

**Cuantificación de ésteres de forbol en la
semilla entera y sus componentes
estructurales de tres variedades de *Jatropha*
*curcas***

Ítalo César Sosa Hernández

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2012

ZAMORANO
DEPARTAMENTO DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Cuantificación de ésteres de forbol en la
semilla entera y sus componentes
estructurales de tres variedades 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:

Ítalo César Sosa Hernández

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2012

Cuantificación de ésteres de forbol en la semilla entera y sus componentes estructurales de tres variedades de *Jatropha curcas*

Presentado por:

Ítalo César Sosa Hernández

Aprobado:

Francisco Javier Bueso, Ph.D.
Asesor principal

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

Jorge Cardona, Ph.D.
Asesor

Raúl Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

RESUMEN

Sosa Hernández, I.C. 2012. Cuantificación de ésteres de forbol en la semilla entera y sus componentes estructurales de tres variedades de *Jatropha curcas*. Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. 23 p.

Los ésteres de forbol en la semilla de *Jatropha curcas* son diterpenos tóxicos, comúnmente conocidos como promotores de cáncer. El objetivo de este estudio fue comparar la cantidad de ésteres de forbol en la semilla de tres variedades (Cabo Verde, Hindú Salvadoreña y Criolla Mexicana) y la distribución en sus componentes estructurales (cotiledones, cáscara y embrión). La extracción de ésteres de forbol se realizó con una solución de hexano-isopropanol y se cuantificó el extracto por cromatografía líquida. Se utilizó un diseño completamente al azar con una prueba de separación de medias Tukey para determinar diferencias ($P < 0.05$) entre variedades. La variedad con mayor contenido de ésteres de forbol fue Cabo Verde con 2.57 ± 0.17 mg/g de semilla, seguida por la Hindú Salvadoreña con 0.89 ± 0.40 mg/g y la que menor toxicidad presentó fue la Criolla Mexicana con 0.60 ± 0.04 mg/g. El componente estructural que presentó mayor concentración de ésteres de forbol fueron los cotiledones de Cabo Verde con 0.39 ± 0.10 mg/g. No se encontraron diferencias estadísticas en el contenido de ésteres de forbol de los embriones de las tres variedades. Se determinó que la variedad más tóxica fue Cabo Verde. Según la literatura la variedad Criolla Mexicana es una variedad no tóxica, sin embargo en este experimento se encontraron ésteres de forbol. Se recomienda evaluar el efecto de la remoción del tegumento que recubre los cotiledones, en el contenido final de ésteres de forbol en la semilla de *Jatropha curcas*.

Palabras clave: Cabo Verde, cromatografía líquida, forbol 12-miristato 13-acetato.

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 semilla) de diferentes variedades <i>Jatropha curcas</i> del mundo.....	2
2. Diseño Experimental	4
3. Porcentaje de humedad en la semilla de tres variedades <i>Jatropha curcas</i>	8
4. Masa promedio (g) de las partes estructurales y de la semilla entera de tres variedades de <i>Jatropha curcas</i>	9
5. Resumen de ANDEVA del efecto de variedades en la concentración de ésteres de forbol.....	9
6. Contenido de ésteres de forbol (mg/g de semilla) en tres variedades de <i>Jatropha curcas</i>	10
7. Resumen de ANDEVA del efecto de factores en el contenido de ésteres de forbol.	11
8. Contenido de ésteres de forbol (mg/g de parte) en diferentes partes estructurales 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).....	6
 Anexos	 Página
1. Cromatograma de la semilla entera de la variedad Cabo Verde.	17
2. Cromatograma de la semilla entera de la variedad Hindú Salvadoreña.....	17
3. Cromatograma de la semilla entera de la variedad Criolla mexicana	18
4. Cromatograma de la semilla entera de la variedad Criolla mexicana	18

5.	Cromatograma de los cotiledones de la variedad Cabo Verde.....	19
6.	Cromatograma de los cotiledones de la variedad Hindú Salvadoreña.	19
7.	Cromatograma de los cotiledones de la variedad Criolla Mexicana.	20
8.	Cromatograma de la cáscara de la variedad Cabo Verde.	20
9.	Cromatograma de la cáscara de la variedad Criolla Mexicana.	21
10.	Cromatograma de la cáscara de la variedad Criolla Mexicana.	21
11.	Cromatograma del embrión de la variedad Hindú Salvadoreña.	22
12.	Cromatograma del embrión de la variedad Criolla Mexicana.	22
13.	Flujo de proceso de extracción de ésteres de forbol.....	23

1. INTRODUCCIÓN

La *Jatropha curcas* es un arbusto originario de Brasil, perteneciente a la familia de las Euforbiáceas. Se puede encontrar en zonas que están a nivel del mar y a una altitud de 1500 msnm. Es una planta monoica, alcanza una altura de hasta cinco metros según las condiciones climáticas y del suelo. El aceite extraído de la semilla tiene un color amarillo y rojizo. Su viscosidad absoluta, a 35 y 100°C, está por encima de la del aceite de oliva, lo cual le confiere habilidades apreciables como lubricante (IICA 1989). El aceite es utilizado para la elaboración de biodiesel. Sin embargo contiene 1-2% de ésteres de forbol que lo hace desagradable y tóxico si estos no son completamente removidos. La torta que resulta de la extracción del aceite es comúnmente utilizada para fertilización pero tiene alto potencial para uso en la alimentación de ganado, ya que es alta en proteína (50-58%) (Wink *et al.* 1997).

La toxicidad de la semilla puede ser causada por varios componentes incluyendo lectinas, saponinas, inhibidores de proteasas, ácido curcalónico y ésteres de forbol. De los cuales las lectinas y los inhibidores de proteasas son vulnerables a tratamientos térmicos y los ésteres de forbol y saponinas presentan mayor resistencia a altas temperaturas (160°C) (Aregheore *et al.* 2003). De estos el que más contribuye a la toxicidad de la semilla, el aceite y la torta son los ésteres de forbol (Wink *et al.* 1997). (Martinez-Herrera *et al.* 2006) establecieron que la variedad Mexicana era no tóxica con un valor de ésteres de forbol de 0.11 mg/g de semilla y la variedad Cabo Verde se clasificó como tóxica con 2.7 mg/g de semilla. Han sido caracterizados seis diferentes tipos de ésteres de forbol. Todos ellos con esqueleto básico de tiglane con cuatro anillos, la hidroxilación de esta estructura en diferentes posiciones y la unión de ésteres de varios grupos de ácidos resultan en la formación de los ésteres de forbol (Goel *et al.* 2007).

La frecuente exposición a los ésteres de forbol puede estimular la formación de tumores cancerígenos (Hirota *et al.* 1988), debido a que estos activan la proteína quinasa (PKC), la cual juega un papel importante en el proceso de la transducción de señales, la diferenciación y el control del crecimiento celular (King *et al.* 2009). Según (Goel *et al.* 2007) durante un proceso normal de transducción de señales la PKC es activada por diacilglicerol el cual es rápidamente hidrolizado. Sin embargo los ésteres de forbol actúan como análogos del diacilglicerol y son activadores más fuertes de la PKC, que es difícilmente metabolizada por las células. Esto desencadena la proliferación de células amorfas o hiperplasia, que es comúnmente conocido como tumores cancerígenos.

A pesar del contenido de ésteres de forbol y del daño que estos pueden ocasionar a las personas, la semilla de *Jatropha curcas* es rica en ácidos grasos, lo que hace que el aceite extraído, sea apto para la producción de biodiesel. Las semillas de *Jatropha curcas* sin cáscara poseen entre 43 – 59% de aceite. Está compuesta por 80% de ácidos grasos

insaturados. El aceite de *Jatropha curcas* tiene mayor cantidad de ácidos grasos en comparación a otros aceites vegetales. Establecen un predominio los monoinsaturados (45.4%) frente a los poli-insaturados (33%) y saturados (21.6%). El ácido oleico es el principal ácido graso representa el 44.7% siendo superior en comparación al registrado en aceite de palma, girasol y soya (Akbar *et al.* 2009). El Cuadro 1 muestra diferentes variedades de *Jatropha curcas* y su contenido de ésteres de forbol.

Cuadro 1. Contenido de ésteres de forbol (mg/g de semilla) de diferentes variedades *Jatropha curcas* del mundo.

Variedad	Ésteres de forbol (mg/g de semilla)
Cabo Verde	2.70
Nicaragua	2.17
Nigeria	2.30
Tailandia	0.21 – 0.47
El Salvador	1.23
Egipto	4.40
Vietnam	5.60

Fuentes: Güzbit *et al.* 2007, Makkar *et al.* 1998, Saetae y Suntornsuk 2010, Basha *et al.* 2009.

