

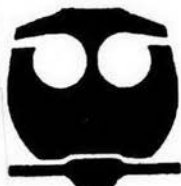


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“ESTUDIOS PREVIOS SOBRE LA EXTRACCIÓN,
IDENTIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS ÉSTERES DE
FORBOL EN LA SEMILLA DE JATROPHA CURCAS”

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO
PRESENTA
VALERIA SAAVEDRA BECERRIL



MEXICO, DF



2010

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

M. 96420



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: M. en C. Elba Rojas Escudero


VOCAL: Profesor: M. en C. Blas Flores Pérez

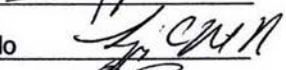
SECRETARIO: Profesor: Dr. Modesto Javier Cruz Gómez

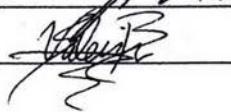
1er. SUPLENTE: Profesor: M. en C. Rosa Isela del Villar Morales

2° SUPLENTE: Profesor: Q.A. Adriana Ramírez Hernández

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 212-E DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA: Dr. M. Javier Cruz Gómez 

SUPERVISOR TÉCNICO: Dr. Néstor Noel López Castillo 

SUSTENTANTE: Valeria Saavedra Becerril 

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS A) Objetivos generales B) Objetivos particulares	2
I. MARCO TEÓRICO 1.1 Necesidad de los biocombustibles como una fuente alternativa para la producción de la energía 1.2 <i>Jatropha curcas</i> 1.3 Ésteres de forbol 1.3.1 Generalidades 1.3.2 Estructura de los ésteres de forbol 1.3.3 Actividad biológica de los ésteres de forbol 1.3.4 Métodos de extracción, identificación y purificación 1.3.5 Técnicas de caracterización comunes para los ésteres de forbol	3 11 18 19 21 22 32
II. METODOLOGÍA 2.1 Diagrama general de la investigación 2.2 Origen de la semilla 2.3 Preparación de la materia prima para su utilización 2.4 Extracción de la fracción tóxica a partir del aceite de Chiapas 2.5 Extracción de la fracción tóxica a partir de la semilla proveniente de Nayarit e identificación de los ésteres de forbol por medio de Cromatografía en capa fina 2.6 Pruebas para la obtención de un derivado estable de los ésteres de forbol 2.7 Diseño de un método de HPLC para la identificación y cuantificación de los ésteres de forbol 2.8 Extracción de los ésteres de forbol a partir del aceite y de las semillas de <i>J. curcas</i> y preparación de las muestras para su cuantificación	36 36 37 39 40 41 44 44 46
III. RESULTADOS 3.1 Relación de peso cáscara-semilla 3.2 Determinación del porcentaje de aceite en la semilla de <i>J. curcas</i> 3.3 Extracción de la fracción tóxica a partir del aceite de Chiapas	48 49 50

3.4	Extracción de la fracción tóxica a partir de la semilla de Nayarit e identificación de los ésteres de forbol por cromatografía en capa fina	51
3.5	Pruebas para la obtención de un derivado estable de los ésteres de forbol	53
3.6	Diseño de un método de HPLC para la identificación y cuantificación de los ésteres de forbol	
3.6.1	Espectros de absorción	54
3.6.2	Cromatogramas del TPA y los disolventes utilizados	54
3.6.3	Curva de calibración del TPA	58
3.7	Cromatogramas de las muestras	59
IV.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	
4.1 6.1	Relación de peso cáscara-semilla	68
4.2	Determinación del porcentaje de aceite en la semilla de <i>J. curcas</i>	68
4.3	Extracción de la fracción tóxica a partir del aceite de Chiapas	69
4.4	Extracción de la fracción tóxica a partir de la semilla de Nayarit e indentificación de los ésteres de forbol por cromatografía de capa fina	69
4.5	Pruebas para la obtención de un derivado estable de los ésteres de forbol	70
4.6	Diseño de un método de HPLC para la identificación y cuantificación de los ésteres de forbol	
4.6.1	Espectros de absorción	71
4.6.2	Cromatogramas del TPA y los disolventes utilizados	71
4.6.3	Curva de calibración del TPA	73
4.7	Cromatogramas de las muestras	73
V.	CONCLUSIONES	76
VI.	RECOMENDACIONES	78
VII.	BIBLIOGRAFIA	79

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia, a mis padres, Milisa y Héctor, y a mi hermana Daniela, por su confianza y apoyo durante toda mi carrera y en especial durante la realización de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por haber fungido no sólo como una excelente escuela, sino también como mi casa durante toda mi estancia en ella; y por haberme brindado la mejor educación y una de las mejores experiencias de mi vida.

A todos los profesores de la Facultad de Química de la UNAM, por mostrar tanta dedicación y empeño no sólo en la enseñanza del conocimiento científico, sino en la contribución a mi desarrollo como persona y profesionista de alta calidad.

A mis compañeros de la Facultad de Química: Katia, Mónica, Janin, Eddy, Lalo, Luis, Miguel Ángel, Salvador, Omar, Paco y Emmanuel, por su amistad y por formar una parte tan importante en este proceso.

Al profesor Adolfo García Osuna por brindarme incondicionalmente su apoyo y asesoría en la realización de este trabajo.

A Gabriel Garduño por su apoyo, orientación y sabiduría, al guiarme a través de una decisión tan importante; así como por acompañarme y estar pendiente durante toda mi carrera y la realización de este trabajo.

A Efraín Pérez por su amistad y gran apoyo en la realización de este trabajo.

INTRODUCCIÓN

Esta investigación ha sido desarrollada como parte de un proyecto institucional, enfocado hacia la promoción y establecimiento de los cultivos energéticos para la producción de biocombustibles, principalmente el de la planta *Jatropha curcas*, originaria de México y mejor conocida como piñón mexicano, piñón de tempate, o simplemente jatropa.

Esta planta mexicana es ampliamente conocida desde tiempos ancestrales en nuestro país, por cierto, el único que cuenta con variedades no tóxicas, que permiten entrever el gran potencial de la *J. curcas* nacional en la producción de forraje.

La medicina tradicional también la utiliza a pesar de la toxicidad de la mayoría de las variedades, y actualmente se conocen algunos de los orígenes de sus propiedades curativas, las cuales no serán abordadas en este nivel de investigación, pues para explotar adecuadamente esta planta es necesario profundizar primero en la caracterización química de sus propiedades constitutivas.

La siembra a gran escala de esta planta ofrece muchas ventajas sobre otros cultivos que actualmente son utilizados como fuente de biocombustibles, por ejemplo, el maíz, la caña de azúcar y otros cultivos originaria y principalmente destinados al consumo humano. Una de las principales ventajas reside en su gran contenido de compuestos químicos de alto valor comercial y aun biológicamente activos, como la cursina y los ésteres de forbol.

De este modo la presente investigación se aboca al desarrollo de un método propio y adecuado para la extracción, identificación y cuantificación de los ésteres de forbol a partir de la semilla y/o el aceite de la *J. curcas* nacional.

OBJETIVOS

Objetivos generales

- Contribuir al impulso de la siembra de *Jatropha curcas* como un cultivo energético en México.
- Conocer el contenido de los ésteres de forbol en distintas variedades mexicanas de *Jatropha curcas*, para evaluar las ventajas de la extracción y comercialización de éstos.

Objetivos particulares

- Evaluar distintos métodos de extracción de ésteres de forbol.
- Diseñar un método cromatográfico para la identificación de los ésteres de forbol.
- Cuantificar los ésteres de forbol en diferentes muestras de *J. curcas*.

I. MARCO TEÓRICO

1.1 Necesidad de los biocombustibles como una fuente alternativa para la producción de la energía.

Como es bien sabido, el planeta Tierra se encuentra en una situación ambiental muy compleja y cambiante de la cual somos en gran parte responsables y afecta no solamente a nuestra sociedad sino a todo el ecosistema. La capacidad intelectual del ser humano no ha sido aplicada del todo para bien, debido a su creciente y desenfrenada ambición. El avance en el conocimiento científico, ha permitido un desarrollo extraordinario de la tecnología, pero al utilizarla se gastan indebidamente los recursos naturales, además de que los procesos realizados por la industria, así como las actividades que realizamos cotidianamente, tienen como consecuencia la emisión desmesurada de contaminantes a la atmósfera, afectando a muchísimas especies animales y vegetales, irrumpiendo así en el ciclo natural de la vida.

Actualmente se tiene mayor conciencia de esta situación y en muchos países ya se han llevado a cabo acciones para encontrar soluciones al problema. Es difícil revertir en poco tiempo lo que se ha originado a lo largo de varias décadas, considerando además los factores de sobrepoblación y creciente demanda energética. No obstante, se pueden realizar acciones que disminuyan en forma significativa las consecuencias negativas que actualmente afectan al planeta, así como crear una nueva cultura que propicie cambios en la percepción y estilo de vida de la gente, que permitan la evolución del ser humano sin afectar el entorno en el que vive.

La disposición correcta y separación de la basura, el reciclaje, el ahorro de agua y energía eléctrica, la utilización de recursos renovables para la producción de la energía, la conservación de las especies, el control de la población mundial entre otras, son algunas de las acciones que tanto los gobiernos como la población en general deben realizar para comenzar a mejorar la situación mundial actual.

El presente trabajo surgió a partir de un proyecto que tiene su origen en el interés por la producción de la bioenergía, la cual se define como la energía que se obtiene de la biomasa, es decir, a partir de materiales orgánicos, los cuales pueden provenir de cultivos energéticos, acuacultivos, algacultivos, productos, subproductos y residuos forestales, residuos orgánicos municipales, excremento de animales, grasas y aceites de origen vegetal o animal.

En nuestro país se estima un potencial de producción de bioenergía que oscila entre los 2,635 y 3,771 petajoules (10^{15} joules) al año. En el sector agroindustrial de la caña de azúcar, se ha calculado un potencial de generación de electricidad, a partir del bagazo de caña, superior a 3,000,000 megawatts (MW) al año. El gobierno actual ha impulsado proyectos para el mejor aprovechamiento de la bioenergía, como el proyecto de la empresa Sistemas de Energía Internacional S.A. de C.V., en Monterrey, N.L., que es el primero en el país que aprovecha el biogás liberado por un relleno sanitario para entregar energía eléctrica a la red, con una capacidad de 7 MW. Este proyecto está registrado en la junta ejecutiva del Mecanismo de Desarrollo Limpio de las Naciones Unidas y se estima que reducirá 1.6 millones de toneladas equivalentes de bióxido de carbono (SENER, 2009).

En este marco y a partir de la aprobación de la Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos, México establece como objetivo claro de su política la promoción y desarrollo de los bioenergéticos con el fin de coadyuvar a la diversificación energética y el desarrollo sustentable como condiciones que permiten garantizar el apoyo al campo mexicano (SENER, 2009)

Dentro de esta iniciativa se procura impulsar el desarrollo científico y tecnológico que permitirá la integración de las actividades agropecuarias con las energéticas, en concordancia con los principios de desarrollo sustentable enmarcados en el Plan Nacional de Desarrollo 2007-2012 y los criterios de sustentabilidad emitidos por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos

Naturales; asegurando la transferencia de tecnología para brindar una mayor certidumbre energética y mejorar la economía rural mexicana, a través de la participación activa de la sociedad, la academia, los actores económicos y sociales involucrados en el tema, así como los centros de investigación y la sociedad en su totalidad como demandante de combustibles (SENER, 2009).

Las tecnologías que se utilizan para producir bioenergéticos en forma de calor, electricidad o combustibles para el transporte, están avanzando rápidamente, enfocándose principalmente en los biocombustibles líquidos etanol y biodiesel. En ese sentido, muchos países han anunciado planes para aumentar el uso de biocombustibles como reemplazo parcial al suministro de combustibles tradicionales, por lo que la producción global de biocombustibles se ha duplicado en los últimos cinco años y se espera un crecimiento similar en los próximos cuatro años.

Estados Unidos de América, Canadá, Australia, Colombia, China, India, Tailandia y la Unión Europea, entre otros, han establecido metas de largo plazo para la introducción de biocombustibles en su portafolio energético. La Unión Europea ha establecido una meta de contenido de biocombustibles para el transporte de 10% antes de 2020 y el presidente George W. Bush firmó en 2007 el "Acta de Independencia y Seguridad Energética", que exige al conjunto de productores de combustible utilizar un total de 36 mil millones de galones de biocombustible antes de 2022, lo que representa quintuplicar el nivel utilizado en 2005 (SENER,2009).

Durante la década pasada, la producción de Biodiesel se concentró en países europeos, con un marcado liderazgo por parte de Alemania. En años recientes la mayor capacidad de producción se ha incorporado en Estados Unidos, Brasil, Canadá, Australia y el sur de Asia.

Durante 2008 los países líderes en la producción de bioetanol fueron Estados Unidos de América con 34 mil millones de litros, Brasil con 27 mil millones de litros, China con 1.9 mil millones de litros, Francia con 1.2 mil millones de litros, Canadá con 0.9 mil millones de litros y Alemania con 0.5 mil millones de litros. Por su parte, los países líderes en la producción de Biodiesel durante 2008 fueron Alemania con 2.2 mil millones de litros, Estados Unidos de América con 2.0 mil millones de litros, Francia con 1.6 mil millones de litros, Argentina y Brasil con 1.2 mil millones de litros y Tailandia con 0.4 mil millones de litros (SENER, 2009).

Con base en el análisis de las características y potencial del biodiesel en México, la estrategia en el corto plazo estará basada en su uso como aditivo del diesel UBA. El área de refinación de la empresa Petróleos Mexicanos (PEMEX) ha definido una estrategia de integración del biodiesel al diesel de producción nacional en dos fases. La primera consistió en probar el uso como aditivo sobre 30 mil barriles diarios de Diesel Ultra Bajo Azufre (UBA). La segunda fase integraría el Biodiesel como aditivo al total de la producción nacional de Diesel UBA si el desarrollo del mercado de Bioenergéticos así lo permite.

La producción temprana de la Refinería de Cadereyta en Nuevo León, permitirá integrar 8.7 millones de litros de biodiesel al año (0.19 mil barriles diarios) para cumplir con la especificación de lubricidad del diesel, sustituyendo a los aditivos químicos de importación. Las pruebas realizadas por el Instituto Mexicano del Petróleo indican que es necesario utilizar biodiesel en proporciones de 0.5 a 1.0 % para alcanzar una lubricidad menor a 520 micrones. Se ha encontrado que usar biodiesel por arriba de 0.5% en volumen puede resultar en una baja tolerancia al agua, lo que puede ocasionar separación entre el agua y el hidrocarburo (SENER, 2009).

Aunque el programa de introducción de los bioenergéticos en México hacia 2011 pretende garantizar el abasto de biodiesel para su mezcla con diesel UBA, la disponibilidad del biocombustible es limitada, por lo que se debe impulsar la siembra de cultivos energéticos y la producción del biocombustible en el país, aprovechando sus condiciones geográficas y climatológicas óptimas para la agricultura, generando empleo y ayudando a la situación del campo mexicano, además de recuperar terreno que se encuentra en desuso y aumentar la absorción de CO₂ del ambiente mediante la siembra masiva de árboles.

