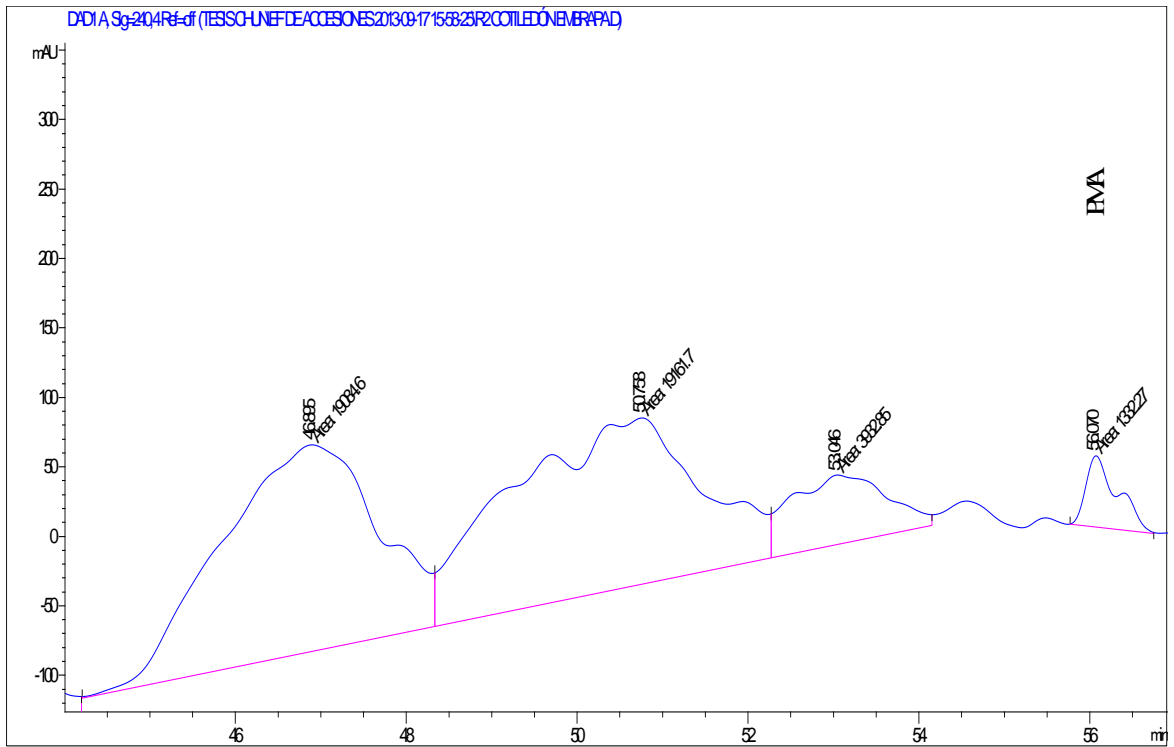
7. ANEXOS



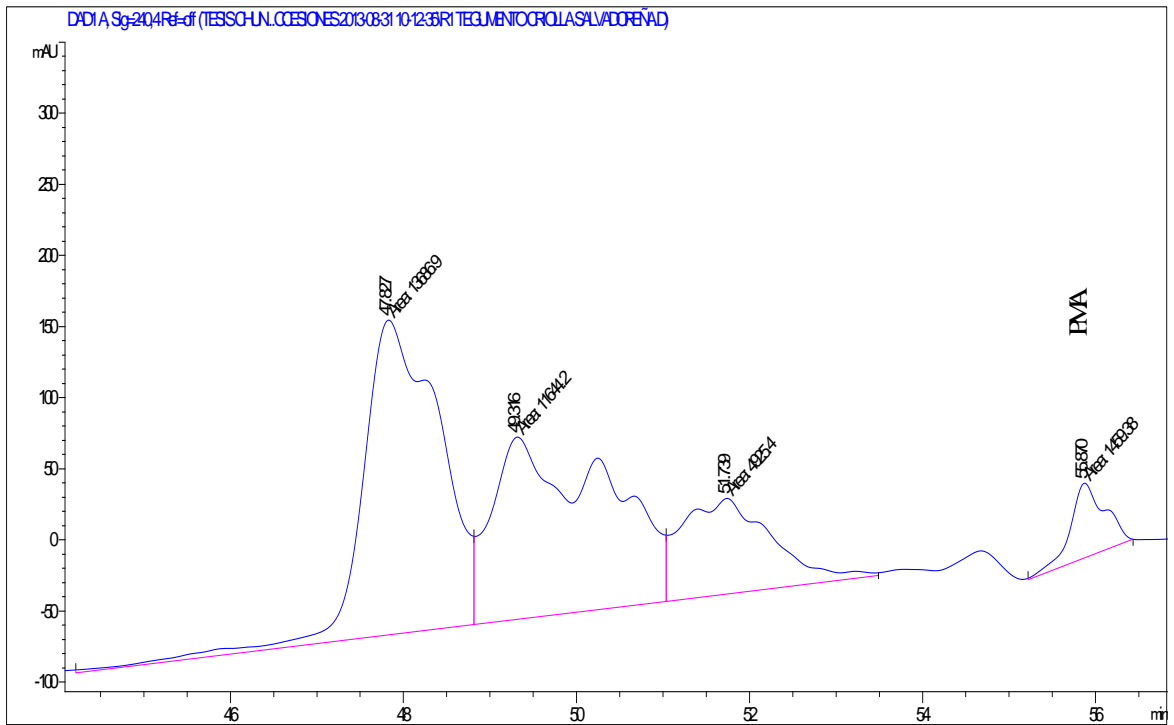
Anexo 1. Cromatograma de estándar interno, forbol-12-miristato 