La elaboración y detoxificación de biodiesel a partir de *Jatropha curcas* será uno de los procesos que se ejecutarán en la planta piloto de biocombustibles de Zamorano. Para que el proceso de detoxificación de aceite sea eficiente es necesaria la cuantificación de ésteres de forbol. Por tanto este estudio se enfocará en la cuantificación de ésteres de forbol de la semilla entera de la cáscara, el embrión y los cotiledones de las tres variedades potenciales como materias primas: Cabo Verde, Hindú Salvadoreña, y Criolla Mexicana. En este sentido los objetivos planteados fueron:

- Clasificar las variedades Cabo Verde, Hindú Salvadoreña y Criolla Mexicana como tóxicas o no tóxicas, de acuerdo al contenido de ésteres de forbol.
- Comparar el contenido total de ésteres de forbol en la semilla de tres variedades de *Jatropha curcas*.
- Comparar el contenido total de ésteres de forbol en los componentes estructurales de la semilla de tres variedades de *Jatropha curcas*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se ejecutó en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano (LAAZ), donde se desarrolló la extracción y posteriormente la cuantificación de ésteres de forbol. Está localizado en el campus de la Escuela Agrícola Panamericana, En el departamento de Agroindustria Alimentaria, 32 km al Este de Tegucigalpa, Honduras. Las semillas de la variedad Cabo Verde fueron obtenidas del proyecto de Syngenta en Zamorano, de la cosecha del 2011. Hindú Salvadoreña se consiguió con AGROIPSA ubicada en Choluteca y fue cosechada el 2011. La variedad Criolla Mexicana fue cosechada en el 2009 y fue cultivada en San Salvador, El Salvador.

Materiales.

- Forbol 12-miristato 13-acetato $\geq 99\%$ (TLC) polvo, P8139, Sigma Aldrich®
- Acetonitrilo para cromatografía líquida LiChrosolv, AX0145, Merck®
- Hexano CHROMOMSOLV, Grado HPLC $\geq 99.99\%$, 650552, Sigma Aldrich®
- Isopropanol CHROMOSOLV Plus, Grado HPLC $\geq 99.99\%$, 190764, Sigma Aldrich®
- Ácido Fórmico grado reactivo, $\geq 95\%$, F0507, Sigma Aldrich®
- Metanol grado HPLC $\geq 99\%$, 106007400 Merck
- Nitrógeno UHP, Infra
- Tubos cónicos de borosilicato Pyrex de 14 ml
- Pipetas, AS DIN, Tol. ± 0.03 , Marienfield de 5 y 10 ml
- Filtros para jeringa 0.45 μm PTFE (Polietraflouroetileno)
- Viales Agilent Technologies de 1.5 ml.

Equipo.

- HPLC Agilent Technologies, Serie 1100/1200
- Columna Phenomenex Luna 5u C18 100A 150 x 2mm 5 micrón, P/No. 00F-4232-B0
- Centrifuga IEC, Modelo K
- Dispensador de gas Flexivap Work Station, 100A YH12, Glass-Col®
- Vortex Fisher, Genie 2, Cat No. 12-812
- Molino de laboratorio, Thomas-Wiley
- Procesador de Alimentos Kitchen Aid, KFP 600
- Balanza Mettler AE 200
- Micropipeta Evol, SGE Analytical Science 5011^a
- Microcentrifuga Eppendorf, Modelo 5418

Diseño del estudio. Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3×3 . Como parte de arreglo factorial se evaluaron tres variedades (Cabo Verde, Hindú Salvadoreña, y Criolla Mexicana) y tres partes estructurales (cáscara, embrión y cotiledones), para encontrar diferencias significativas entre las partes estructurales de cada variedad se utilizó LSMeans como prueba de separación de medias. Para determinar si hubo diferencias significativas entre las variedades se utilizó un diseño completamente al azar con la prueba Tukey como separación de medias. En total se analizaron 12 tratamientos. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento lo que resultó en 36 unidades experimentales, las cuales se evaluaron por duplicado.

Cuadro 2. Diseño Experimental

Variedades		Partes Estructurales		
	Semilla Entera	Cáscara	Embrión	Cotiledones
Cabo Verde	Repetición 1	Repetición 1	Repetición 1	Repetición 1
	Repetición 2	Repetición 2	Repetición 2	Repetición 2
	Repetición 3	Repetición 3	Repetición 3	Repetición 3
Hindú Salvadoreña	Repetición 1	Repetición 1	Repetición 1	Repetición 1
	Repetición 2	Repetición 2	Repetición 2	Repetición 2
	Repetición 3	Repetición 3	Repetición 3	Repetición 3
Criolla Mexicana	Repetición 1	Repetición 1	Repetición 1	Repetición 1
	Repetición 2	Repetición 2	Repetición 2	Repetición 2
	Repetición 3	Repetición 3	Repetición 3	Repetición 3

Separación de semilla de *Jatropha curcas*. La separación de los componentes botánicos de la semilla se realizó manualmente utilizando pinzas. Para remover la testa se utilizó una mano de mortero. Posteriormente se golpeó suavemente hasta que se produjo la ruptura de la testa. Luego con una pinza se abrió la semilla, se separó los dos cotiledones y se removi6 el embri6n.

Extracción de ésteres de forbol. La extracción se realizó mediante el método descrito en la figura 1 el cual fue desarrollado por (King 2009). Cada unidad experimental se realizó por duplicado y para cada tanda se usaron dos blancos, los cuales fueron expuestos al mismo proceso de extracción de la muestras.

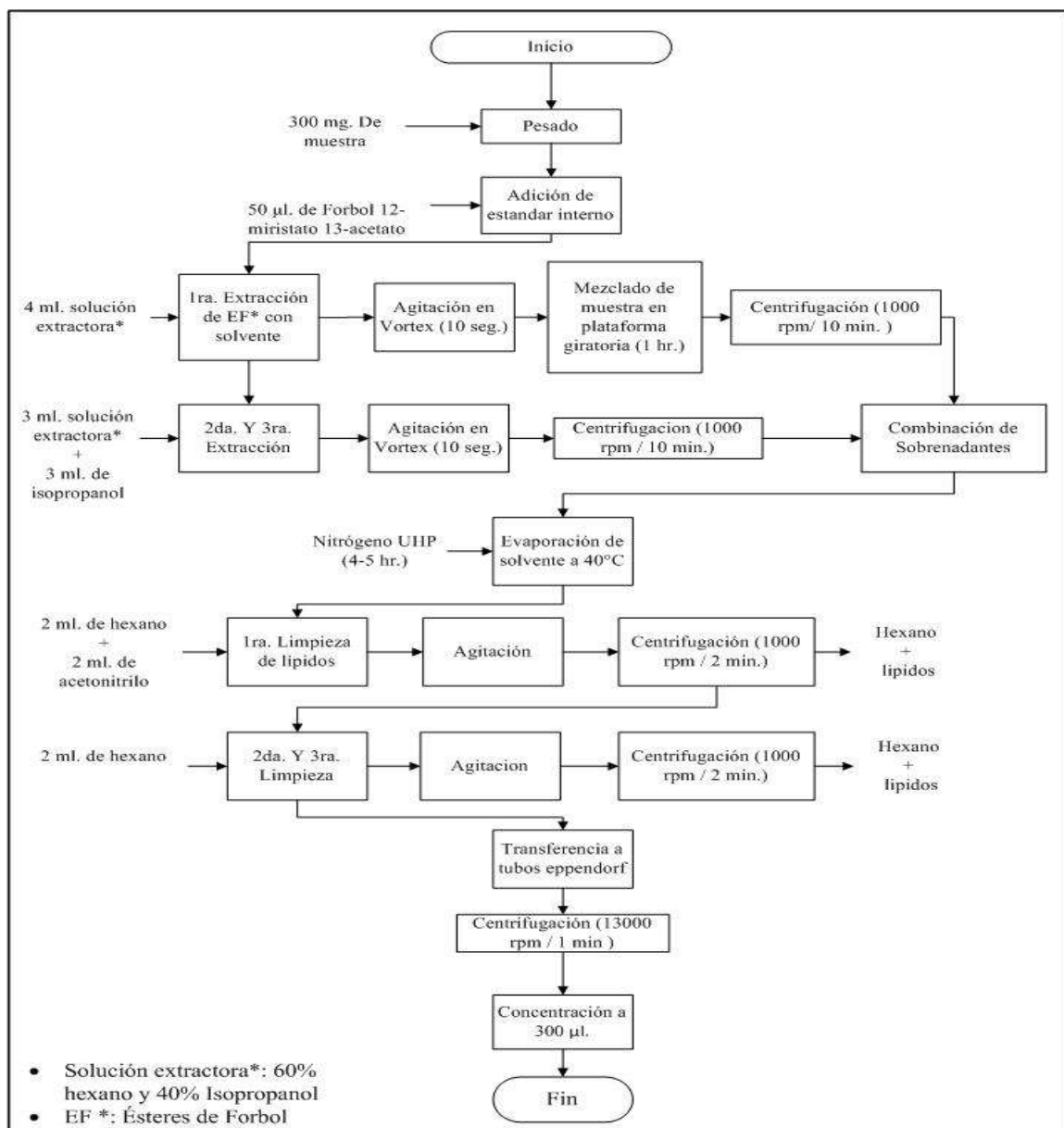


Figura 1. Diagrama de flujo de extracción de ésteres de forbol.