Los biocombustibles se han clasificado de acuerdo a la materia prima de donde se obtienen de la siguiente manera:

- Biocombustibles de primera generación (B1G). Su producción comenzó en la década de 1970, cuando se produjeron las primeras crisis del petróleo. Alemania, Austria, Estados Unidos y Brasil, preocupados por su altísima dependencia del petróleo y por las perspectivas de su agotamiento, comenzaron las investigaciones con el objeto de encontrar combustibles que sustituyeran al petróleo en sus motores. Los aceites vegetales y sus ésteres (biodiesel), el etanol y las mezclas fueron considerados las alternativas más promisorias para usarlos tanto como sustitutos de combustibles así como aditivos. El desarrollo de los nuevos combustibles biológicos se orientó al uso de materias primas que se encontraban disponibles, cultivos agrícolas tales como la caña de azúcar en Brasil, la remolacha en Francia, el maíz y la soja en Estados Unidos y la colza en Alemania y Canadá. A estos primeros combustibles provenientes de cultivos agrícolas tradicionales se les llamó "agrocombustibles" dado su origen agrícola, y más recientemente "biocombustibles de primera generación (B1G)" (Lobato, 2008).

- Biocombustibles de segunda generación (B2G). Son aquellos combustibles que se producen a partir de cultivos no alimentarios tales como los pastos perennes, la *Jatropha* y el álamo, los residuos de cultivos, tales como paja de cereales, y los residuos agroindustriales y forestales. También se pretende que estos cultivos no alimentarios ocupen áreas marginales, para no desplazar los alimentos de las tierras agrícolas (Lobato, 2008).

- Biocombustibles de tercera generación (B3G). La ingeniería genética aplicada a la conversión de biomasa en energía ha permitido desarrollar los B3G. Las mismas tecnologías de producción que los B2G se aplican a materias primas genéticamente modificadas con un objetivo determinado. Es el caso del etanol de madera obtenido a partir de árboles con bajo contenido de lignina, minimizando de esta forma los costos del pretratamiento, los más altos del proceso total. La mejora en las materias primas y los procesos de producción también están en la mira de la tercera generación de los biocombustibles: etanol de celulosa, etanol de maíz con celulosas integradas, biodiesel de algas, enzimas hidrolíticas, procesos de síntesis y gasificación de biomasa, entre otros (Lobato, 2008).

- Biocombustibles de cuarta generación (B4G). Son producto de modificaciones tanto en las materias primas como en los procesos con el objetivo de captar y almacenar la mayor cantidad de carbono posible, es decir, la materia prima no sólo se adapta para mejorar la eficiencia de proceso, sino que se diseña para captar más CO₂, a medida que el cultivo crece. Los procesos termoquímicos se combinan con tecnologías de captación y almacenamiento de carbono que encauzan el CO₂ a las formaciones geológicas o lo almacenan en forma de carbonatos (Lobato, 2008).

La producción de los agrocombustibles ha dado lugar a muchos debates. Los defensores destacan las ventajas medioambientales de consumirlos y los detractores describen las funestas consecuencias de su uso: que son los responsables del aumento en los precios de los alimentos, que contribuyen a la desertificación y destrucción paulatina de bosques, que colaboran con la pérdida del hábitat reduciendo la biodiversidad para aumentar áreas agrícolas, entre otras.

Sin embargo, la incidencia de los agrocombustibles es ínfima en la actualidad, en comparación con la dependencia de los derivados de petróleo: 0,5% del consumo mundial, aunque las metas de la Unión Europea de consumo de biocombustibles son mucho más ambiciosas. Alcanzar el 10% de biocombustibles en la matriz energética europea al 2020 aparece para muchos como una meta peligrosa, que pondrá en riesgo vastas zonas de la Amazonia, de Malasia o de Indonesia. La Unión Europea no posee suficientes tierras de cultivo para producir los volúmenes requeridos, por lo que los biocombustibles tendrán que provenir de otros sitios, al menos las materias primas para producirlos (Lobato, 2008).

Simultáneamente, la EPEA ("Environmental Protection Encouragement Agency"), sostiene que... "hay pruebas científicas sólidas, que apoyan la opinión de que la primera generación de biocombustibles crea muchos más problemas de los que resuelve, entre ellos la deforestación, el aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero, el aumento de la inseguridad alimentaria, la creación de más pobreza, el aumento de la degradación de los suelos, la disminución de la biodiversidad y el acelerado agotamiento de los recursos naturales, por ello aunque son eficaces en la reducción de emisiones, no son rentables" (Lobato, 2008).

Debido a todas estas consecuencias negativas que genera el uso de B1G, actualmente la balanza se inclina hacia la producción de los B2G, B3G y B4G, tal es el caso de la producción de biodiesel a partir de *Jatropha curcas*, mejor conocida como piñoncillo, piñón mexicano, piñón de tempate o jatropa.

Las ventajas de la siembra a gran escala y de la producción de biocombustibles a partir de esta planta se discutirán en los siguientes apartados.

La obtención del biodiesel a partir de aceites vegetales implica la reacción de transesterificación de triglicéridos, la cual consiste básicamente en sustituir el glicerol por un alcohol simple como el metanol. Como resultado de esta reacción se obtienen ésteres metílicos (biodiesel) y glicerina. La reacción consta de tres reacciones reversibles y consecutivas (Figura 1.1).

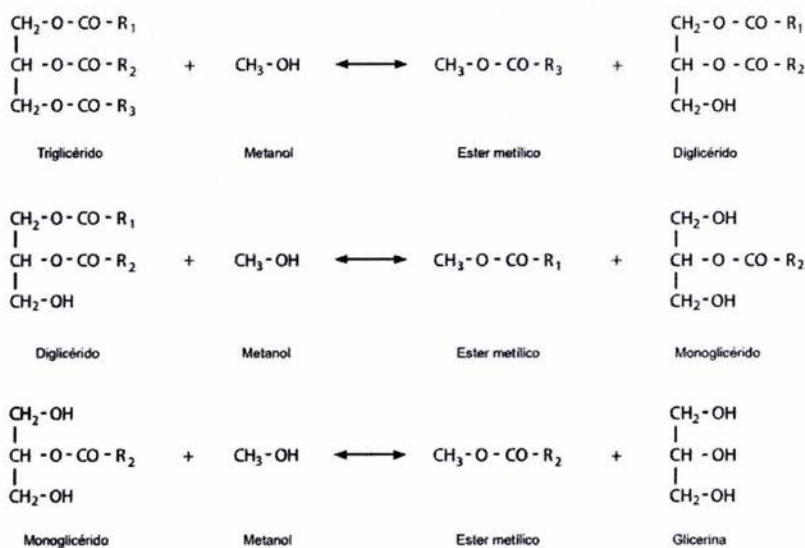


Figura 1.1 Reacción de transesterificación para la obtención de biodiesel. (<http://www.miliarium.com/Monografias/Biocombustibles/Biodiesel/Biodiesel.asp>, 2009)

1.2 *Jatropha curcas*

La *Jatropha curcas* es un arbusto perenne y resistente a la sequía que pertenece a la familia *Euphorbiaceae*. Proveniente de México, es sembrada en América Central y del Sur, Asia Central y del Sureste, India y África. Prospera con apenas 250 a 600 mm de lluvia al año, y llega a vivir hasta 40 años. Se adapta bien a condiciones áridas y semiáridas, e incluso se utiliza para el control de la erosión. *J. curcas* fue probablemente distribuida por marineros portugueses por las Islas de Cape Verde y Guinea Bissau, a otros países de África y Asia. (Giibitz, et.al.,1999). En las figura 1.2 – 1.4 se muestran fotografías de arbustos, frutos y semillas de *J. curcas*.



Figura 1.2 Fotografía de arbustos de *Jatropha curcas*. (<http://chemicallygreen.com/wp-content/uploads/2009/02/20090219072754.jpg>)



Figura 1.3 Fotografía de hojas y frutos de *Jatropha curcas*. (<http://go635254.s3.amazonaws.com/redgreenandblue/files/2009/05/jatropha.jpg>)



Figura 1.4 Fotografías de frutos y semillas de *Jatropha curcas*. http://echobooks.org/images/jatropha_curcas_seed.jpg
(http://www.biodisol.com/wpcontent/upload/2008/05/semillas_y_frutos_de_jatropha_curcas_jatropha_seeds.jpg)

Las primeras aplicaciones comerciales de *J. curcas* fueron reportadas por los portugueses, donde el aceite importado desde Cape Verde se usaba para la producción de jabón y como aceite para lámparas. El bagazo de la semilla prensada, se utilizaba como fertilizante en el cultivo de papas. Hoy en día *J. curcas* se cultiva para la producción de aceite como un sustituto de combustible, o bien, se realiza la transesterificación del mismo para la obtención de biodiesel, este proceso se ha vuelto importante debido al aumento en la eficiencia del combustible. Costos de \$0.2 dólares por litro, se calcularon para el metil éster de una planta en Nicaragua que produciría 1450 toneladas en 1997 (Giibitz, et.al., 1999).

Además de estas aplicaciones, a la *J. curcas* se le pueden atribuir muchos otros usos, los cuales se ilustran en la Figura 1.4

Jatropha curcas

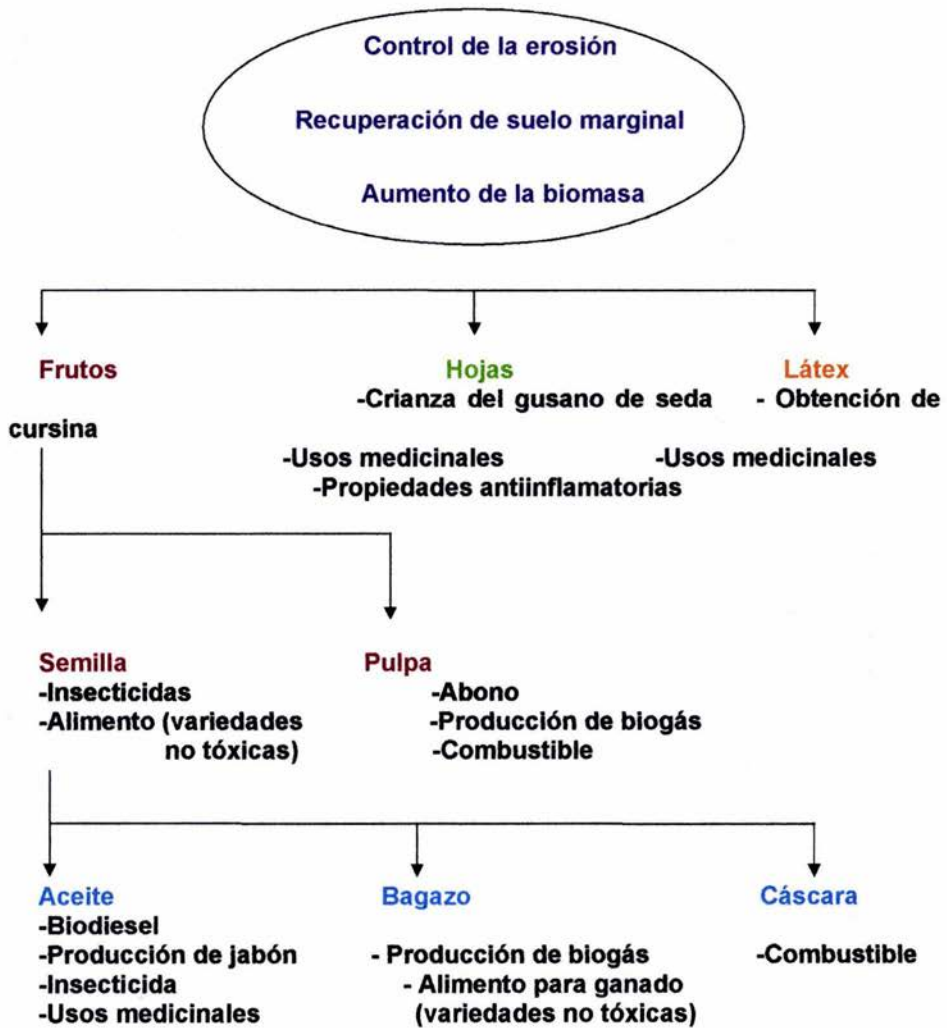


Figura 1.3 Usos industriales de *J. curcas*. (Giibitz, et al., 1999)

Debido a su gran facilidad de cultivo, y a su contenido de aceite, la jatrofa ha ganado mucha importancia para la producción de biodiesel, por ello recientemente muchos grupos se han enfocado al estudio de nuevos métodos para el cultivo y mejoramiento genético de la *J. curcas*. El aceite de la jatropha puede ser utilizado directamente en motores de diesel y mezclándolo con metanol, pero también se han evaluado y optimizado métodos de transesterificación industrial del aceite de la semilla para su uso como biocombustible a escala industrial. La evaluación económica ha mostrado que la producción de biodiesel de jatrofa es muy rentable pues los subproductos que se generan también tienen un valor monetario, tal es el ejemplo de la glicerina (Kumar, Sharma 2008).

A pesar de que la jatrofa parece ser la opción más sustentable para la producción de bioenergía a partir de cultivos, es necesario investigar los impactos ambientales y socioeconómicos de su cultivo a gran escala, así como realizar un balance entre la energía producida y las emisiones de carbono que se generarán.

La siembra de *J. curcas* tiene ciertas ventajas sobre la siembra de otro tipo de plantas debido a que crece en terrenos marginales y erosionados, además de ser resistente a la sequía, gracias a ello no se tienen que destruir praderas ni bosques resultando en la acumulación de toneladas de gases de efecto invernadero a la atmósfera. Además, el cultivarla no implica competencia alguna por terreno donde crezca alimento, ni necesitará mucha agua o fertilizantes ni pesticidas como el maíz, la soya, la canola y otros cultivos alimenticios que también se han querido utilizar para la producción de bioenergéticos.

La jatrofa posee importantes propiedades nutrimentales. Dependiendo de la variedad, las semillas de *J. curcas* pueden contener hasta un 40-60% de aceite. Este aceite contiene aproximadamente 24.6% de proteína cruda, 47.25% de grasa cruda, y 5.54% de humedad. La fracción de ácidos grasos saturados se compone principalmente de ácido palmítico (14.1%) y ácido esteárico (6.7%), mientras que los ácidos insaturados consisten de ácido oleico (47%) y ácido linoleico (31.6%) (Kumar y Sharma, 2008).

La siembra a gran escala de *J. curcas* implica otras ventajas económicas debido a que contiene muchos compuestos químicos de interés en sus diferentes partes, tales como ácidos orgánicos, proteínas con actividad biológica como la cursina, saponinas e inhibidores de tripsina, y compuestos como los ésteres de forbol y otros triterpenos cíclicos de alto valor comercial.

En México, a pesar de todas estas ventajas existe incertidumbre acerca del potencial de la *J. curcas* como un cultivo bioenergético. La planta nunca ha sido domesticada, su rendimiento no es predecible, las condiciones para su crecimiento óptimo no están bien definidas y el impacto de su cultivo a gran escala es desconocido, por ello es necesario promover la investigación y el desarrollo de las tecnologías necesarias que faciliten el uso de este cultivo energético.

El uso de la *Jatropha curcas* para la producción de biocombustible ha sido impulsado principalmente en la India gracias a la visión e interés que ha mostrado su gobierno para utilizar esta planta. En 2006 el presidente Adbul Kalam mencionó que de los 60 millones de hectáreas de tierras marginales que posee la India, 30 millones podrían ser destinados a la siembra de *J. curcas*. Desde ese año en varios estados de la India se han distribuido plantas sin cargo alguno para pequeños agricultores, promoviendo la inversión privada en plantaciones de *Jatropha* y poniendo en marcha plantas de procesamiento de biodiesel. Actualmente se estima que entre 500 000 y 600 000 hectáreas de la planta se encuentran creciendo en este país (ISIS, 2007).