13-acetato (PMA).



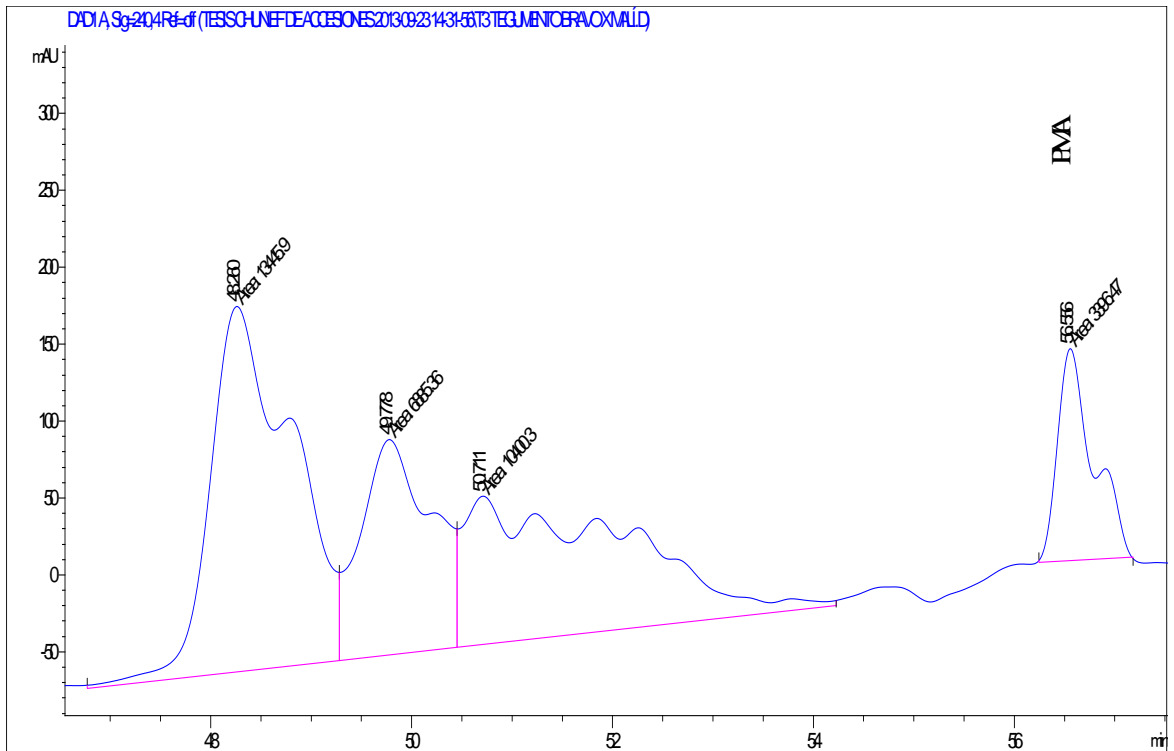
Anexo 2. Cromatograma de cotiledones de la accesión Mexicana no Tóxica.