Se molió la semilla en un procesador de alimentos, el molido se realizó por 10 segundos, repitiéndolo 4 veces. Posteriormente se pesó 300 mg de muestra, en tubos cónicos de borosilicato de vidrio. Cada muestra se pesó por duplicado. Se añadió 50µl de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), en una relación de 1 mg PMA/ ml MeOH, como estándar interno. Se extrajo añadiendo 4 ml de una solución de hexano-isopropanol (3:2).

Las muestras se llevaron al vortex por 10 segundos y luego se agitaron en una plataforma rotatoria por una hora. Luego se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos y se extrajo el sobrenadante. Se realizaron dos extracciones más utilizando 3 ml de la solución hexano-isopropanol (3:2) y 3 ml de isopropanol, luego se volvió a llevar al vortex por 10 segundos y se centrifugó por 10 minutos. Se combinaron los tres sobrenadantes extraídos

en un tubo de ensayo. Luego se removió el solvente mediante un flujo de nitrógeno a una temperatura de 40°C durante 3 – 4 horas.

El extracto se disolvió en 2 ml de acetonitrilo, se mezcló con la mano y luego se añadió 2 ml de hexano. Posteriormente se llevó al vortex por 10 segundos. Se centrifugó la muestra a 1000 RPM durante 2 minutos y hubo una separación de fases, se removió la fase de hexano (fase superior) y se desechó. Posterior a esto, se lavó dos veces más con 2 ml de hexano y se centrifugó a 1000 RPM por 2 minutos. Se transfirió la fase de acetonitrilo a microtubos eppendorf y se centrifugó a 13000 RPM durante 1 minuto. Se hizo una filtración utilizando filtros para jeringa de 0.45 μ M PTFE (Millex®-LH). Se concentró el extracto a 300 μ l, a una temperatura de 40°C, utilizando un Flexivap Work Station®.

Análisis cromatográfico. Se utilizaron los parámetros establecidos por King (2010). Se empleó un HPLC marca Agilent serie 1100/1200, con una columna Phenomenex Luna 5 μ C18, 100A 150 x 2mm, 5 micrón. Para la fase móvil se utilizaron dos solventes, Agua con 0.1% de ácido fórmico (solvente A) y acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico (solvente B), a un flujo de 0.5 ml/min. Se preparó un vial con 50% 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. La cuantificación se realizó con un detector de diodos (DAD 1100) a las longitudes de onda de 240 y 280 nm. Para calcular la cantidad ésteres de forbol se utilizó la ecuación 1. Para identificar los ésteres de forbol y el estándar interno (PMA) se utilizaron los tiempos de elusión de la figura 2.

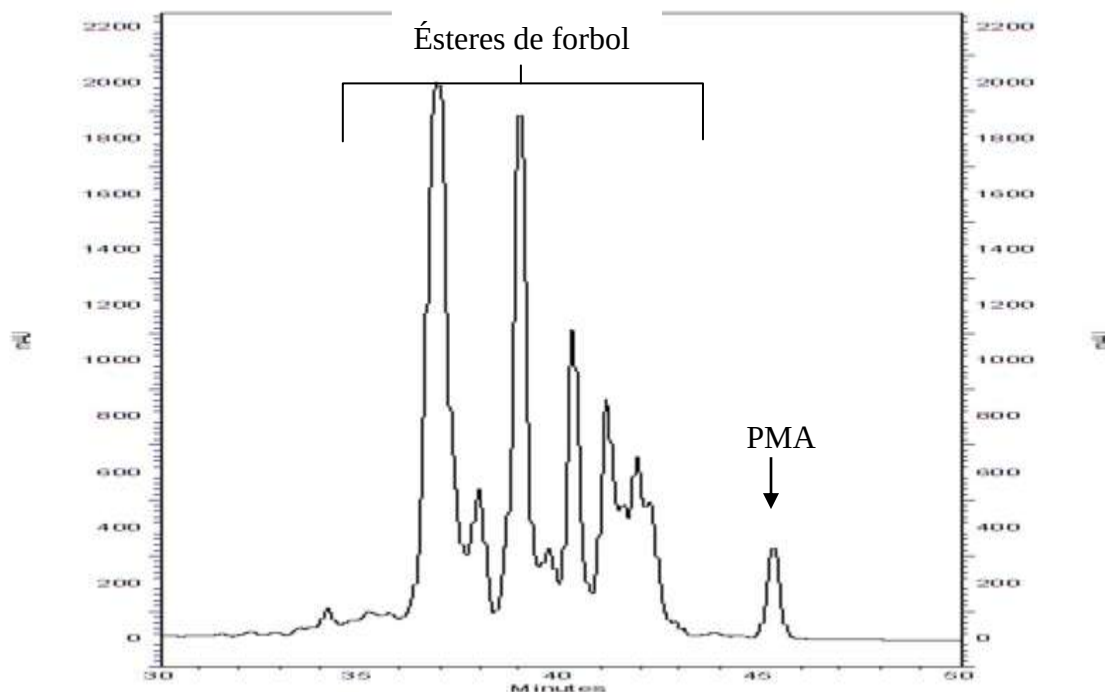


Figura 2. Cromatograma de ésteres de forbol y forbol-12-miristato 13-acetato (PMA).
Fuente: King (2009)

Masa de EF = _____ [1]

AOAC 952.08. Este método se utilizó para determinar de humedad en la semilla entera de las variedades: Cabo Verde, Criolla Mexicana e Hindú Salvadoreña. La medición de cada uno de los tratamientos se realizó tres veces por duplicado. Los cálculos de humedad se realizaron mediante la ecuación 2 y los resultados se expresaron en porcentajes.

_____ [2]

Los resultados obtenidos al final de la extracción y la cuantificación por HPLC se expresaron en mg/g de semilla estos se calcularon en base seca utilizando el porcentaje de materia seca de cada variedad. 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. Luego se pesó individualmente la semilla entera, la cáscara, el embrión y los cotiledones, para expresar los resultados en mg/g de cada parte. Para calcular los resultados en base seca se usó la ecuación 3 y para calcular la cantidad real de ésteres de forbol por parte se utilizó la ecuación 4.

_____ [3]

_____ [4]

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Humedad. En el Cuadro 3 se observó que no existieron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el porcentaje de humedad entre las tres variedades (Cabo Verde, Hindú Salvadoreña y Criolla Mexicana). El valor promedio de humedad de una semilla de *Jatropha curcas* está entre 3-7% (Jones y Miller 1992). Se encontró que los resultados obtenidos a partir del análisis realizado según el método AOAA 952.08, tuvieron un ligero incremento en comparación a lo reportado por la literatura. Según Cayón (1996), el contenido de humedad de un grano se ve afectado por varios factores: madurez del grano, temperatura y % de humedad relativa de almacenamiento; lo que indica que las condiciones de almacenamiento de la semilla no fueron óptimas, causando un leve incremento en la humedad, esto ocasionó que el contenido de materia seca disminuyera, lo que se confirma con los resultados reportados por Gübitz *et al.* (1997), ya que encontraron que Cabo Verde y Criolla Mexicana tienen 96.6 y 94.2%, respectivamente.

Cuadro 3. Porcentaje de humedad en la semilla de tres variedades *Jatropha curcas*.