En la India, el estado de Chhattisgarh tiene el mejor programa de biodiesel a partir de *J. curcas*. Se han repartido más de 380 millones de semillas entre agricultores, suficientes para cubrir un área de 150 000 ha, y también se otorgaron 80 prensas de aceite a varios organismos de gobierno de ciertas villas, garantizando la compra de la semilla en aproximadamente \$0.16 US por kilogramo. Varias micro-refinerías locales se han esparcido a través del estado para proveer biodiesel para tractores, bombas de irrigación, jeeps y generadores de energía en las villas, incluso los motores de los trenes en este país ya están utilizando el aceite de *J. curcas* mezclado con el diesel teniendo un funcionamiento óptimo (ISIS, 2007).

India no es el único país que ha sabido explotar la planta, en China hay 2 millones de hectáreas de cultivos de *Jatropha*, y existen planes para plantar 11 millones adicionales en los estados del sur para 2010. Burma también tiene planes para plantar millones de hectáreas, y las Filipinas así como varios países africanos han iniciado también plantaciones a larga escala. Existen 200 000 hectáreas de *Jatropha* en Malawi y 15 000 en Zambia, casi todas bajo contratos formales o acuerdos con la compañía inglesa D1-Oils (ISIS, 2007).

Como *J. curcas*, muchas especies de la familia Euforbiaceae son tóxicas al ganado y alelopáticas para plantas de utilidad forrajera. Durante casi 150 años se realizaron investigaciones para establecer los principios catárticos de *Croton tiglium* Linneo, hasta descubrir la gran actividad generadora de tumores (carcinogénica) del "aceite de croton". Estos esfuerzos culminaron con el aislamiento de factores irritantes carcinogénicos del aceite como ésteres del forbol. Después de la elucidación de la estructura del forbol, se han identificado muchos ésteres diterpenos relacionados de la familia Euforbiaceae. Algunos de estos compuestos son generadores de tumores, mientras que otros tienen acción antitumoral. Sin embargo, todos ellos son extremadamente potentes irritantes primarios directores sobre la piel de los mamíferos (Salamanca).

Los principales componentes responsables de la toxicidad a las semillas de *J. curcas* son los ésteres de forbol y la cursina, muchos intentos de detoxificación de la semilla se han realizado, debido al interés que existe en su uso como alimento para ganado, además de que el aceite debe ser completamente inocuo antes de su comercialización. Entre estos tratamientos se incluyen la radiación ionizante, la extracción por disolventes seguida de tratamiento con calor para inactivar lectinas, los tratamientos químicos con hidróxido de sodio e hipoclorito de sodio, o bien con agentes blanqueadores; el desgomado, la deodorización y hasta los tratamientos biológicos empleando la larva *Hyles euphorbiae* (Bekker *et al.* 2007).

A pesar de su toxicidad, todas las partes de la *Jatropha curcas* han sido utilizadas durante mucho tiempo en la medicina tradicional y en la veterinaria. Se han encontrado compuestos antitumorales como la Curcaciolina A. El aceite ha sido utilizado para tratar eczema y otras enfermedades de la piel, así como para calmar dolores reumáticos. El aceite también se ha utilizado como un agente purgativo. El látex se ha utilizado para curar enfermedades virales, como herpes bucal, y el virus de mosaico de la sandía, además de mostrar actividad coagulante. Diversos extractos de la planta han dado resultado para el tratamiento de alergias, quemaduras, heridas, inflamación de tejidos, lepra, luecoderma e incluso han ayudado en el tratamiento del VIH (Kurma, Sharma, 2008).

En resumen la utilización de la *J. curcas* como un cultivo energético, tiene muchas ventajas debido a sus características biológicas, sus aplicaciones y su contenido en productos de alto valor agregado que son comercializables.

1.3 Ésteres de forbol

1.3.1 Generalidades

Los ésteres de forbol, son diterpenoides tetracíclicos generalmente conocidos por su actividad promotora de tumores. Estos compuestos mimetizan la acción del diacilglicerol (DAG), activador de la proteína cinasa C (PKC), que regula diferentes señales de rutas de transducción y otras actividades metabólicas celulares, además de relacionarse con varias respuestas celulares mediante la fosforilación de proteínas blanco en residuos de serina o treonina (Hass y Mittelbach, 2000). Su actividad biológica depende altamente de su estructura, y aun administrados en muy bajas concentraciones, muestran manifestaciones toxicológicas en animales (Becker *et al.* 2007).

El término forbol es usado para describir la familia de compuestos naturales que se pueden referir como diterpenos del tigliano. Los ésteres de forbol se definen como compuestos policíclicos en donde dos grupos hidroxilo en átomos de carbono vecinos son esterificados a ácidos grasos. Se ha reportado que muchas plantas como *Sapium indicum*, *S. japonicum*, *Euphorbia frankiana*, *E. cocrulescence*, *E. ticulli*, *Croton spareiflorus*, *C. tigilium*, *C.ciliatoglandulifer*, *Jatropha curcas*, *Excoecaria agallocha*, y *Homalanthus nutans*, contienen ésteres de forbol (Salamanca).

Algunos de los efectos biológicos de los ésteres de forbol son la promoción de tumores, la proliferación celular, la activación de las plaquetas en sangre, mitogénesis de linfocitos, inflamación de la piel, producción de prostaglandinas y estimulación de la degranulación de neutrófilos (glóbulos blancos granulados que fagocitan y destruyen bacterias). (Hass y Mittelbach, 2000). Contrariamente, algunos derivados de los ésteres de forbol han mostrado actividad antimicrobiana y antitumoral.

Los ésteres de forbol también tienen propiedades insecticidas y pesticidas. (Bekker *et al.* 2007) pero debido a su actividad biológica los ésteres de forbol son utilizados principalmente para fines de investigación biomédica y farmacológica, lo cual los convierte en productos químicos de precio muy elevado, por ejemplo el más utilizado de ellos, 4 β -12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), tiene un valor en el mercado que oscila entre los 100 dólares por miligramo de compuesto (Sigma-Aldrich, 2009).

Se ha reportado que el aceite de variedades mexicanas de *J. curcas* contiene bajas cantidades de ésteres de forbol, alrededor de 0.27 mg/mL, y en algunos casos están ausentes (Jumat, *et al.* 2009).

1.3.2 Estructura de los ésteres de forbol

La estructura de los ésteres de forbol está constituida principalmente por un esqueleto de carbono diterpénico y tetracíclico conocido como tigliano. Éste contiene cuatro anillos designados como A, B, C y D, como se muestra en la figura 1.3. Si esta estructura básica contiene además grupos hidroxilo en diferentes posiciones, así como un enlace tipo cetona en el anillo A, es conocida como forbol. La formación de enlaces tipo éster en varios de los grupos ácidos del forbol resulta en la formación de los compuestos llamados ésteres de forbol. El forbol, también mostrado en la figura 3, es el padre diterpeno de los ésteres de forbol y contiene cinco grupos hidroxilo con diferente reactividad a la acilación (Becker *et al.* 2007).

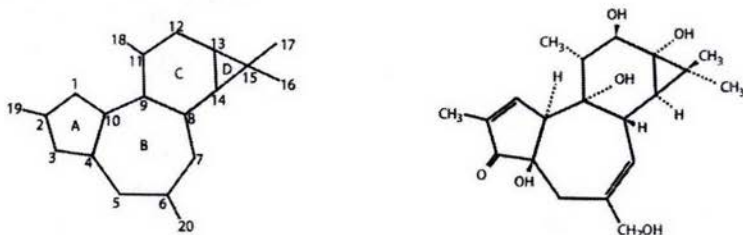


Figura 1.5 Estructuras del tigliano (izquierda) y forbol (derecha). (Bekker *et al.* 2007)

El anillo A se encuentra a la izquierda y enlazado en posición trans al anillo de siete miembros, B. El anillo C, de seis miembros, se encuentra enlazado en posición cis al anillo de ciclopropano, D. Las dos categorías de forboles, α y β , difieren en su grupo OH en el anillo C. La posición de este grupo, hace que el forbol sea activo (β) o inactivo (α), lo que resulta en el arreglo espacial del anillo D, e impide la activación de la proteína quinasa C (PKC) y de otros receptores similares estructuralmente a los de los ésteres de forbol. A pesar de que difieren en su actividad, ambos tipos de ésteres de forbol son lipofílicos y tienen propiedades fisicoquímicas muy similares (Becker *et al.* 2007).

Ejemplos de ésteres de forbol activos son el TPA (4 β -12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) y el PDBu (4 β -forbol-12,13-dibutirato), los cuales difieren únicamente en los sustituyentes en las posiciones 12 y 13 del anillo C. Se muestra sus estructuras en la figura 1.4.

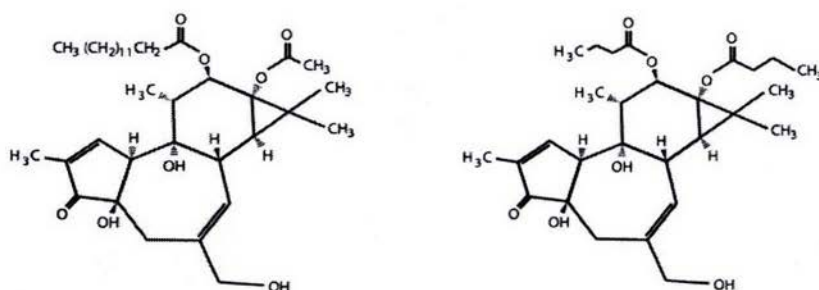


Figura 1.6 Estructuras del TPA (izquierda) y PDBu (derecha). (Sigma-Aldrich, 2009)

También se han encontrado ésteres de forbol que contienen nitrógeno, por ejemplo la sapintoxina A, aislada del fruto de *Sapium indicum*. La estructura de este forbol, fue confirmada como 12-O (*N*-metilaminobenzoil)13-O-acetil 14-deoxi forbol), y se ha visto que este compuesto actúa rápidamente como un agente proinflamatorio en la piel de los mamíferos, pero es menos potente que el TPA. En

2006, Rios y Aguilar-Guadarrama, identificaron cuatro derivados de ésteres de forbol que contienen nitrógeno de la planta *Croton ciliatoglandulifer*, los cuales son capaces de inducir actividad antiinflamatoria en edema de orejas de ratón (Becker *et al.* 2007).

1.3.3 Actividad biológica de los ésteres de forbol

Los ésteres de forbol y sus derivados han sido reportados como potentes promotores de tumores. En adición a este efecto inducen otros de tipo biológico, a concentraciones excepcionalmente bajas. Estos compuestos son responsables de efectos inflamatorios sobre la piel y de la promoción de tumores debido a que estimulan la PKC, la cual está implícita en la traducción de señales y procesos de desarrollo de muchas células y tejidos, produciendo una variedad de efectos biológicos principalmente en los mamíferos (Becker *et al.* 2007).

La principal actividad de los ésteres de forbol se da en las membranas biológicas, ya que son moléculas anfífilas y tienen tendencia a unirse a los fosfolípidos de las membranas. Estos receptores son usualmente los principales blancos de los ésteres de forbol. La actividad más investigada de los ésteres de forbol es la unión y activación de la PKC, que juega un papel crítico en la trasducción de señales en rutas metabólicas y regula el crecimiento y diferenciación de las células (Becker *et al.* 2007).

Los forboles no inducen tumores por sí solos, sin embargo, promueven el crecimiento tumoral en combinación con la exposición a algún carcinógeno. Los ésteres de forbol alteran la fosforilación de proteínas celulares específicas e incrementan la transcripción de ciertos genes celulares. El mecanismo detrás de la promoción de tumores es la interacción con la PKC, que regula las señales que inducen la transcripción de genes, lo cual tiene que ver con la proliferación celular.

Contrariamente a la habilidad para promover tumores, hay reportes de la actividad apoptótica de los ésteres de forbol en células tumorales (Becker *et al.* 2007).

Otros efectos biológicos importantes de los ésteres de forbol son la agregación de plaquetas y la diferenciación celular, causando cambios en las propiedades físicas de la fase lipídica de las membranas, lo cual resulta en el incremento de la fluidicidad de la membrana, cambios en la morfología de la superficie celular y adhesión celular. También se ha reportado que afectan varias actividades enzimáticas a través de su interacción con la PKC (Becker *et al.* 2007).

A pesar de que los ésteres de forbol han sido muy estudiados, existen muchos tipos de ellos, y no se sabe el por qué de su actividad biológica contradictoria. Estos compuestos son utilizados principalmente en laboratorios de investigación biomédica para conocer los mecanismos de la generación y propagación de tumores, así como sus posibles aplicaciones como fármacos.

1.3.4 Métodos de extracción, identificación y purificación de los ésteres de forbol

Los métodos de extracción de los ésteres de forbol más comúnmente referidos en la bibliografía utilizan como disolventes el metanol, el diclorometano y el cloroformo y se pueden extraer directamente de la semilla, o a partir del aceite, en cuyo caso se le agrega previamente hexano o acetato de etilo.

Generalmente el primer paso para determinar si los extractos obtenidos contienen un compuesto bioactivo es la realización de un bioensayo, el cual se define como cualquier sistema *in vitro* o *in vivo* usado para detectar actividad biológica de un extracto o una sustancia pura que proviene de un organismo vivo (Colegate y Molyneux, 2008).

Un bioensayo muy común para la detección de ésteres de forbol en aceite de *J. curcas* u otras plantas que los contienen consiste en aplicar las diferentes fracciones obtenidas del aceite de la planta en orejas de ratón, midiendo la actividad irritante que poseen (Adolf, et al,1984).

En 1994, Gandhi y colaboradores realizaron estudios toxicológicos del aceite, la fracción tóxica fue obtenida al disolver el aceite en éter de petróleo y posteriormente extraerlo con metanol-agua en una proporción 9:1 volumen/volumen. Con ella se realizaron bioensayos *in vivo*, los cuales consistieron en pruebas de toxicidad oral y tópica en roedores. La prueba *in vitro* consistió en la medición de la actividad hemolítica del aceite y la fracción tóxica obtenida utilizando glóbulos rojos de ratón.

Para la separación e identificación de compuestos naturales se utilizan principalmente las siguientes técnicas cromatográficas:

❖ Cromatografía líquido-líquido

- Cromatografía a contracorriente (CCD)
- Cromatografía moderna a contracorriente

❖ Cromatografía planar

- Cromatografía preparativa de capa fina (PTLC)
- Cromatografía centrífuga de capa fina (CTLC)
- Cromatografía líquida planar a sobrepresión (OPLC)
- Cromatografía planar multidimensional

❖ Cromatografía de columna

- Cromatografía de filtración de gel
- Cromatografía de columna preparativa
- Cromatografía flash
- Cromatografía líquida al vacío

- ❖ Cromatografía líquida preparativa a presión
 - Cromatografía líquida a baja presión
 - Cromatografía líquida a presión media
 - Cromatografía líquida de alta eficacia o alta presión (HPLC)

- ❖ Cromatografía de gases

Los productos naturales frecuentemente son aislados monitoreando las fracciones de extractos crudos mediante la técnica HPLC. Ya que un compuesto bioactivo generalmente se encuentra en una cantidad muy pequeña respecto a los demás componentes del extracto, el poder de resolución de esta técnica la hace ideal en escalas analíticas (Canell, 1998).

En las últimas décadas, la disponibilidad de diferentes interfaces de ionización ha permitido la fusión de las técnicas cromatográficas con la espectrometría de masas. Esto no sólo ha hecho más fácil y rápida la detección de componentes en productos naturales sino que además ha contribuido en estudios metabólicos y farmacocinéticos, ayudando a la determinación de rutas metabólicas y de eliminación.