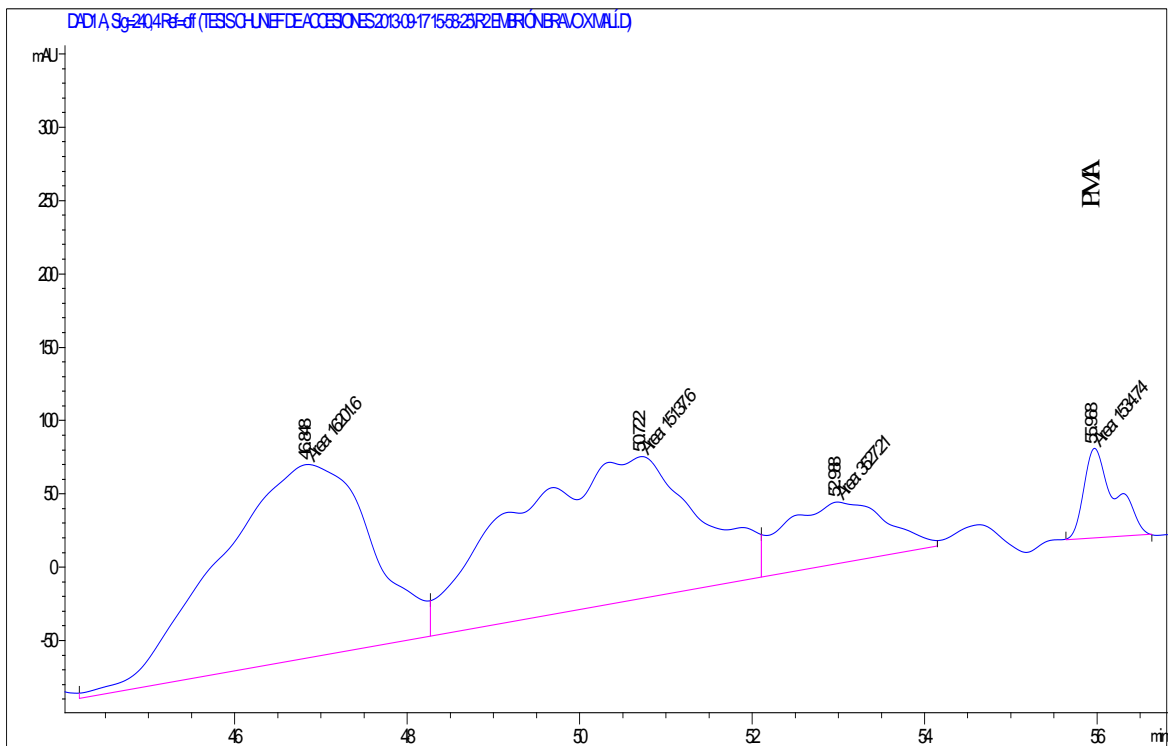
Anexo 3. Cromatograma de cotiledones de la accesión Embrapa.