Variedad	Humedad (%)	Coefficiente de Variación (%)	Materia Seca (%) ¹
	Media $\pm$ D.E. ²		
Cabo Verde	7.44 ^a $\pm$ 0.19	2.50	92.56
Hindú Salvadoreña	8.20 ^a $\pm$ 1.75	21.30	91.80
Criolla Mexicana	7.34 ^a $\pm$ 0.29	4.07	92.66

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

¹Materia seca, se calculó por diferencia en base a 100%

²D.E.= Desviación Estándar

Se puede apreciar en el Cuadro 4, las diferentes masas de las variedades Cabo Verde, Hindú Salvadoreña y Criolla Mexicana las cuales se necesitaron para poder calcular el valor real de ésteres de forbol en cada componente de la semilla. El valor promedio para la masa de una semilla de *Jatropha curcas* de la variedad Criolla Mexicana está alrededor de 0.72 g (Martínez-Herrera *et al.* 2006), además sugieren que la precipitación anual de la región puede afectar directamente la masa de la semilla. Makkar *et al.* (2008) concordaron con la masa de la variedad Criolla Mexicana, ya que propusieron que para genotipos no tóxicos el peso anda alrededor de 0.72 g y para genotipos tóxicos 0.78 g.

Las variedades Criolla Mexicana y Cabo Verde son clasificadas como variedades no tóxicas y tóxicas respectivamente (Makkar *et al.* 1998). En este análisis la masa de Criolla Mexicana en la semilla entera fue superior a lo reportado por Makkar *et al.* (2008).

Previas investigaciones han reportado masas similares entre las variedades Cabo Verde e Hindú Salvadoreña (Makkar *et al.* 2008). Dentro de la semilla, la parte estructural que tuvo mayor masa fueron los cotiledones, seguido por la cáscara. El Embrión fue el que menor masa reportó en todas las variedades de *Jatropha curcas*.

Cuadro 4. Masa promedio (g) de las partes estructurales y de la semilla entera de tres variedades de *Jatropha curcas*.

Variedad	Parte Estructural	Masa (g)	Porcentaje de distribución (%)
		Media $\pm$ D.E. ¹	
Cabo Verde	Semilla Entera	0.76 $\pm$ 0.07	100
	Cotiledones	0.58 $\pm$ 0.06	76.31
	Cáscara	0.28 $\pm$ 0.04	36.80
	Embrión	0.004 $\pm$ 0.0002	0.05
Hindú Salvadoreña	Semilla Entera	0.75 $\pm$ 0.10	100
	Cotiledones	0.58 $\pm$ 0.63	77
	Cáscara	0.32 $\pm$ 0.00	42.61
	Embrión	0.004 $\pm$ 0.0004	0.05
Criolla Mexicana	Semilla Entera	0.91 $\pm$ 0.10	100
	Cotiledones	0.51 $\pm$ 0.01	56.04
	Cáscara	0.36 $\pm$ 0.04	39.5
	Embrión	0.004 $\pm$ 0.0006	0.05

¹D.E.= Desviación estándar

Ésteres de forbol en la semilla entera de *Jatropha curcas*. El Cuadro 5 muestra que existieron diferencias entre las variedades ya que se obtuvo un alto Valor F. La probabilidad del valor F fue menor a 0.05, por tanto se rechazó la hipótesis nula la cual establecía que las variedades evaluadas tenían el mismo contenido de ésteres de forbol.

Cuadro 5. Resumen de ANDEVA del efecto de variedades en la concentración de ésteres de forbol.

Fuente de variación	Valor F	Pr > F ¹
Variedades	285.39	< .0001

¹ Pr<F= Valores menores a 0.05 tienen diferencias significativas dentro de la misma fuente de variación.

El Cuadro 4 mostró que existieron diferencias significativas ($P<0.05$) en el contenido de ésteres de forbol entre Cabo Verde, Criolla Mexicana e Hindú Salvadoreña. Se encontraron ésteres de forbol en mayor concentración en Cabo Verde con un contenido de estos similares a los reportados por Makkar *et al.* (1998), que sugieren que la variedad Cabo Verde y Criolla Mexicana tienen 2.7 y 0.11 mg/g de semilla respectivamente.

En la variedad Criolla Mexicana se encontró el nivel más bajo de ésteres de forbol, Lo que concuerda con Güzbit *et al.* (1997), ya que reportaron que Cabo Verde tiene mayor concentración de ésteres de forbol que Criolla Mexicana. Sin embargo, la concentración de ésteres de forbol que se obtuvo para Criolla Mexicana es superior a lo reportado por Makkar *et al.* (1998). Martínez-Herrera *et al.* (2006) realizaron un estudio en el cual compararon las características tóxicas de Criolla Mexicana en cuatro diferentes provincias de México y encontraron que la concentración de ésteres de forbol tiene un alto grado de variación entre provincias. Comparando con los resultados con el Cuadro 1 la variedad Cabo Verde tuvo un contenido de ésteres de forbol intermedio. Hindú Salvadoreña y Criolla Mexicana tuvieron un valor por encima del límite inferior que es 0.11 mg/g de semilla.

Cuadro 6. Contenido de ésteres de forbol (mg/g de semilla) en tres variedades de *Jatropha curcas*.

Variedad	Ésteres de forbol (mg/g de semilla) ¹	Coefficiente de variación (%)
	Media ² $\pm$ DE ³	
Cabo Verde	2.57 ^a $\pm$ 0.17	6.80
Hindú Salvadoreña	0.89 ^b $\pm$ 0.04	5.30
Criolla Mexicana	0.60 ^c $\pm$ 0.04	8.00

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

¹Equivalente a Forbol 12-miristato 13-acetato.

²Medias en base seca

³DE=Desviación estándar.

Ésteres de forbol en partes estructurales de la semilla de *Jatropha curcas*. Se determinó que existieron diferencias estadísticas en el contenido de ésteres de forbol en las variedades y en las partes estructurales ($P<0.05$). De la misma manera en el Cuadro 7 se encontró que el contenido de ésteres de forbol en las partes estructurales se vio afectado por la variedad.

Cuadro 7. Resumen de ANDEVA del efecto de factores en el contenido de ésteres de forbol.

Fuente de variación	Valor F	Pr > F ¹
Variedades	285.39	< .0001
Parte	1399.06	< .0001
Variedad × Parte	81.53	< .0001

¹Pr<F = Valores menores a 0.05 tienen interacción entre tratamientos y ésteres de forbol.

En el Cuadro 8 se encontró que las partes de la semilla con mayor cantidad de ésteres de forbol fueron los cotiledones, seguidos por la cascara y el embrión. Dentro de estos, el tratamiento que tuvo mayor cantidad de ésteres fueron los cotiledones de Cabo Verde, lo que concuerda con He *et al.* (2011). De la misma manera se comprobó que Criolla Mexicana tuvo menor contenido de ésteres, ya que en sus tres partes se encontró contenido menor de ésteres de forbol en comparación a las otras variedades evaluadas.

Se encontró diferencias estadísticas para todos los tratamientos, a excepción de la cáscara de Hindú Salvadoreña y Criolla Mexicana y los embriones de las tres variedades. Según Graham (2008) la cáscara de una semilla de *Jatropha curcas* puede tener alrededor de 0.33 ± 0.11 mg/g. Dentro de los tratamientos de cáscara, la media más cercana a este valor fue la de Cabo Verde. Sin embargo Saetae y Suntornsuk (2010) evaluaron el contenido de ésteres de forbol en *Jatropha curcas* en cuatro provincias de Tailandia y concluyeron que en la cáscara de la semilla se puede encontrar de 0.08 a 0.10 mg/ g de semilla lo que concuerda con los resultados de la cascara de Criolla Mexicana.

No se encontró diferencias significativas en los embriones de las tres variedades. Verdugo *et al.* (2010) reportaron que el contenido de ésteres de forbol en el embrión es de 0.18 a 0.33 mg/g de semilla, pero He *et al.* (2011) encontraron que el embrión de una semilla de *Jatropha curcas* puede tener <0.03 mg/g de semilla, lo que concuerda con los resultados obtenidos.

Cuadro 8. Contenido de ésteres de forbol (mg/g de parte) en diferentes partes estructurales de *Jatropha curcas*.

Tratamiento	Ésteres de forbol (mg/g de unidad) ¹	Coeficiente de Variación (%)
	Media ² ± D.E. ³	
Cabo Verde cotiledones	0.39 ^a ± 0.01	2.6
Hindú Salvadoreña cotiledones	0.33 ^b ± 0.02	6.7
Cabo Verde cáscara	0.20 ^c ± 0.003	1.8
Hindú Salvadoreña cáscara	0.18 ^c ± 0.01	5.6
Criolla Mexicana cotiledones	0.16 ^d ± 0.02	13.0
Criolla Mexicana cáscara	0.10 ^e ± 0.006	6.0
Cabo Verde embrión	0.008 ^f ± 0.0004	4.6
Hindú Salvadoreña embrión	0.007 ^f ± 0.0002	3.7
Criolla Mexicana embrión	0.005 ^f ± 0.0005	10.2

^{abc}Medias con diferente letra en la misma columna indica que hay 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 tres variedades evaluadas (Cabo Verde, Criolla Mexicana e Hindú Salvadoreña) fueron tóxicas.
- La variedad con mayor contenido de ésteres de forbol, fue la Cabo Verde seguida por la Hindú Salvadoreña.
- Los cotiledones fueron la parte estructural de la semilla que presentaron mayor contenido de ésteres de forbol en las tres variedades de *Jatropha curcas*.