En 1999, Vogg y colaboradores, desarrollaron un método de cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas (CL-EM) para la detección de los ésteres diterpenos del tigliano y del ingenano; con la ventaja de poder detectar también compuestos similares y biológicamente inactivos a diferencia del aislamiento guiado por bioensayos. (Vogg, et.al, 1999).

Para el aislamiento y purificación de ésteres de forbol los métodos cromatográficos que más se han utilizado son las cromatografías preparativas de columna y en capa fina así como la cromatografía de líquidos de alta eficacia

(HPLC). Recientemente también se implementó la técnica de cromatografía de rotación locular en contracorriente, en la cual 16 columnas inclinadas enlazadas con un número de separadores internos, son empleadas para contener la fase estacionaria, mientras que la fase móvil es propulsada a través de la fase estacionaria mediante un movimiento rotatorio de las columnas.

Hass y Mittelbach (2000), analizaron la composición de ésteres de forbol en aceite de *J. curcas*, por la técnica de HPLC, usando como eluyente una mezcla isocrática de 80% de acetonitrilo y 20% de agua, y como fase estacionaria una columna empacada C18 (4.6x250mm), obteniendo un tiempo de retención de 6 a 11 minutos. El total de la suma de los picos en ese tiempo, se utilizó para la cuantificación.

Jumat y Waled (2009), determinaron la concentración de los ésteres en aceite de *jatrofa* utilizando una columna similar, pero utilizando como fase móvil una mezcla de acetona:acetonitrilo (63.5:36.5 %v/v). Los picos de los ésteres de forbol se identificaron con base en el tiempo de retención del estándar (5 min). Los porcentajes de ésteres de forbol fueron evaluados tomando en cuenta los picos que aparecieron desde 7 hasta 11 minutos. La curva de calibración se preparó utilizando el 4-forbol.12,13-didecanoato (en metanol) de Sigma, UK como estándar externo.

Para el correcto desarrollo de un método cromatográfico aplicable a la identificación de los ésteres de forbol debe tomarse en cuenta que estos compuestos son sensibles a la luz, a la humedad y al oxígeno, además de poseer una alta toxicidad, lo cual pone en riesgo al investigador que esté trabajando en ello. (Evans, *et al.* 1996).

También es importante conocer los fundamentos de la técnica que se utiliza, en este caso, la cromatografía de líquidos de alta eficacia o alta presión, mejor conocido por sus siglas en inglés como la técnica HPLC (High performance liquid chromatography), la cual es una cromatografía de adsorción que se basa en las

diferencias de comportamiento en la adsorción-desorción de sustancias contenidas en la fase móvil (líquida), sobre la fase estacionaria (sólida).

En el sentido cromatográfico el término adsorción se limita a las interacciones que implican enlaces de hidrógeno o fuerzas electrostáticas. Cuando las interacciones son iónicas en proceso se denomina intercambio iónico.

En cualquier fenómeno de adsorción influyen tres variables independientes, la naturaleza del adsorbente, del disolvente y de las sustancias a separar. Abbott, 1970). La elección de un solvente apropiado se ve afectada por la naturaleza y solubilidad de la mezcla, así como de la fase estacionaria. Generalmente para adsorbentes polares, como alúmina y sílica, la fuerza de adsorción aumenta con la polaridad de las moléculas que se adsorben. Para adsorbentes no polares, por ejemplo carbón activado, o hidrocarburos, la fuerza de adsorción disminuye con la polaridad de la sustancia adsorbida (Stock, 1963).

El poder de elución de un disolvente es la capacidad que tiene para separar los diferentes compuestos encontrados en una mezcla. Para una fase estacionaria polar, el poder de elución decrece en el siguiente orden:

Agua > metanol > etanol > propanol > acetona > acetato de etilo > éter etílico > cloroformo > cloruro de metileno > benceno > tolueno > tricloroetileno > tetracloruro de carbono > ciclohexano > hexano. (Stock, 1963)

El orden de esta serie "eluotrópica" será inverso cuando la fase estacionaria utilizada sea no polar.

La principal diferencia entre HPLC y otros modos de cromatografía de columna es que el diámetro de las partículas de la fase estacionaria es comparablemente bajo (3-10 μm), y estas partículas están compactamente empacadas para tener una columna realmente uniforme. Debido a estas características se requieren presiones muy altas para conducir el solvente cromatográfico o eluyente a través

de la columna. Esta técnica tiene un poder de resolución enorme debido a la uniformidad de la columna y a la gran área superficial disponible para la interacción con los solutos (Canell, 1998).

En HPLC, los modos de separación más comúnmente aplicados al aislamiento de productos naturales son fase normal, fase reversa y en menor medida, permeación en gel y cromatografía de intercambio iónico. La elección del material empacado depende de las propiedades fisicoquímicas del metabolito blanco y de los otros metabolitos presentes en la muestra, así como de factores como el costo, aplicabilidad general y escala de operación. Los eluyentes cromatográficos usados en HPLC típicamente son mezclas de solventes orgánicos o mezclas de ellos con agua, y a veces contienen aditivos como buffers, ácidos, bases o reactivos de pares de iones (Canell, 1998).

➤ Cromatografía de fase normal

La cromatografía de fase normal emplea una fase estacionaria polar, usualmente sílica, y eluyentes cromatográficos de menor polaridad (no acuosos). En esta técnica, los tiempos de retención decrecen con el incremento en la polaridad del solvente. Los solventes más comúnmente usados son hidrocarburos alifáticos como el hexano y el heptano, hidrocarburos halogenados como el cloroformo y el diclorometano, y solventes oxigenados como el dietiléter, el acetato de etilo, y el acetato de butilo. Esta técnica es particularmente útil para analitos que son muy hidrofóbicos, como vitaminas solubles en grasas y otros metabolitos que exhiben baja solubilidad en solventes miscibles con agua (Canell, 1998).

En adición, debido a que la geometría del adsorbente polar está arreglada, la técnica es útil para separar isómeros de posición, la proximidad de los grupos funcionales a la superficie del adsorbente, y en consecuencia la fuerza de interacción, permiten la distinción entre los isómeros (Canell, 1998).

➤ Cromatografía de fase reversa

En esta técnica la fase estacionaria es no polar y el eluyente es polar. El eluyente normalmente se compone de mezclas de solventes orgánicos y agua. A veces se utilizan aditivos como los que se agregan en la técnica de fase normal. Las fases estacionarias más comúnmente usadas son conocidas como materiales químicamente ligados y son partículas coloidales de sílica químicamente derivatizadas con grupos alquilsilil, por ejemplo, octadecil triclorosilano. El grado de hidrofobicidad varía con la longitud de la cadena alquílica unida a la superficie de la sílica, las más comunes son de 1, 2, 4, 6, 8 y 18 átomos de carbono. Los solventes más comúnmente usados son el acetonitrilo, el metanol y el tetrahidrofurano. Los solutos tienden a eluir en orden de hidrofobicidad ascendente, y la elución es acelerada incrementando la proporción del solvente orgánico en el eluyente. Como la mayoría de los metabolitos secundarios poseen algún grado de hidrofobicidad, esos soportes son buenos cuando se trabaja con productos naturales. En adición, la mayoría de los extractos crudos naturales son, por su naturaleza, altamente heterogéneos y tienden a exhibir mejor solubilidad en mezclas de agua con solventes orgánicos miscibles en agua. (Canell, 1998).

Instrumentación de la técnica HPLC: en la figura 1.5 se muestra un diagrama simplificado de un equipo HPLC.

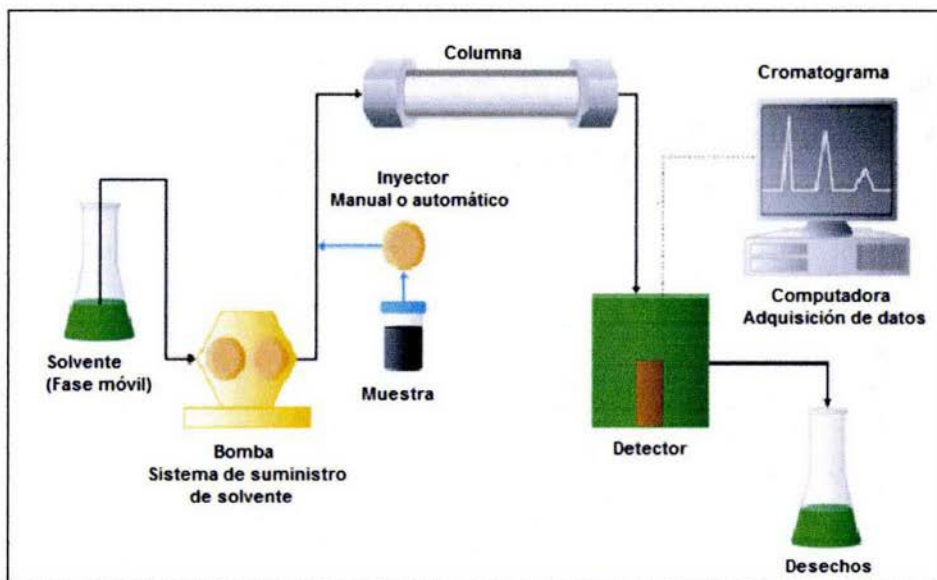


Figura 1.7 Sistema de la técnica HPLC (<http://www.waters.com>, 2009)

Como se observa en la figura 1.5, la instrumentación de la técnica HPLC consta de una bomba suministradora de solvente, un dispositivo para introducir la muestra, ya sea una válvula de inyección manual o un cargador automático de muestras, una columna, un detector, y un dispositivo para adquirir los datos de salida del detector.

Existen varios tipos de detectores:

- Detectores UV. Ofrecen gran sensibilidad y son populares pues casi todos los compuestos naturales presentan absorptividad de la luz UV a bajas longitudes de onda (195-210 nm). Casi todos los solventes utilizados en fase reversa son transparentes al UV a esas longitudes de onda.

- Detector de arreglo de fotodiodos UV. Permiten la colección de datos de absorbancia UV a través de un rango de muchas longitudes de onda simultáneas, por ello es muy útil como herramienta en el desarrollo de un método, para verificar purezas de picos y para distinguir e identificar componentes.
- Detectores de índice de refracción (IR). Este tipo de detector es universal, pero se limita a eluciones isocráticas (de un solo disolvente). Sólo aquellos analitos cuyo IR es idéntico al del eluyente no pueden ser detectados. Estos detectores son menos sensibles que los de UV, lo cual es una ventaja cuando se trabaja con grandes cantidades de una muestra, por lo tanto este método de detección es popular en operaciones a escalas de procesos de producción.

Las señales producidas por un detector al responder ante la presencia de los analitos son llamadas cromatogramas.

Al analizar un cromatograma es importante tener en cuenta los parámetros de retención:

- Tiempo muerto (T_M , T_0). Tiempo para que una especie no retenida (disolvente o eluyente) alcance el detector.
- Tiempo de retención. Tiempo que tarda un analito en alcanzar el detector. Es particular para cada molécula en un sistema determinado, y depende también del solvente elegido para la elución.
- Factor de capacidad (k'). Es la cantidad más importante en cromatografía en columna. Para un conjunto dado de parámetros de operación, k' es una medida del tiempo transcurrido en la fase estacionaria en relación con el tiempo transcurrido en fase móvil.

Dicho de otra forma, el factor de capacidad es el tiempo adicional que una banda de soluto requiere para eluir, en comparación con un soluto no retenido (para el cual $k' = 0$), dividido entre el tiempo de elución de una banda no retenida:

$$k' = (t_R - t_M) / t_M$$

Donde, k' es el factor de capacidad, t_R es el tiempo de retención del analito y t_M es el tiempo muerto. Para valores de k' mayores que 10 se desperdicia tiempo analítico valioso. Los valores menores que la unidad no proporcionan una resolución adecuada entre los solutos de elución temprana.²⁴

Para la técnica de cromatografía en capa fina se utiliza el factor de referencia (R_f), el cual indica la relación entre el avance del analito y del disolvente a través de la placa.

- Resolución. En una columna, es una medida de su capacidad para separar dos analitos. Si la resolución es igual o mayor a 1.5, entonces se puede decir que la separación es completa. Su valor se calcula con la siguiente fórmula:

$$R_s = [2 (t_{RB} - t_{RA})] / (W_A + W_B)$$

Donde, A y B son dos componentes distintos, R_s es la resolución, y W_A y W_B son las anchuras de los picos correspondientes a A y B.

1.3.5 Técnicas de caracterización comunes para los ésteres de forbol.

Desde hace 40 años la resonancia magnética nuclear (RMN) ha sido el método espectroscópico más importante para la elucidación de estructuras moleculares. El poder de esta técnica reside no solo en definir el número y tipos de núcleos presentes en una molécula orgánica, sino también en describir sus ambientes químicos individuales y, más importante, la manera en que están relacionados.

Para la elucidación de estructuras de compuestos orgánicos las técnicas de RMN más utilizadas son las de protón (^1H) y carbono (^{13}C). Actualmente las técnicas de RMN homo y heteronucleares de dos dimensiones permiten conocer asociaciones particulares de los átomos.

Otras técnicas de utilidad en la elucidación de estructuras moleculares son la espectroscopía infrarroja (IR) y la espectrometría de masas (EM), las cuales suelen ser complementarias a la RMN. La primera da información sobre los grupos funcionales que se encuentran en la estructura, y la segunda permite conocer el peso molecular del compuesto, así como identificar sus fragmentos químicos. Con frecuencia se encuentra éste como detector de un cromatógrafo de gases, en una técnica híbrida conocida por sus iniciales en inglés, GC-MS (cromatografía de gases - espectroscopía de masas), y puede ser utilizada para análisis de gases o de muestras volátiles o que pueden ser convertidas en un derivado volátil.

En la figura 1.8 se muestra el espectro de resonancia magnética protónica para la estructura básica de los ésteres de forbol.