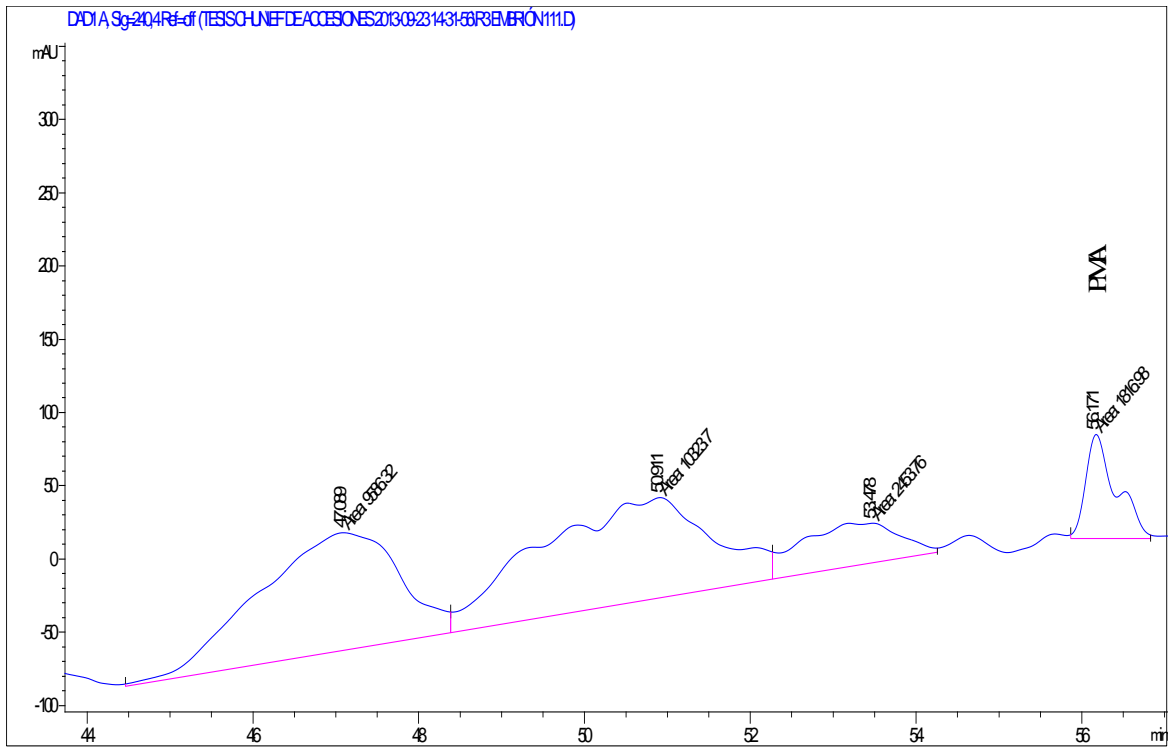
Anexo 4. Cromatograma de tegumento de la accesión Criolla Salvadoreña.