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar el efecto de la remoción del tegumento que recubre los cotiledones, en el contenido final de ésteres de forbol en la semilla de *Jatropha curcas*.
- Cuantificar la cantidad de ésteres de forbol de diferentes regiones de Honduras para evaluar si la localidad y las condiciones climáticas afectan el contenido de estos.
- Es necesaria la cuantificación de ésteres de forbol de todas las variedades 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 los niveles de ésteres de forbol antes y después de un proceso de refinamiento de aceite extraído a partir de semilla de *Jatropha curcas* para evaluar si este proceso causa una reducción significativa 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.
- La cuantificación de ésteres de forbol antes y después de un proceso de transesterificación, ayudaría a determinar si este proceso reduce la toxicidad del biodiesel.

6. LITERATURA CITADA

Akbar, E., Z. Yaakub, S.K. Kamarudin, M. Ismail y J. Salimon. 2009. Characteristics and composition of *Jatropha curcas* oil seed from Malaysia and its potential as biodiesel Feedstock. European Journal of Scientific Research, 29.

Aregheore, E.M., K. Becker y H. Makkar. 2003. Detoxification of a toxic variety of *Jatropha curcas* using heat and chemical treatments, and preliminary nutritional evaluation with rats. Journal of Natural Science, 21: 50-56.

Basha, S.D., G. Francis, H. Makkar, K. Becker y M. Sujatha. 2009, A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas*. germplasm from different countries. Plant Science Journal, 176: 812-823.

Cayón, G. 1996. Ecofisiología de la palma de aceite *Eleais guineensis*, Primer curso internacional de palma de aceite. Cenipalma, Bogota. p 38 – 54.

Goel, G., H. Makkar, G. Francis y K. Becker. 2007. Phorbol esters: structure, biological activity and toxicity in animals. International Journal of Toxicology, 26: 279-288.

Graham, I. 2008. Towards the development of new *Jatropha curcas* varieties: Molecular and biochemical analysis of toxic and non-toxic lines. International Consultation on Pro-poor *Jatropha* Development. Roma, Italia.

Gübitz, G., M. Mittelbach y M. Trabi. 1997. Biofuels and industrial products from *Jatropha curcas*. Desarrollado del Symposium “*Jatropha 97*”. Managua, Nicaragua.

Gübitz, G., M. Mittelbach y M. Trabi. 1999. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. Journal of Bioresource Technology, 67: 73-82.

He, W., A. King, M. Awais, J. Cuevas, D. Ramiarmanana y I. Graham. 2011. Analysis of seed phorbol ester and curcumin content together with genetic diversity in multiple provenances of *Jatropha curcas* from Madagascar and Mexico. Plant Physiology and Biochemistry, 49: 1183-1190.

Hirota, M., M. Suttajit, H. Sugori, Y. Endo, K. Shudo, V. Wongochai, E. Heckcer y H. Fujiki. 1988. A new tumor promoter from the seed oil of *Jatropha curcas* L., an intramolecular diester of 12-Deoxy-16-hydroxyphorbol. Cancer Research Journal, 48: 5800-5804.

IICA. 1989. Compendio de Agronomía, editado por el Instituto Interamericano de Corporación para la Agricultura y Ministerio de Asuntos Extranjeros de Francia – San Jose, Costa Rica.

Jones, N. y J.H. Miller. 1992. *Jatropha curcas*, A multipurpose species for problematic sites. World Bank, Washington DC, USA, ASTAG Technical papers – Land resources 1, 12 pp.

King, A., W. He, J. Cuevas, M. Freudenberger, D. Raimaramana e I. Graham. 2009. Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. Journal of Experimental Botany, Vol. 60, 10: 2897-2905.

Makkar, H., A. Aderibigbe y K. Becker. 1998. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemicals composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. Food Chemistry Journal, Vol. 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.

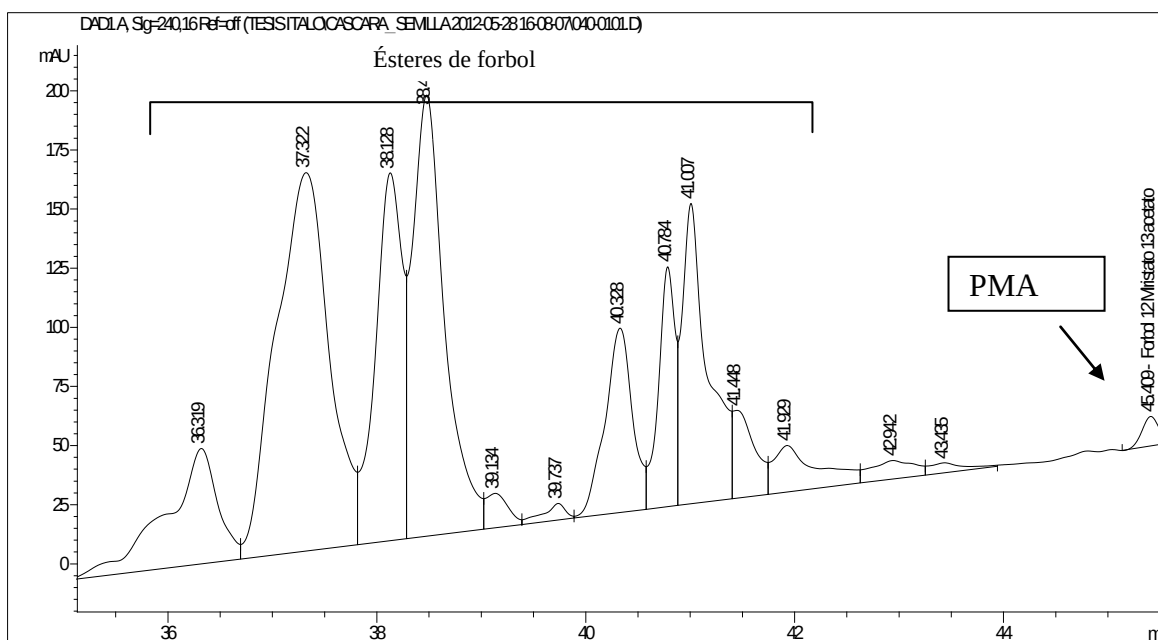
Martínez-Herrera, J., P. Siddhuraju, G. Francis, G. Dávila-Ortíz y K. Becker. 2006. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from México. Food Chemistry Journal, 96: 80-90.

Saetae, D y W. Suntornsuk. 2010. Variation of phorbol esters contents in *Jatropha curcas* from different provinces in Thailand and the application of its seed cake for starter broiler diets. American-Eurasian Journal Agriculture & Environment Science, 8(5): 497-501.

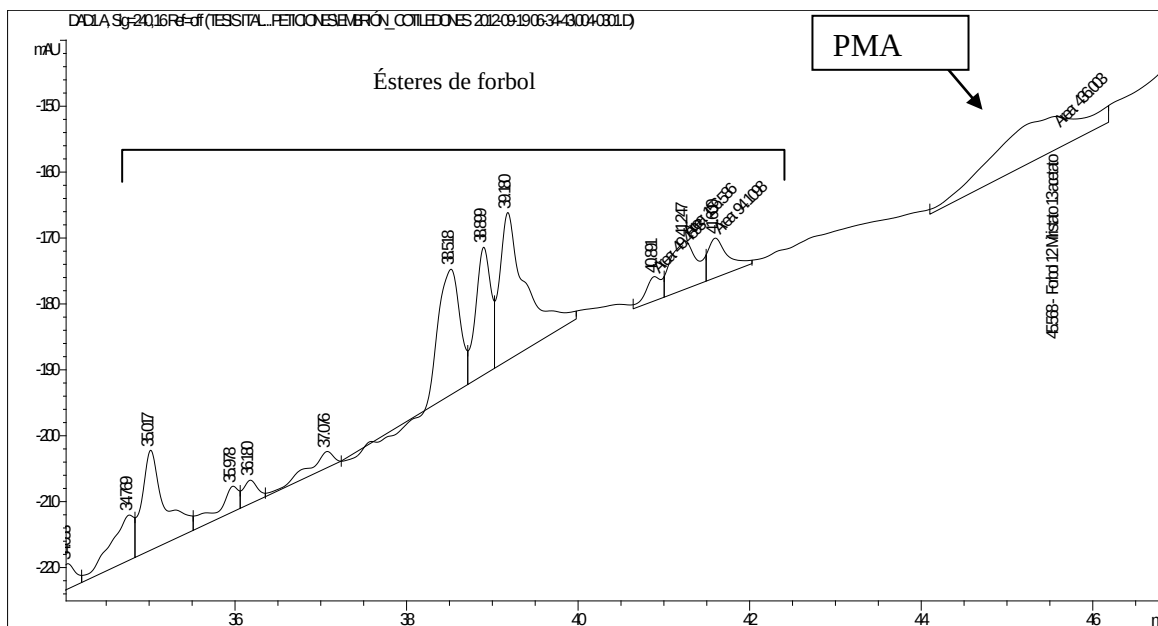
Verdugo, A., M. Angulo, E. Salazar, I. Murillo y R. Vélez. 2010. Determinación de ésteres de forbol en germen de semillas de *Jatropha curcas* y *Jatropha platyphylla* colectadas en el estado de Sinaloa. CIAD (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo). Hermosillo, Sonora, México.