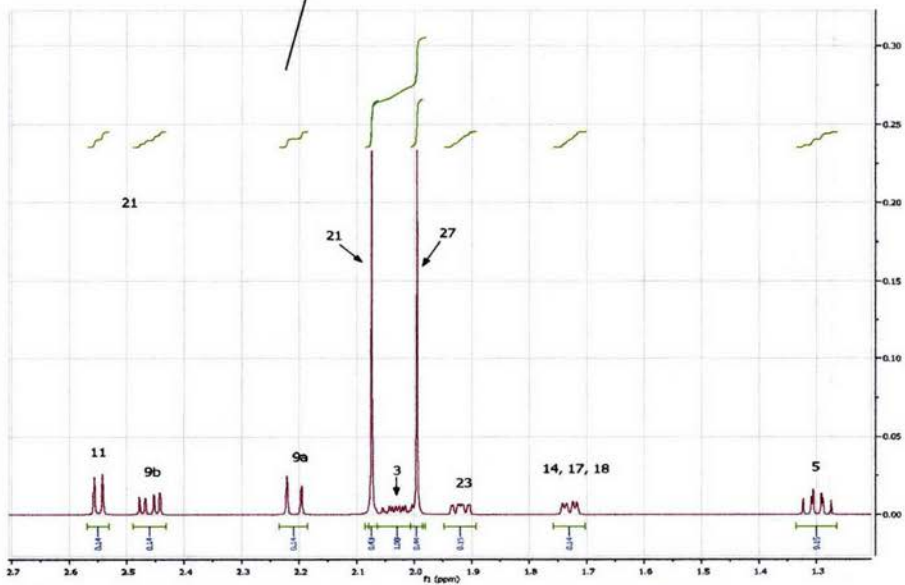
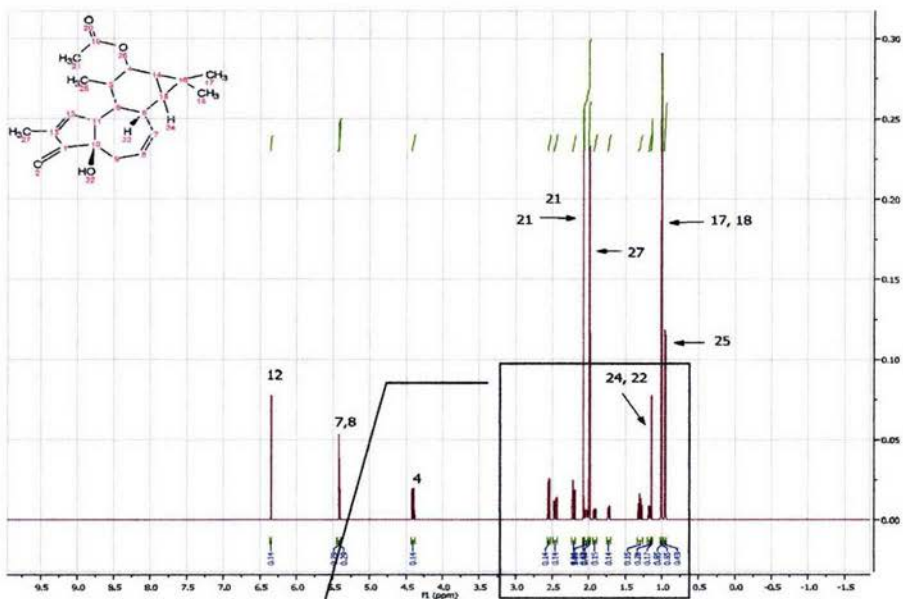
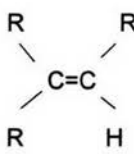


Figura 1.8 Espectro de RMN-¹H. (Obtenido con el software de predicción de espectros MestReNova)

Los espectros de infrarrojo son gráficos donde se representa en las abscisas, la radiación infrarrojo absorbida por las uniones químicas en términos de número de onda de la radiación (de 4000 a 200 cm^{-1}) y en las ordenadas la absorbancia de las mismas.

En la siguiente tabla se muestran las principales frecuencias vibracionales relacionadas con las uniones químicas presentes en la estructura básica de los ésteres de forbol:

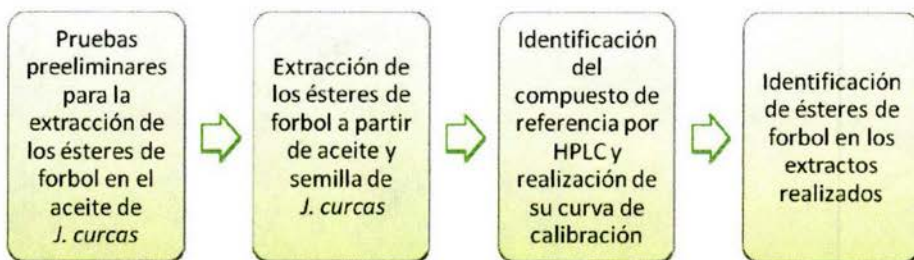
Tabla 1. Frecuencias vibracionales de las uniones químicas presentes en la estructura de los ésteres de forbol.(Colección espectros infrarrojo. Fac. Química UNAM).

Grupo	Tipo de vibración	Frecuencia (cm^{-1})
	Vibraciones C-H	
Metilos (-CH ₃)	Estiramiento asimétrico	2960
	Estiramiento simétrico	2870
	Torsión asimétrica	1460
	Torsión simétrica	1380
Metilenos (-CH ₂)	Estiramiento asimétrico	2925
	Estiramiento simétrico	2850
	Torsión de tijera	1470
	Torsión de balanceo	725-720
Alqueno trisustituido 	Torsión C-H fuera del plano	840-800
Alqueno trisustituido	Estiramiento C=C	1600-1640

Alcohol R-OH	Estiramiento O – H Torsión O – H	3650-3200 1500-1300 , 650
	Estiramiento C – OH	1200-1050 1050 alcohol primario 1100 alcohol sec. 1150 alcohol terciario
Cetona $\begin{array}{c} R \\ \diagdown \\ C=O \\ \diagup \\ R \end{array}$	Estiramiento C=O	1710-1680 1100 y 1300 (de baja intensidad en cetonas alifáticas)
Éster $\begin{array}{c} R - C - O - R \\ \\ O \end{array}$	Estiramiento C=O Estiramiento simétrico y asimétrico C – O – R	1750-1735 Dos bandas entre 1300-1050 1190 alquil éster 1165 metil éster

II. Metodología

2.1 Diagrama general de la investigación



2.2 Origen de la semilla

- Para la primera etapa experimental se trabajó con aceite de *J. curcas* proveniente del estado de Chiapas.
- Para la extracción e identificación de los ésteres de forbol se trabajó con semilla proveniente de los municipios de Zacatlán, Puebla y de Rosamorada, Nayarit.
- Las semillas de Nayarit, se encontraban nombradas de acuerdo al lugar donde fueron recolectadas (principalmente terrenos particulares), y clasificadas como tóxicas y no tóxicas de acuerdo a observaciones empíricas de los pobladores del municipio. Se reportó que las semillas etiquetadas como tóxicas, habían causado síntomas de diarrea, dolor de estómago y de cabeza, cansancio y sudoración intensa en personas que las habían consumido accidentalmente, mientras que se observaba que las no tóxicas eran consumidas por algunas aves.

2.3 Preparación de la materia prima para su utilización

En el caso del aceite de Chiapas no fue necesario realizar nada previamente a su utilización pues este ya venía empacado en bolsas pequeñas de plástico, las cuales se mantuvieron en refrigeración para evitar la descomposición de sus componentes. Cabe mencionar que al recibir las ya llevaban varios meses almacenadas sin estar en refrigeración, por lo que la calidad del aceite era dudosa.

Las semillas del estado de Nayarit y de Puebla, previamente fueron secadas al sol para su utilización, pues la humedad interfiere en los procesos de molienda y posteriormente en los de extracción de los compuestos deseados.

Para las extracciones de los ésteres de forbol realizadas directamente de la semilla, primero se eliminó la cáscara manualmente con ayuda de unas pinzas de punta para obtener la almendra de piñoncillo y posteriormente poder ser triturada. Una vez hecho esto, la semilla fue seleccionada de acuerdo a su buen aspecto y su coloración blanca, evitando utilizar cualquier semilla que mostrara deterioro físico. La cáscara y las semillas fueron pesadas por separado para obtener la relación de peso semilla-cáscara.

El aceite de *J. curcas* fue obtenido por extrusión mecánica de las semillas en una prensa hidráulica hasta una presión de 20000 psig. Se trabajó con diferentes lotes de 400 g de semilla proveniente del municipio de Rosamorada, Nayarit. Se determinó la cantidad de aceite por peso de semilla.

En otro experimento el aceite se obtuvo por medio de extracción con hexano, para realizar comparaciones de las cantidades obtenidas mediante este procedimiento y el mecánico. Este proceso también se conoce como desengrasado y es de utilidad cuando se desea eliminar la materia grasa de la materia prima a utilizar. Para ello el material y reactivos utilizados fueron:

- ✓ Equipo de extracción soxhlet (Figura 7)
- ✓ Matraz bola de 500 mL con una boca
- ✓ Canastilla de calentamiento
- ✓ Refrigerante
- ✓ Rotavapor y baño de agua marca Büchi
- ✓ Bomba de agua
- ✓ 2 mangueras de látex
- ✓ Hexano (R.A.)
- ✓ Termómetro de -20 a 400° C

Procedimiento: Se colocaron 60 g de semilla molida, sin cáscara, en un cartucho de celulosa, éste se introdujo en el tubo contenedor del equipo Soxhlet y el refrigerante se colocó sobre el tubo. Se añadieron 150 mL de hexano en el matraz bola agregando piedras de ebullición. La temperatura fue controlada de 60 a 65°C. El aparato hace descarga de disolvente aproximadamente cada 30 minutos. El disolvente del matraz se cambia periódicamente y se guarda para recuperar la grasa extraída.

Cada cierto tiempo se realizó la prueba de papel filtro la cual consiste en mojar el papel con el disolvente que ha pasado por la muestra, hasta no observar una mancha de grasa en él, y así se considera que el material está desengrasado. Para recuperar el aceite extraído, el hexano es evaporado en un rotavapor a una temperatura controlada de 50°C.



Figura 2.1 Equipo de extracción Soxhlet

2.4 Extracción de la fracción tóxica (que contiene los ésteres de forbol) a partir del aceite proveniente de Chiapas.

Material y reactivos:

- ✓ Embudo de separación de 50 mL
- ✓ Vaso de precipitados de 50 mL
- ✓ Agua destilada, metanol (R.A) y hexano (R.A.)

A partir del aceite proveniente de Chiapas se realizaron dos tipos de extracciones.

a) Extracción con metanol directamente del aceite.

Procedimiento: Se tomaron 20 mL de aceite y se colocaron en el embudo de separación, se extrajeron con 10 mL de metanol (5x).

b) Por partición de disolventes, hexano/agua-metanol (1:9 v/v). La fracción polar (agua-metanol) contiene los ésteres de forbol.

Procedimiento: Se tomaron 20 mL de aceite y se colocaron en el vaso de precipitados, se agregaron 20 mL de hexano (35°C) y la mezcla se agitó durante unos minutos. Posteriormente se colocó en el embudo de separación y se extrajo por quintuplicado con 10 mL de una mezcla metanol-agua (9:1 v/v). La fase polar se concentró en un rotavapor hasta eliminar el disolvente.

2.5 Extracción de la fracción tóxica a partir de la semilla proveniente de Nayarit e identificación de los ésteres de forbol por medio de Cromatografía en capa fina.

Material y reactivos

- ✓ Matraz volumétrico de 150 mL
- ✓ Matraz kitazato de 250 mL
- ✓ Embudo de separación de 250 mL
- ✓ Embudo Büchner
- ✓ Placas cromatográficas
- ✓ Tubos capilares de vidrio
- ✓ Cámara de elución
- ✓ Lámpara UV
- ✓ Hexano, metanol y éter etílico (R.A.)
- ✓ Agua destilada
- ✓ Bicarbonato de sodio (Na_2CO_3)
- ✓ Cloruro de sodio (NaCl)
- ✓ TPA (5mg/mL)

Procedimiento: Se pesaron 50 g de semilla sin cáscara y se trituraron en un mortero de porcelana hasta obtener un polvo fino. Este último se colocó en el matraz volumétrico y se agregaron 100 mL de metanol, la mezcla se agitó durante 6 horas y al finalizar la agitación se le colocó un tapón de corcho y la mezcla se dejó macerando hasta el siguiente día. Al término del tiempo, la mezcla se filtró en un embudo Büchner, el sólido se recuperó y se le agregaron 50 mL de metanol, agitando de nuevo la mezcla por 2 horas. La mezcla se filtró y se juntaron los extractos. Al líquido resultante se le agregaron 40 mL de agua destilada obteniendo un volumen de 150 mL. La mezcla se extrajo con 50 mL de hexano (3x) para eliminar el material graso. Posteriormente se agregó NaCl para enriquecer iónicamente la fase acuosa, la cual se extrajo con 50 mL de éter etílico (5x) para obtener los ésteres de forbol. La fase orgánica se lavó con una solución de Na_2CO_3 al 1%. Finalmente se eliminó el éter etílico en un rotavapor hasta obtener un sólido blanco.

Para la identificación de los ésteres de forbol por cromatografía en capa fina se utilizó como compuesto de referencia el 4 β -12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), 5mg/mL, disuelto en éter etílico grado cromatográfico (grado HPLC). El sólido obtenido en la extracción se disolvió en 1 mL de éter etílico del mismo grado. Tanto la muestra como el compuesto de referencia se aplicaron en la misma placa, y ésta se eluyó con mezclas de diferentes proporciones de cloroformo, acetonitrilo y metanol. Las placas se revelaron con luz UV.

2.6 Pruebas para la obtención de un derivado estable de los ésteres de forbol

Debido a que los ésteres de forbol son compuestos susceptibles a la hidrólisis, la oxidación, la transesterificación y la epimerización en ciertas condiciones de luz, temperatura y ambiente químico, éstos son difíciles de manipular durante un largo periodo de tiempo (Becker *et al.* 2007). Por esta razón,

en un principio se planteó que una vez extraídos los ésteres de forbol, se realizaría una reacción química para la obtención de un derivado estable de ellos, al cual pudieran aplicarse diversas técnicas de análisis y purificación, tales como la cromatografía preparativa, la de líquidos de alta presión o la de gases, sin sufrir descomposición alguna.

En ese momento, la materia prima disponible era el aceite que se obtuvo mecánicamente a partir de la semilla proveniente de Nayarit, y ya que en su mayoría fue destinado a su transesterificación para la obtención de biodiesel, únicamente se contaba con 50 mL de él. La cantidad de semilla con la que se contaba también era muy limitada (30 g), pues la mayoría se utilizó para la obtención del aceite.

La extracción de la fracción tóxica presentó el inconveniente de que el aceite era muy viscoso y se formaba una emulsión muy estable entre la fase acuosa y la fase orgánica. Por lo tanto se realizó la extracción directamente de la semilla (30 g), la cual fue molida en un mortero de cerámica y se le agregaron 50 mL de cloroformo homogeneizándose durante cinco minutos, posteriormente la mezcla se filtró y la semilla se recuperó para realizar la extracción nuevamente cuatro veces más, esto se realizó en un baño de hielo para evitar la evaporación del disolvente. Los cinco extractos se juntaron y el disolvente fue eliminado mediante un rotavapor a una temperatura de 30°C, obteniendo como residuo 6 mL de un líquido oleoso y un sólido blanco. Este residuo fue disuelto en 15 mL de acetato de etilo y se filtró para eliminar las impurezas insolubles. Este último se concentró hasta un volumen de 5 mL.

Para la obtención del derivado estable de los ésteres de forbol se realizó la reacción de obtención de éteres a partir de alcoholes conocida como "síntesis de Williamson", la cual es una reacción entre un alcóxido y un halogenuro de alquilo (Figura 2.2).

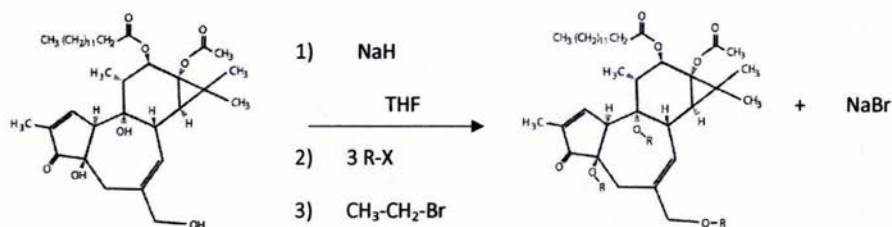


Figura 2.2. Obtención de un derivado de éster de forbol, mediante la "síntesis de Williamson", ejemplo a partir del TPA.

Los reactivos utilizados fueron:

- Hidruro de Sodio (NaH) (P.M. 23.99 g/mol) (Sigma-Aldrich, U.S.A.)
- Bromuro de etilo (P.M. 94.95 g/mol) (Sigma-Aldrich, U.S.A.)
- THF como disolvente (J.T.Baker, U.S.A.)