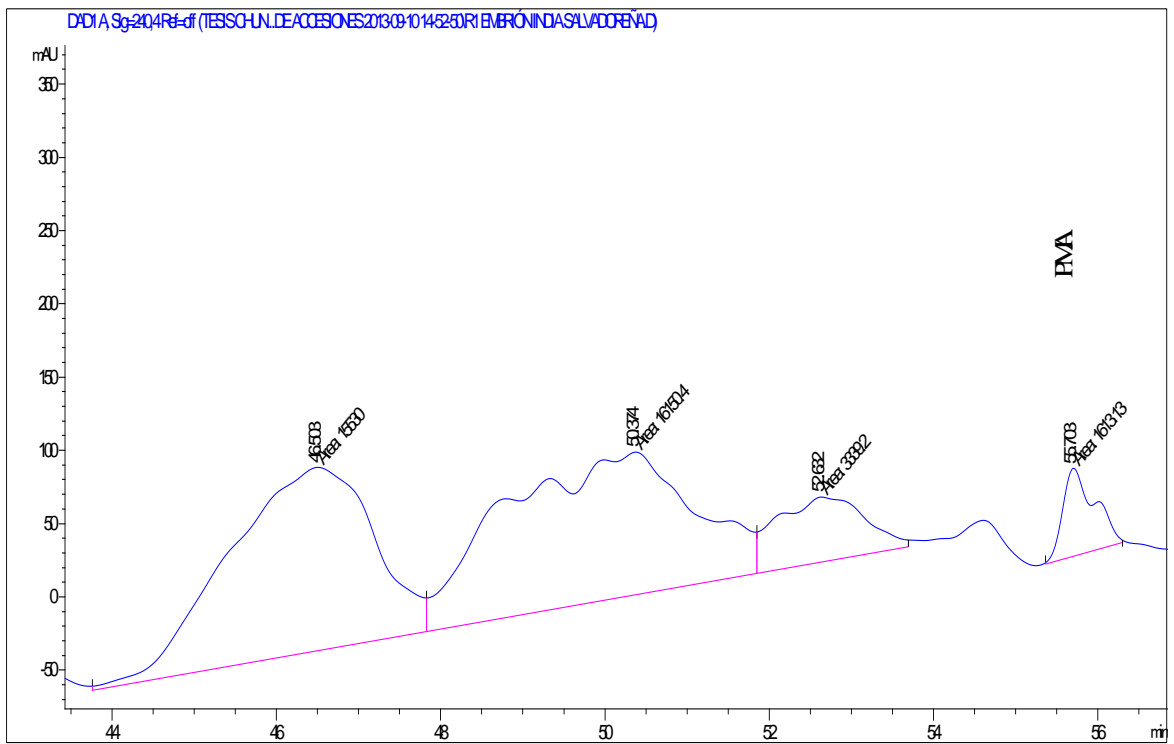
Anexo 5. Cromatograma de tegumento de la accesión Bravo x Malí.



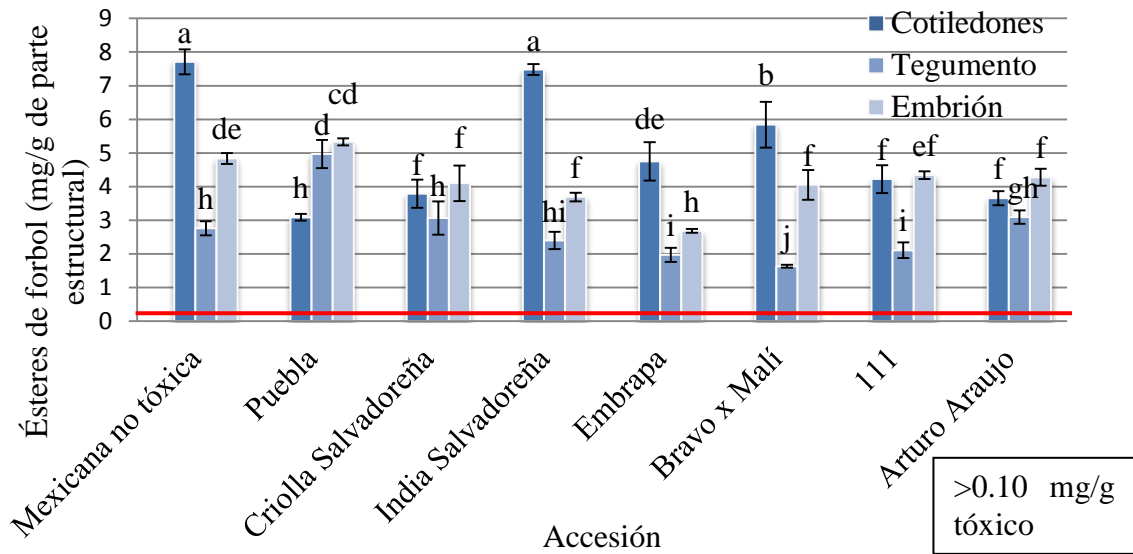
Anexo 6. Cromatograma de embrión de la accesión Bravo x Malí.



Anexo 7. Cromatograma de embrión de la accesión 111.



Anexo 8. Cromatograma de embrión de la accesión India Salvadoreña.



Anexo 9. Contenido de ésteres de forbol (mg/g de parte) en partes estructurales de semilla descascarada en ocho accesiones de *Jatropha curcas*.