Wink, M., C. Koschmieder, M. Sauerwein y F. Sporer. 1997. Phorbol Esters of *J. curcas* – Biological Activities and Potential Applications, Instituto para la farmacología botánica de la Universidad de Heidelberg, Alemania.

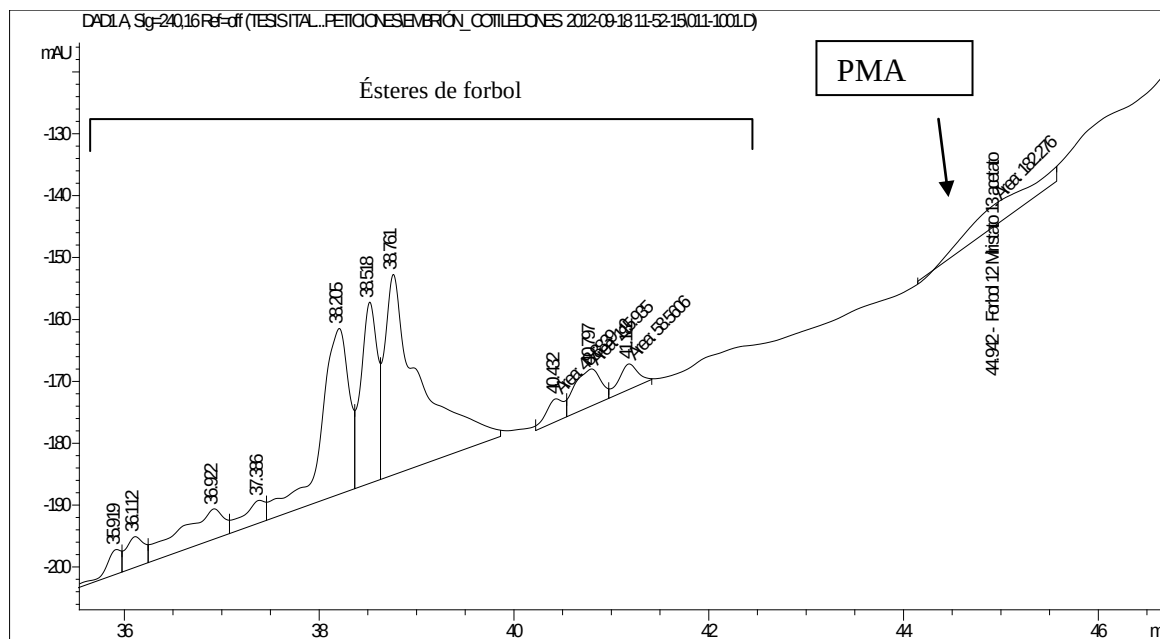
7. ANEXOS



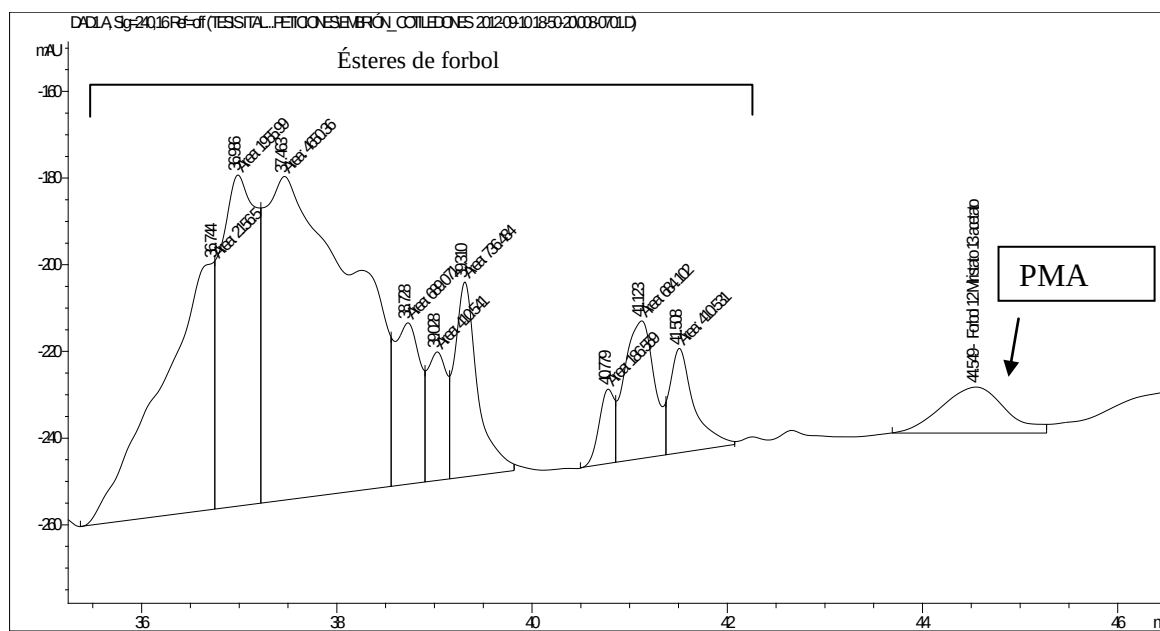
Anexo 1. Cromatograma de la semilla entera de la variedad Cabo Verde.



Anexo 2. Cromatograma de la semilla entera de la variedad Hindú Salvadoreña



Anexo 3. Cromatograma de la semilla entera de la variedad Criolla mexicana



Anexo 4. Cromatograma de la semilla entera de la variedad Criolla mexicana

DDLA Sg-2016R4-f (TESSTA...PETIOENSEMÓN COMILDONES 2012/09/08 10:33:23 0131301D)