Tomando en cuenta que según lo reportado en la bibliografía consultada, las semillas de *J. curcas* provenientes de México contienen aproximadamente entre 0.1 y 0.3 mg de ésteres de forbol por gramo de semilla, se realizaron los cálculos estequiométricos de la reacción como si la máxima cantidad presente de ésteres de forbol fuese de 0.4 mg/g de semilla. También se tomó en cuenta el peso molecular del TPA (618.8 g/mol). Los cálculos se muestran a continuación:

- 30 g de semilla * 0.4 mg de ésteres de forbol /g de semilla= 12 mg de ésteres de forbol
- 0.012 g / (618.8 g/mol) = 1.94x10⁻⁵ mol de ésteres de forbol

Considerando que se necesitan tres equivalentes tanto de bromuro de etilo como de NaH, pues la estructura de los ésteres de forbol contiene tres grupos hidroxilo, entonces se requieren:

$3 \times 1.94 \times 10^{-5}$ moles de bromuro de etilo = 5.82×10^{-5} moles * 94.95 g/mol = 5.5 mg de bromuro de etilo y 5.82×10^{-5} moles * 23.99 g/mol = 1.4 mg de NaH.

Procedimiento para la reacción: El extracto de la fracción tóxica se colocó en un matraz bola de 50 mL, se le añadieron 10 mL de THF, 2 mg de NaH y 6 mg de bromuro de etilo. La mezcla se mantuvo en agitación durante 6 horas a una temperatura de 35°C.

2.7 Diseño de un método de HPLC para la identificación y cuantificación de los ésteres de forbol.

El método HPLC para la determinación de ésteres de forbol utilizado en este proyecto, está basado en el método desarrollado por Hass y Mittelbach en el año 2000.

Material y reactivos:

- ✓ Módulo de separación Waters 2695
- ✓ Detector de arreglo de fotodiodos Waters 2996
- ✓ Columna Waters C18 de 4.6 x 250 mm
- ✓ Compuesto de referencia: 4 β ,9 α ,12 β ,13 α ,20-pentahidroxitiglia-1,6-dien-3-ona-12-tetradecanoato 13-acetato (tetradecanoilforbolacetato (TPA), Sigma UK).
- ✓ Disolventes: acetato de etilo, acetonitrilo y agua, (J.T.Baker, grado cromatográfico). *Todos los disolventes son previamente filtrados a través de una membrana en un equipo millipore.

Condiciones de elución:

- ✓ Eluyente: Acetonitrilo/agua (80:20%v/v)
- ✓ Flujo de elución: 1mL/min

- ✓ Temperatura de trabajo: 25°C
- ✓ Volumen de inyección: 50 µL

Propiedades fisicoquímicas y estabilidad del TPA: (Sigma Prod. No. P 8139)

Apariencia: Película incolora

Fórmula molecular: $C_{36}H_{56}O_8$

Peso molecular: 618.8 g/mol (anhidro)

Punto de fusión: 72°C

Solubilidad: el TPA es soluble en acetona, acetonitrilo, DMSO, acetato de etilo, etanol y cloruro de metileno, pero es prácticamente insoluble en agua. Para preparar soluciones acuosas de TPA, lo mejor es comenzar con una solución concentrada en DMSO (20mM) y diluir una muy pequeña alícuota de esta solución rápidamente con agua o buffer. El compuesto también puede ser disuelto en un detergente soluble en agua tal como el Cremophor EL a 37°C y después ser diluido con un medio acuoso.

Las soluciones de TPA son sensibles al ácido y a condiciones alcalinas. Las soluciones en cloruro de metileno y acetato de etilo (a concentraciones de 0.2mM) o en DMSO (20 mM) no muestran ninguna autooxidación detectable si se almacenan en luz difusa y a temperatura ambiente durante 14 días.

Las soluciones en acetona no se deben almacenar a temperatura ambiente. Las soluciones stock en acetona, cloruro de metileno, acetato de etilo o DMSO pueden ser usadas hasta tres meses si se almacenan a 4°C en la oscuridad. Las soluciones en DMSO almacenadas a -20°C en la oscuridad no muestran degradación del compuesto durante al menos 6 meses.

- Preparación de las soluciones de TPA para construir la curva de calibración.

Se preparó una solución inicial de TPA de concentración de 5 mg/mL en acetato de etilo (grado cromatográfico). A partir de esa solución se tomaron las alícuotas correspondientes para la preparación de las demás soluciones de la curva (10-500 ppm), llevándolas a su volumen final con acetonitrilo para no alterar la composición de la fase móvil evitando así obtener señales cromatográficas indeseadas.

Para obtener la curva de calibración se inyectaron 50µL de cada solución (por triplicado). Los picos obtenidos en los cromatogramas se integraron y se promediaron las áreas de las tres corridas, para posteriormente obtener una gráfica de área como una función de la concentración del compuesto de referencia ($A = f(c)$).

2.8 Extracción de los ésteres de forbol a partir del aceite y de las semillas de *J. curcas* y preparación de las muestras para su cuantificación

Para fines de la determinación de los ésteres de forbol presentes en el aceite y en la semilla de *J. curcas* se llevaron a cabo los siguientes procedimientos de extracción:

a) Aceite

En un matraz volumétrico de 50 mL se colocaron 10 g de aceite de *J. curcas* proveniente de Rosamorada, Nayarit y se le agregaron 10 mL de hexano, posteriormente se filtró para eliminar los residuos sólidos presentes.

Ya que el metanol y el hexano son inmiscibles, el aceite se extrajo sucesivamente con metanol, por quintuplicado. Los extractos se juntaron y se

concentraron en un rotavapor a una temperatura de 35°C, hasta eliminar el disolvente. El residuo obtenido fue disuelto en acetato de etilo grado HPLC y se llevó a un volumen final de 5 mL utilizando acetonitrilo grado HPLC, obteniendo así la solución final para llevar a cabo la cuantificación.

b) Semilla

Se pesaron 25 g de semilla sin cáscara (Rosamorada, Nayarit). Posteriormente se trituraron en un mortero de cerámica hasta obtener un polvo. Las extracciones se realizaron con diferentes disolventes para probar su efectividad, se utilizó metanol, etanol, acetona y cloruro de metileno. El polvo de semilla obtenido se colocó en un matraz volumétrico de 150 mL y se agregaron 50 mL del disolvente elegido, ésta mezcla se dejó en agitación durante dos horas, posteriormente se filtró al vacío para recuperar el extracto. Este procedimiento se repitió tres veces, y al final se juntaron todos los extractos. El extracto final se filtró a través de una membrana para eliminar los residuos sólidos. Posteriormente se concentró en un rotavapor a una temperatura de 35°C, hasta la eliminación del disolvente. El residuo obtenido se disolvió en acetato de etilo grado HPLC y se llevó a un volumen final de 5 mL con acetonitrilo grado HPLC, obteniendo así la solución final para la cuantificación.

c) Bagazo

El residuo obtenido después de prensar la semilla para la obtención de aceite, es conocido como bagazo. Nos interesa conocer el contenido de ésteres de forbol en él para evaluar un parámetro de su toxicidad. Para ello se llevó a cabo la misma metodología que con la semilla, a excepción de que el bagazo se molió mecánicamente hasta obtener un polvo. Posteriormente se pesaron 25 g de bagazo y se realizó el procedimiento de extracción.

El procedimiento para preparar la solución a cuantificar es el mismo que para la semilla.

d) Obtención de un extracto crudo

Se desea obtener una cantidad suficiente de ésteres de forbol a partir de la semilla de *J. curcas*, para su purificación y caracterización, para ello se debe trabajar con una cantidad grande de materia prima. Se pesó un kilogramo de semilla con cáscara, y se molió mecánicamente. La harina fue macerada durante dos semanas en 2 litros de metanol, posteriormente se colocó a reflujo durante 6 horas a una temperatura no mayor a 35°C. Después se filtró a vacío para recuperar el extracto el cual se filtró a través de una membrana para eliminar los residuos sólidos. Para la determinación de ésteres de forbol se tomó un mililitro de la solución final y se analizó por el método cromatográfico descrito anteriormente. Para la obtención del extracto crudo el solvente es eliminado en un rotavapor a una temperatura no mayor a 35°C.

III. Resultados

3.1 Relación de peso cáscara-semilla

Tabla 2. Relación de peso cáscara-semilla

	Peso de la semilla (g)	semilla sin cáscara (g)	cáscara (g)	% semilla
	0.45	0.261	0.189	58.0
	0.391	0.237	0.154	60.6
	0.593	0.402	0.191	67.8
	0.417	0.213	0.204	51.1
	0.401	0.232	0.169	57.9
	0.569	0.347	0.222	61.0
	0.473	0.302	0.171	63.8
	0.498	0.306	0.192	61.4
	0.421	0.266	0.155	63.2
	0.437	0.255	0.182	58.4
	0.465	0.282	0.182	60.3
Promedio	0.47	0.28	0.18	60.32

3.2 Determinación del porcentaje de aceite en la semilla de *J. curcas*

Observaciones:

- ✓ No se recomienda realizar el prensado de la semilla sin cáscara, pues se observó la formación de una pasta la cual no permitió la obtención del aceite y la prensa quedó atascada.

Tabla 3. Determinación del porcentaje de aceite obtenido por el método de extracción con prensa hidráulica.

Nombre de la muestra	Aceite (g)	Bagazo (g)	Pérdidas por manejo (g)	Aceite colectado (%W)
Julia 4	61.971	329.281	8.748	15.49
Marychuy 2	63.758	331.281	4.961	15.94
Perla 6	28.714	369.378	1.908	7.18
Sindi 3	33.887	364.298	1.815	8.47
Susie 5	18.071	374.723	7.206	4.52

Tabla 4. Determinación del porcentaje de aceite por el método de extracción con equipo Soxhlet.

Nombre de la muestra	Cantidad de semilla (g)	Cantidad de aceite obtenida (g)	Aceite obtenido (%W)
Julia 4	60	10.8	18
Marychuy 2	60	11.4	19
Perla 6	60	6.27	10.45

3.3 Extracción de la fracción tóxica a partir del aceite de Chiapas

Observaciones:

- ✓ Al agregar metanol al aceite, éste adquirió una coloración rosa, por ello se realizaron pruebas agregando diferentes disolventes a 1 mL de aceite en un tubo de ensaye y agitando. Los resultados se muestran a continuación:

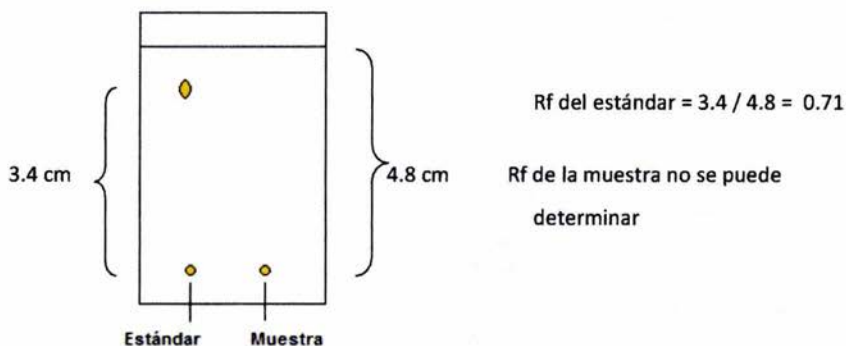
Tabla 5. Pruebas de solubilidad del aceite

Disolvente(s) agregado(s)	Observaciones
Hexano + agua	2 fases, sin cambio de color
Hexano + metanol	2 fases, coloración rosa (fase alcohólica)
Agua	2 fases, sin cambio de color
Metanol	2 fases, coloración rosa (fase alcohólica)
Éter etílico	1 fase, sin cambio de color
Éter etílico + agua	2 fases, sin cambio de color
Éter etílico + metanol	1 fase, coloración rosa
Éter etílico + agua/metanol (1:9)	2 fases, coloración rosa (fase acuosa)
Etanol	2 fases, coloración rosa (fase alcohólica)

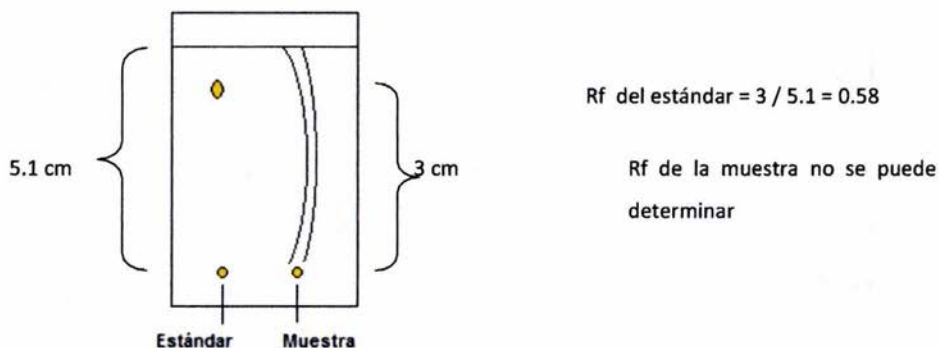
3.4 Extracción de la fracción tóxica a partir de la semilla proveniente de Nayarit e identificación de los ésteres de forbol por medio de cromatografía de capa fina (CCF).

A continuación se muestran los resultados obtenidos al revelar con luz UV las placas cromatográficas. (Figuras 3.1-3.4).

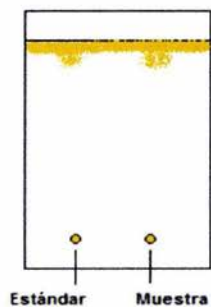
a) Figura 3.1 Sistema de elución: Acetonitrilo.



b) Figura 3.2 Sistema de elución: Acetonitrilo/Cloroformo (1:1) v/v



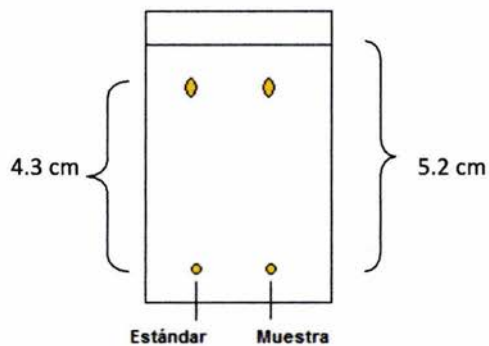
c) Figura 3.3 Sistema de elución: Metanol/Acetonitrilo (7:3) v/v



Rf del estándar no se puede determinar

Rf de la muestra no se puede determinar

d) Figura 3.4 Sistema de elución: Acetonitrilo/Metanol (9:1) v/v



Rf del estándar = $4.3/5.2 = 0.83$

Rf de la muestra = $4.3/5.2 = 0.83$

3.5 Pruebas para la obtención de un derivado estable de los ésteres de forbol

Al finalizar la reacción se obtuvieron 16 mg un sólido blanco, el cual se caracterizó por espectroscopía IR, el espectro se muestra en la figura 3.5

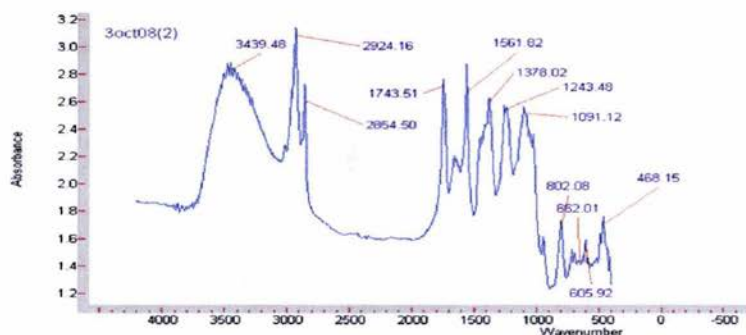
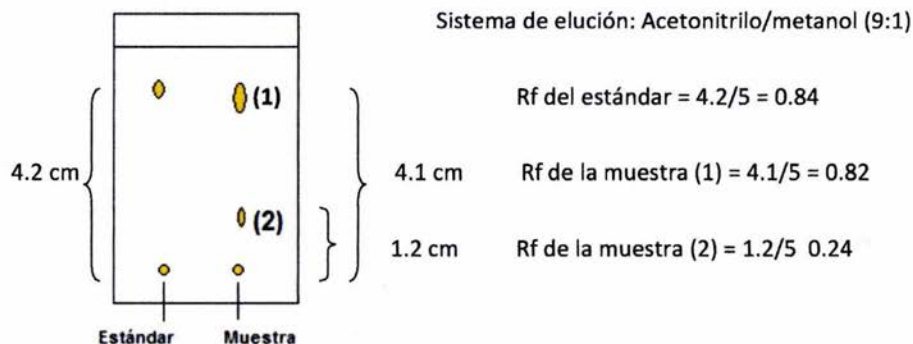


Figura 3.5. Espectro IR del producto obtenido por la reacción de Williamson

También se realizó la cromatografía de capa fina del producto obtenido contra el compuesto estándar (TPA), para verificar la presencia de ésteres de forbol, o sus derivados. El resultado se muestra en la figura 3.6

Figura 3.6



Debido a la pequeña cantidad obtenida de producto, no se pudieron realizar otros experimentos de caracterización como resonancia magnética nuclear o análisis elemental.

3.6 Diseño de un método de HPLC para la identificación y cuantificación de los ésteres de forbol

3.6.1 Espectros de absorción

Es necesario conocer los espectros de absorción tanto del disolvente como del compuesto de referencia para elegir una longitud adecuada a la cual trabaje el detector del sistema cromatográfico. En la figura 3.7 se muestran los espectros correspondientes.

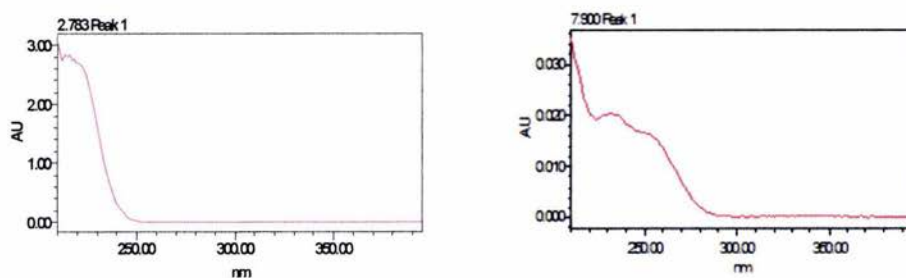


Figura 3.7. Espectros de absorción del acetato de etilo (izquierda) y del TPA (derecha).

3.6.2 Cromatogramas del TPA y los disolventes utilizados

En las figuras 3.8 – 3.16 se muestran los cromatogramas correspondientes a los disolventes y a algunas soluciones del compuesto estándar, con sus respectivos datos correspondientes a tiempo de retención y área integrada de los picos.

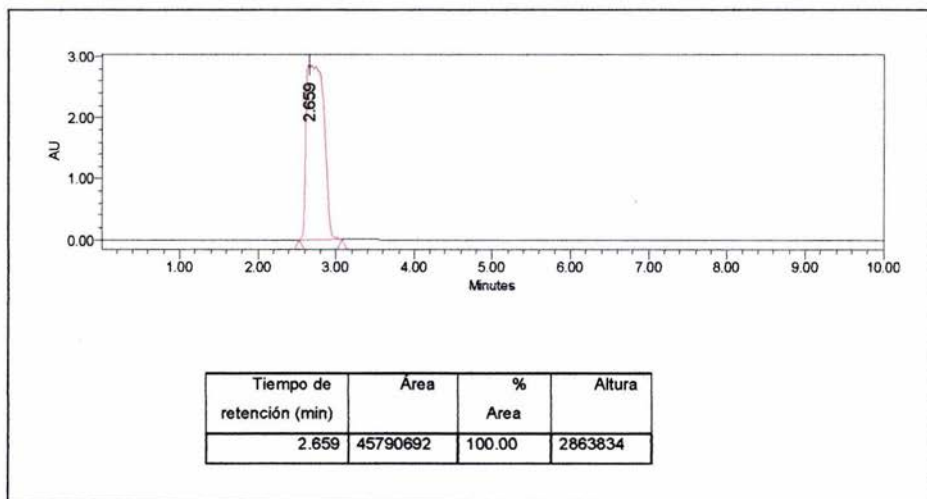


Figura 3.8. Cromatograma acetona. Fase móvil: acetonitrilo

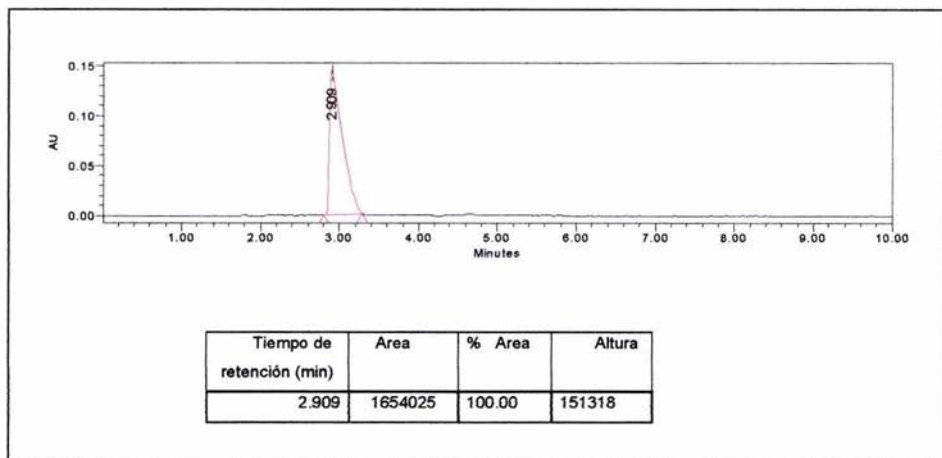


Figura 3.9 Cromatograma acetato de etilo. Fase móvil: acetonitrilo

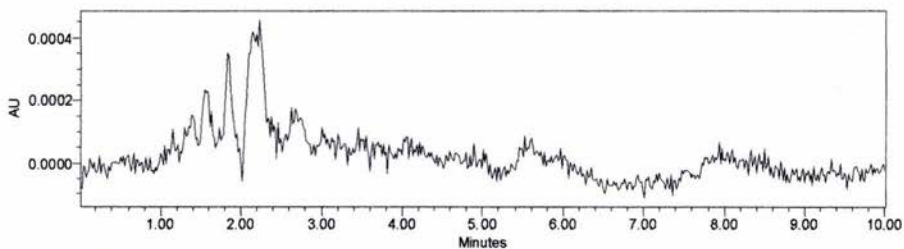
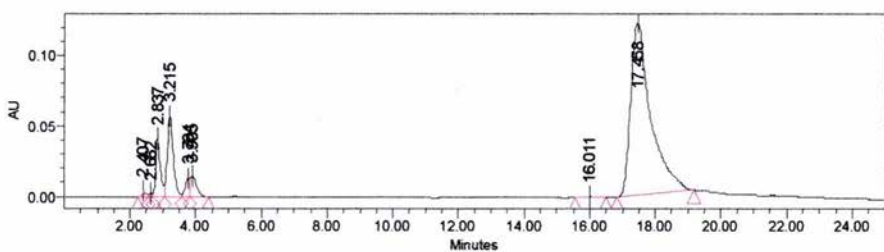
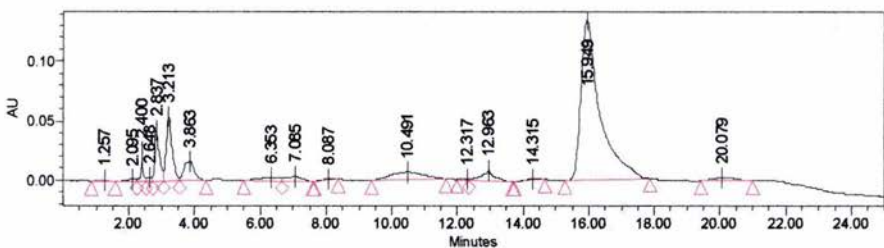


Figura 3.10 Cromatograma acetonitrilo. Fase móvil: acetonitrilo

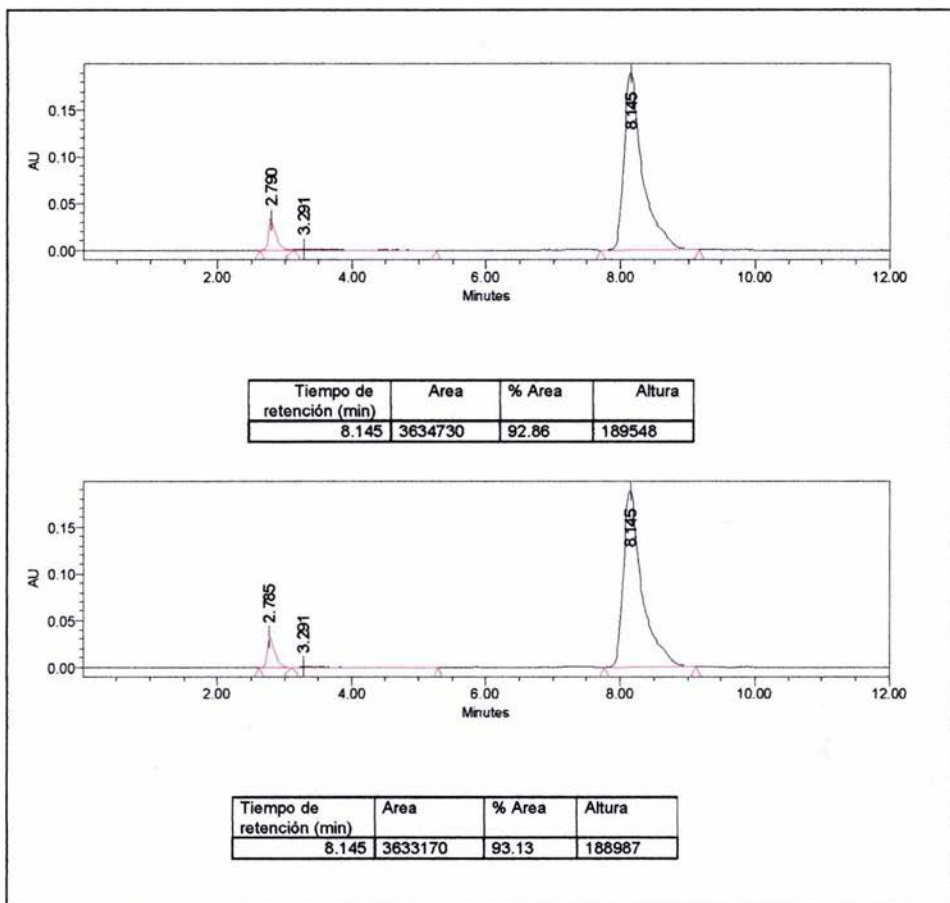


Tiempo de retención (min)	Area	% Area	Altura
17.458	5180170	76.89	1222298



Tiempo de retención (min)	Area	% Area	Altura
15.949	5464059	66.35	134416

Figuras 3.11 - 3.12. Estándar, 200 ppm. Fase móvil Acetonitrilo/Agua (80/20%v/v)



Figuras 3.13 - 3.14. Estándar, 200 ppm. Fase móvil 100% acetonitrilo

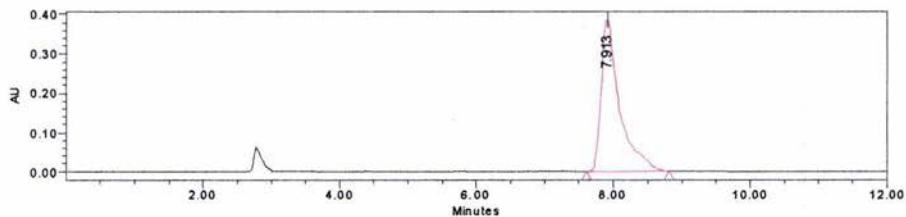


Figura 3.15. Estándar, 400 ppm. Fase móvil 100% acetonitrilo

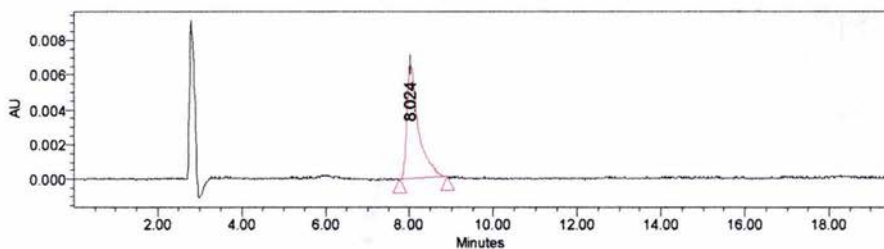


Figura 3.16. Estándar, 10 ppm. Fase móvil 100% acetonitrilo

3.6.3 Curvas de calibración del TPA

En la tabla 6 se muestran los promedios, de tres valores, correspondientes a las áreas de los picos cromatográficos en función de las concentraciones de TPA.

Tabla 6. Datos de la curva de calibración del TPA

Concentración (mg/mL)	Concentraci ón (ppm)	Promedio de área del pico
0.01	10	128620
0.02	20	305436
0.04	40	675754
0.05	50	856478
0.06	60	1043494
0.08	80	1379731
0.1	100	1784009
0.2	200	3633950
0.3	300	5554048
0.4	400	7228347
0.5	500	9297028

En la figura 3.17 se muestra la curva de calibración obtenida de acuerdo a los datos de la tabla 6.

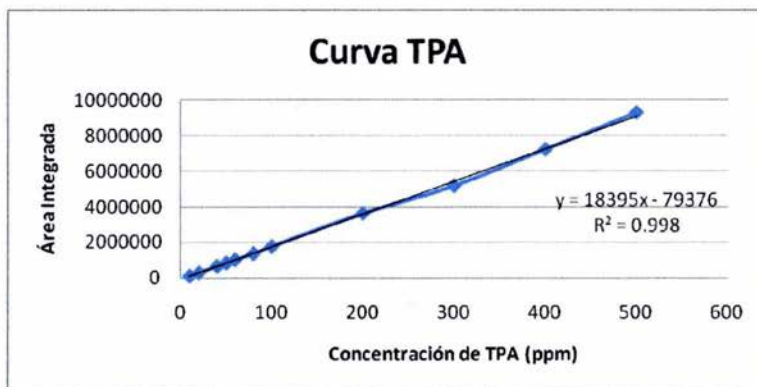


Figura 3.17 Curva de calibración del TPA

3.7 Cromatogramas de las muestras

En las figuras 3.18-3.32 se muestran los cromatogramas obtenidos para las diferentes muestras de extracción de ésteres de forbol.