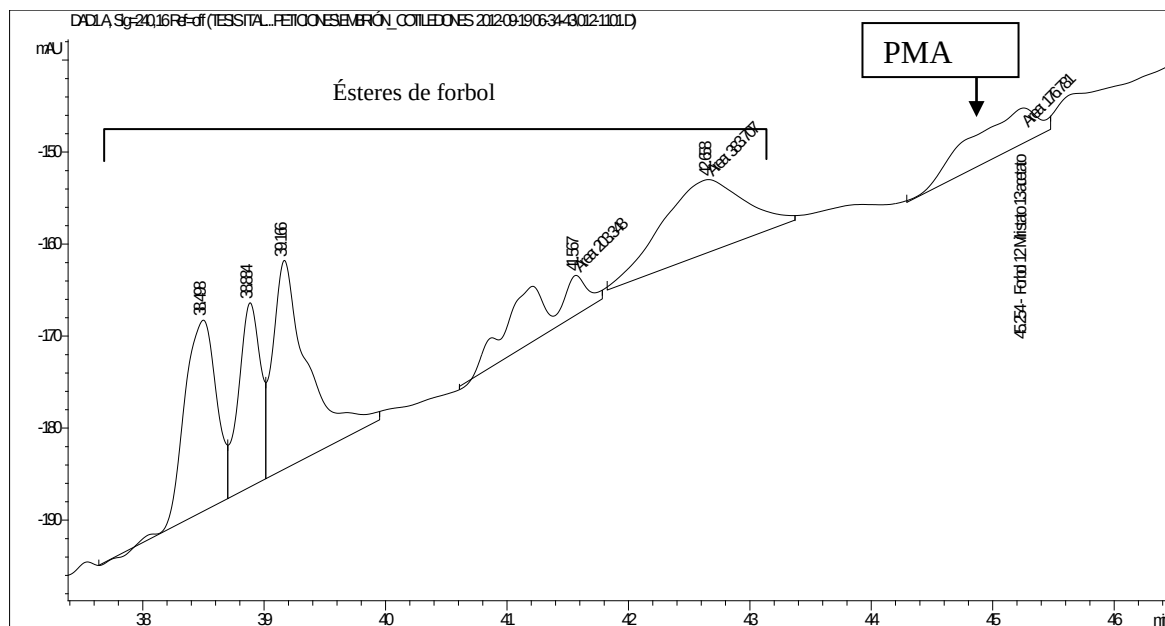
Ésteres de forbol

PMA

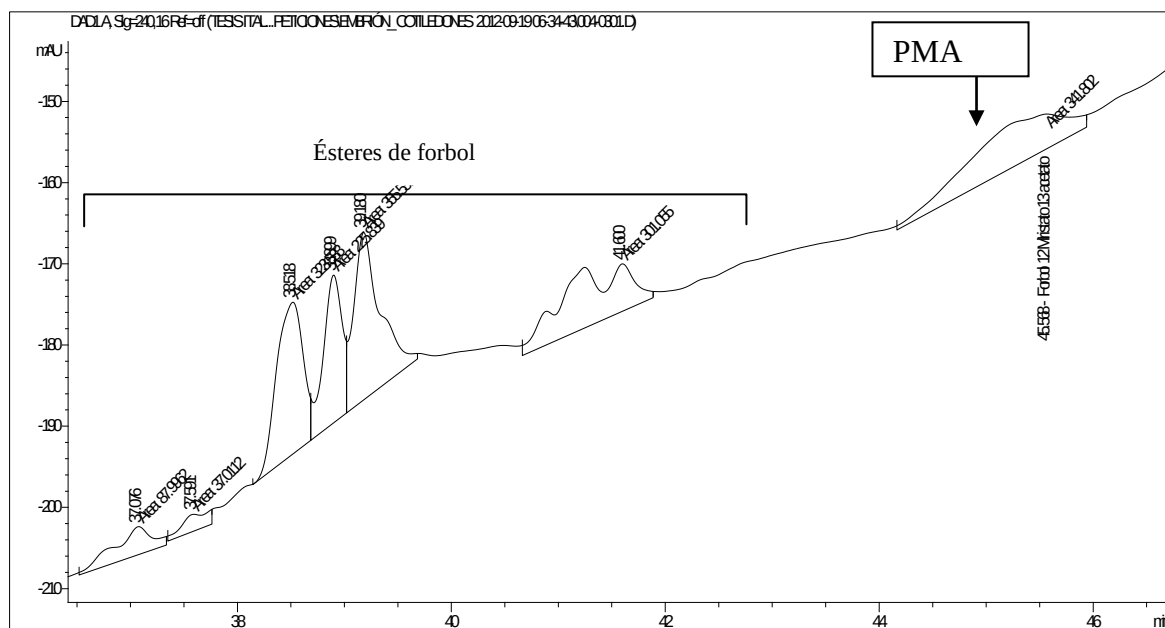
4588. Ford 120 Mtdio13 acetio

36.01, 37.36, 37.89, 38.75, 39.13, 39.49, 39.85, 40.07, 41.24, 41.55, 41.77, 41.95, 42.08

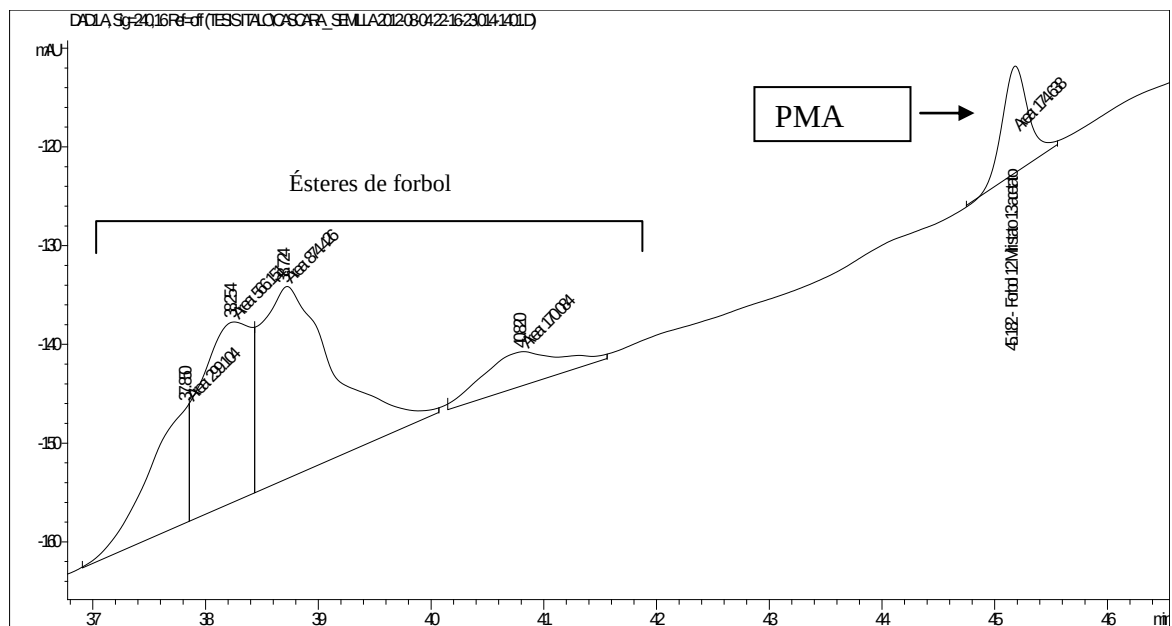
Anexo 6. Cromatograma de los cotiledones de la variedad Hindú Salvadoreña.



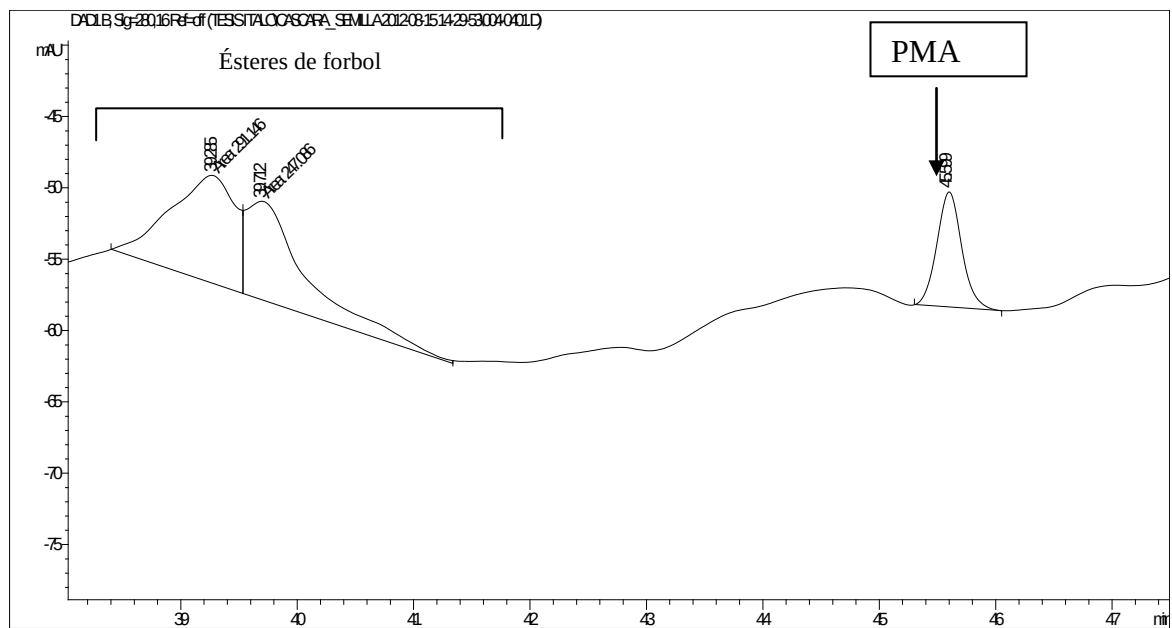
Anexo 7. Cromatograma de los cotiledones de la variedad Criolla Mexicana.



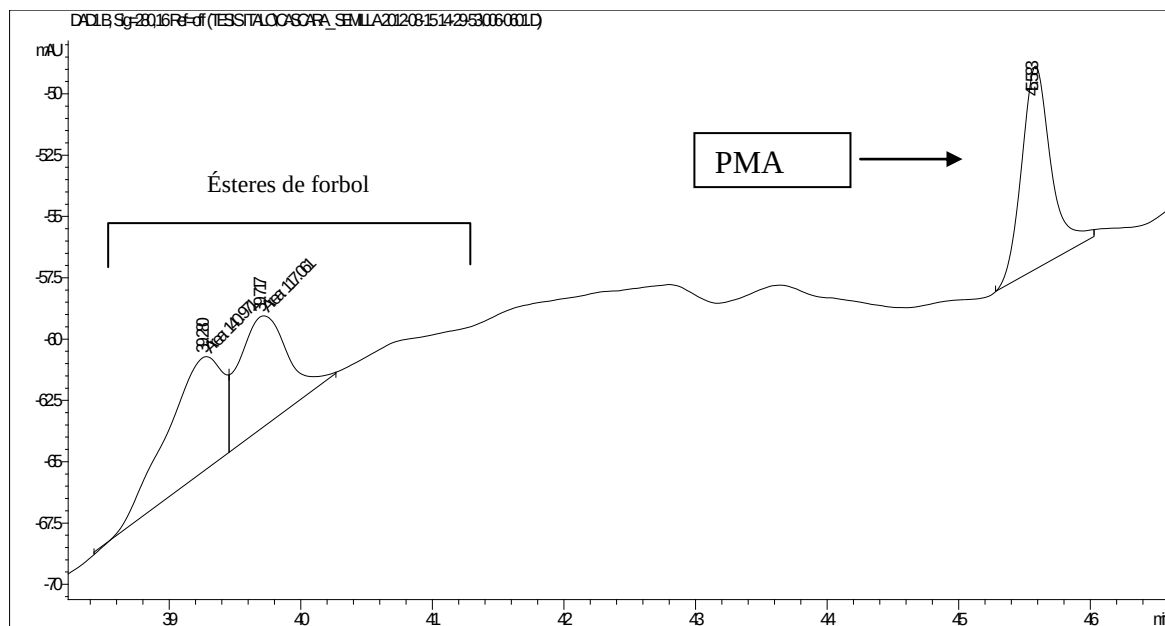
Anexo 8. Cromatograma de la cáscara de la variedad Cabo Verde.



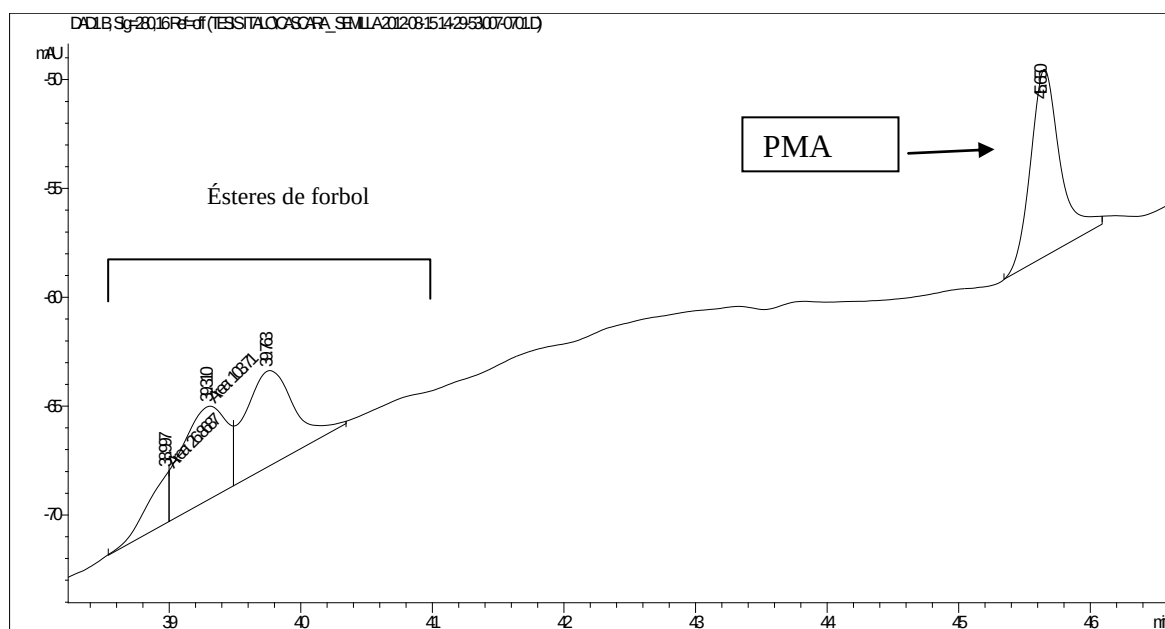
Anexo 9. Cromatograma de la cáscara de la variedad Criolla Mexicana.



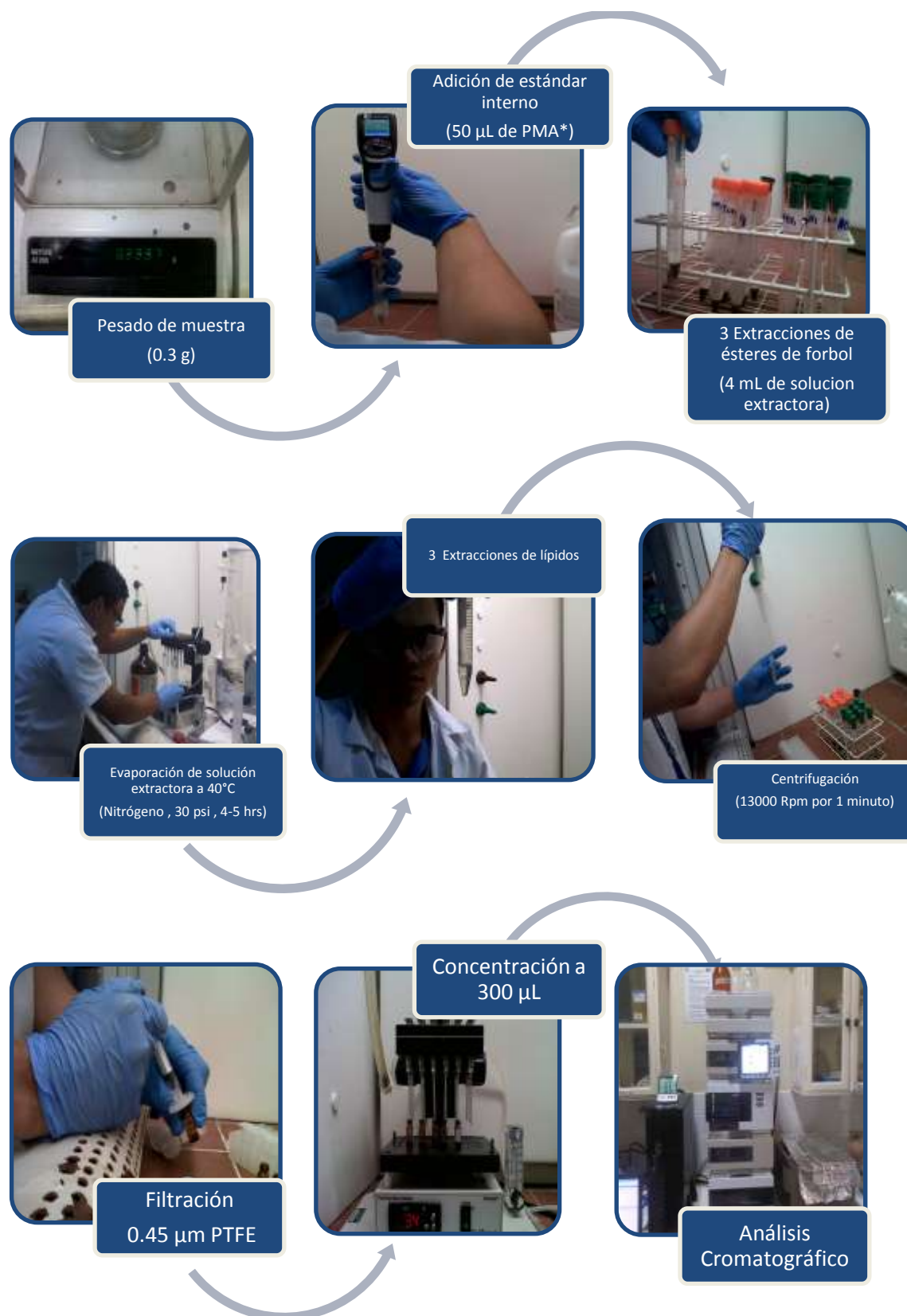
Anexo 10. Cromatograma de la cáscara de la variedad Criolla Mexicana.



Anexo 11. Cromatograma del embrión de la variedad Hindú Salvadoreña.



Anexo 12. Cromatograma del embrión de la variedad Criolla Mexicana.



Anexo 13. Flujo de proceso de extracción de ésteres de forbol.