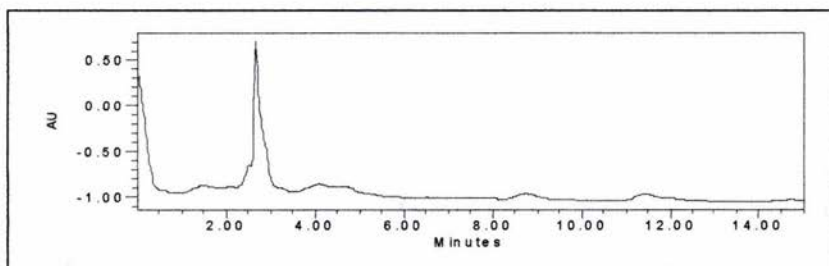
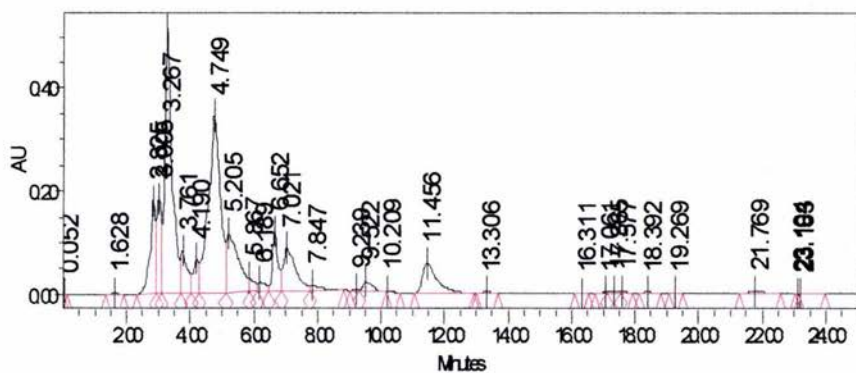
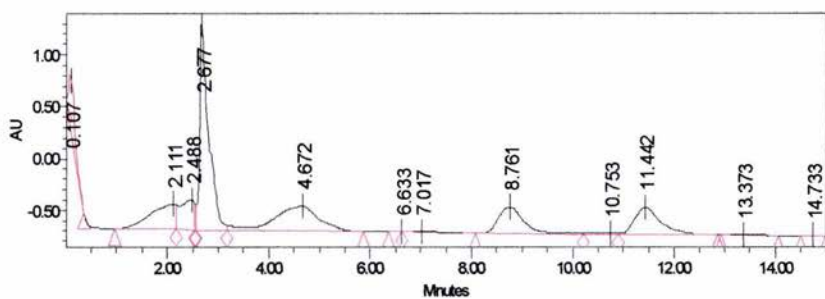


Figura 3.18 Muestra: 10 g de aceite (Nayarit "Ramoncita"). Extracción con metanol. Fase móvil: acetonitrilo



Tiempo de retención (min)	Área	% Área	Altura
6.189	346812	1.03	18132
6.652	1334413	3.98	116751
7.021	2293425	6.84	84655
7.847	258049	0.77	9679
9.239	30396	0.09	3062
9.522	394472	1.18	17813
10.209	7588	0.02	927
11.456	1823905	5.44	57249

Figura 3.19 Muestra: 10 g de aceite (Nayarit "Julia 4"). Extracción con metanol. Fase móvil: acetonitrilo.



Tiempo de retención (min)	Area	% Area	Altura
0.107	4171426	5.53	519037
2.111	8308406	11.01	246544
2.488	5653122	7.49	288301
2.677	24250001	32.13	2079137
4.672	14811024	19.62	246258
6.633	28224	0.04	3125
7.017	284274	0.38	8408
8.761	8497738	11.26	257696
10.753	110624	0.15	4231
11.442	9307462	12.33	264029
13.373	42249	0.06	1521
14.733	17065	0.02	1038

Figura 3.20 Muestra: 10 g de aceite (Nayarit "Marichuy"). Extracción con metanol. Fase móvil: acetonitrilo

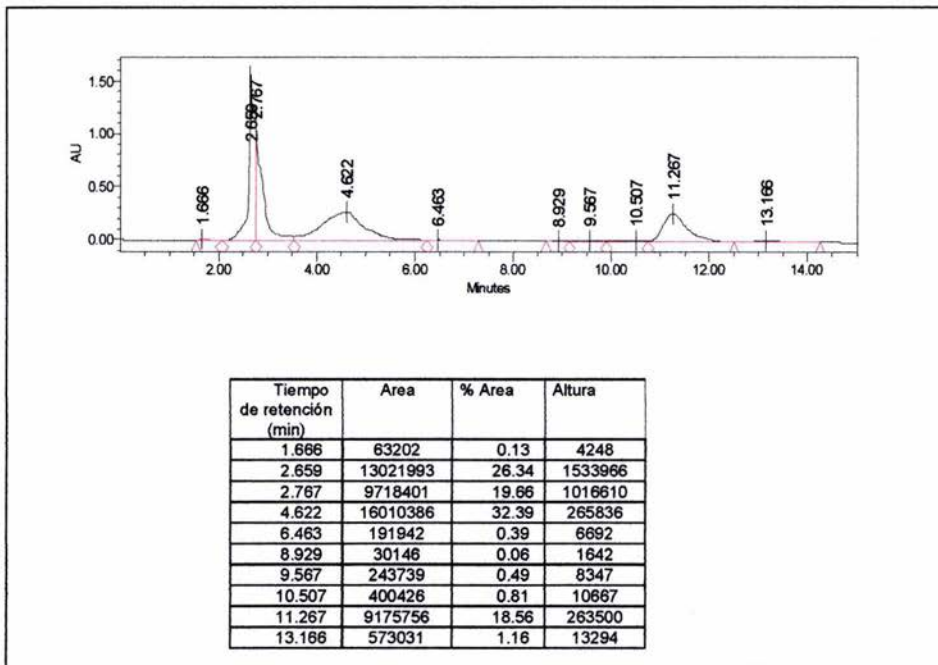


Figura 3.21 Muestra: 10 g de aceite (Nayarit "tóxica"). Extracción con metanol. Fase móvil: acetonitrilo

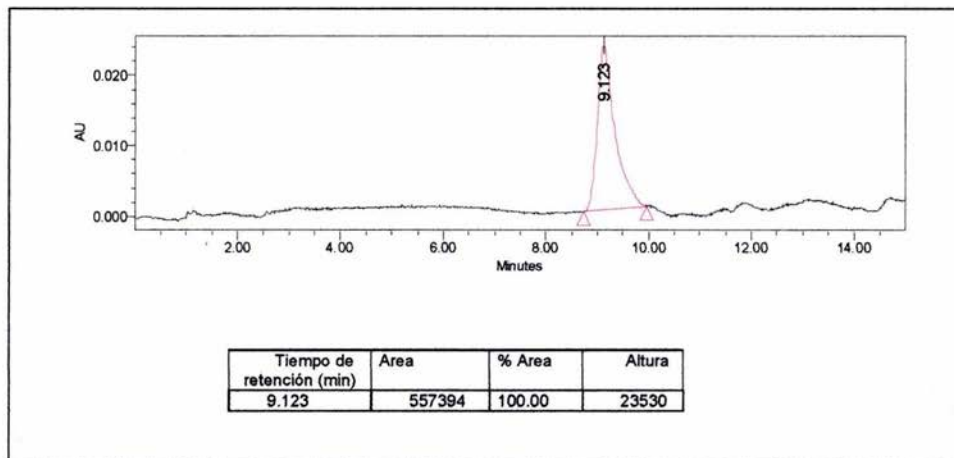


Figura 3.22 Muestra: 10 g de aceite (Nayarit "No tóxica"). Extracción con metanol. Fase móvil. Acetonitrilo

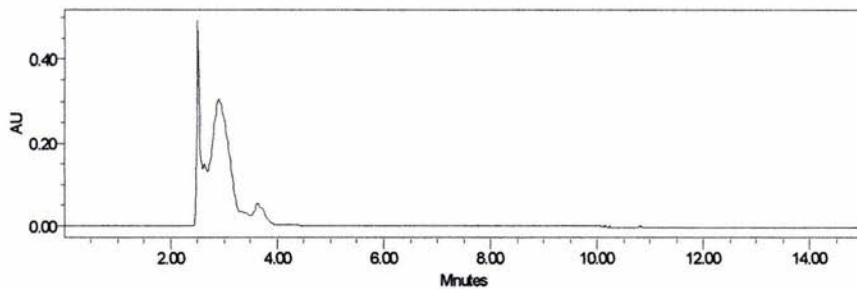


Figura 3.23 Muestra: 5 g de semilla sin cascara (Nayarit "Ramoncita"). Extracción con acetona. Fase móvil: acetonitrilo

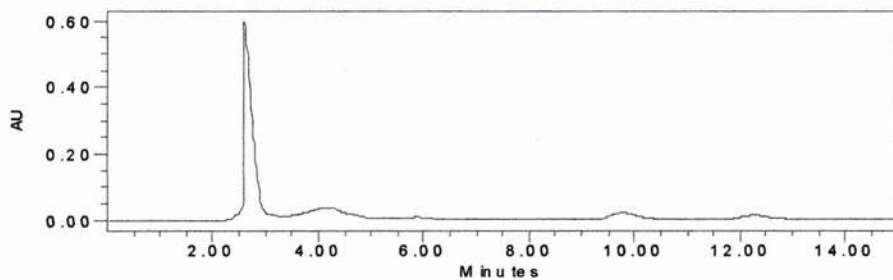


Figura 3.24 Muestra: 5 g de semilla sin cascara (Nayarit "Ramoncita"). Extracción con metanol. Fase móvil: acetonitrilo

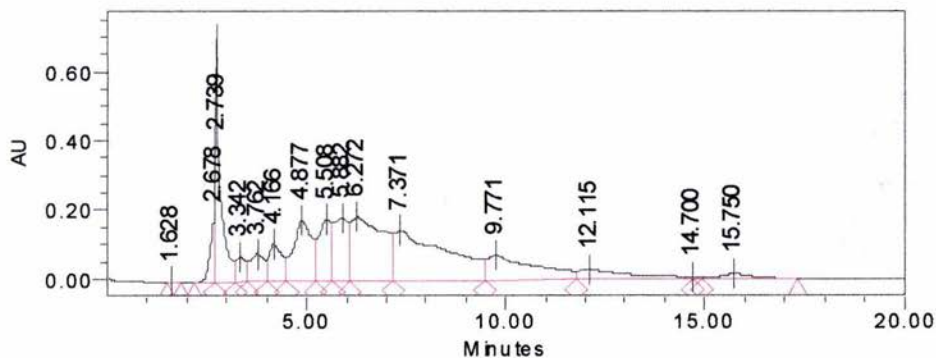
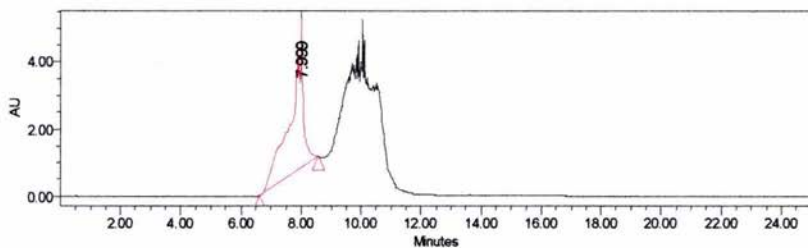
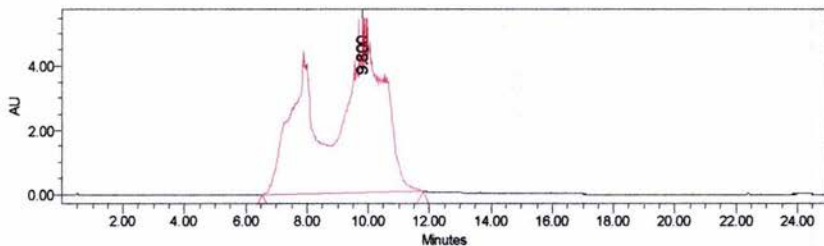


Figura 3.25 Muestra: 5 g de semilla sin cascara (Nayarit "Ramoncita"). Extracción con diclorometano. Fase móvil: acetonitrilo

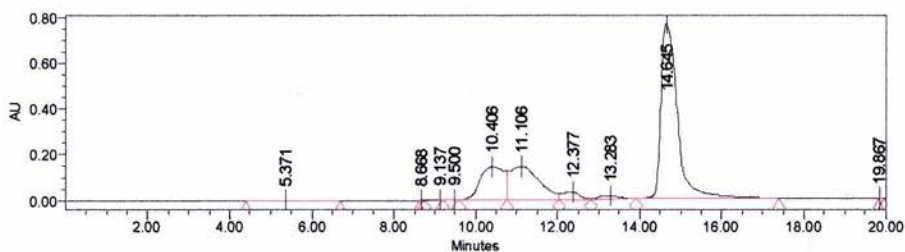


Tiempo de retención (min)	Area	% Area	Altura
7.999	118594114	100.00	3792150



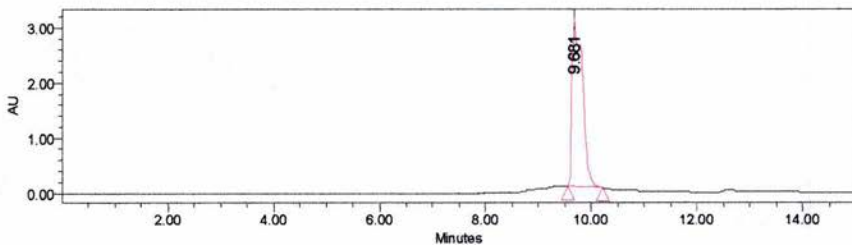
Tiempo de retención (min)	Area	% Area	Altura
9.80	665455693	100.00	5429479

Figura 3.26 Muestra: 1 kg de semilla (Zacatlán, Puebla). Extracción con metanol. Fase móvil: acetonitrilo



Tiempo de retención (min)	Area	% Area	Altura
5.371	48595	0.13	456
8.668	1936	0.01	223
9.137	23948	0.07	1122
9.500	33384	0.09	1849
10.406	5907627	16.25	144900
11.106	7236970	19.91	146125
12.377	1000467	2.75	33889
13.283	563986	1.55	16101
14.645	21532316	59.24	764624
19.867	373	0.00	99

Figura 3.27 Muestra: 1 kg de semilla (Zacatlán, Puebla). Fase móvil (Acetonitrilo:agua 90:10 % v/v)



Tiempo de retención (min)	Area	% Area	Altura
9.681	41706452	100.00	2992764

Figura 3.28 Muestra: 1 kg de semilla (Nayarit "Tóxica"). Fase móvil: Acetonitrilo

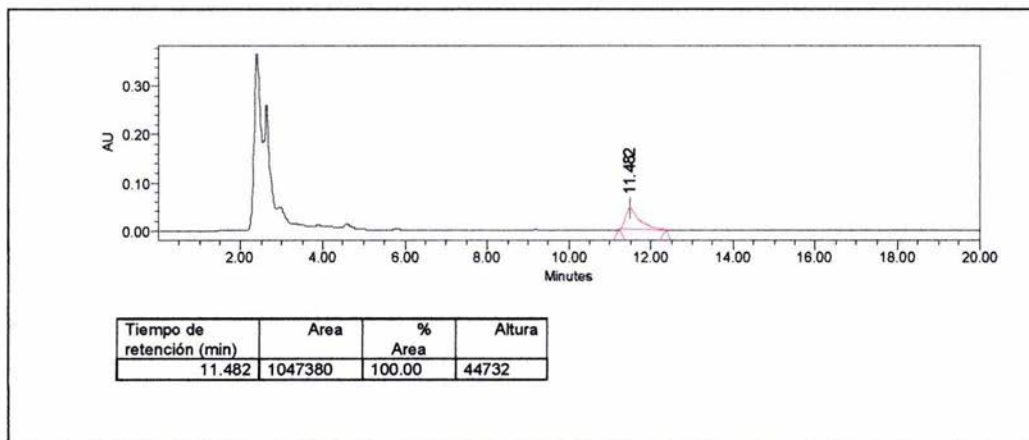


Figura 3.29 Muestra: 1 kg semilla (Nayarit "no tóxica"). Extracción con metanol. Fase móvil: acetonitrilo

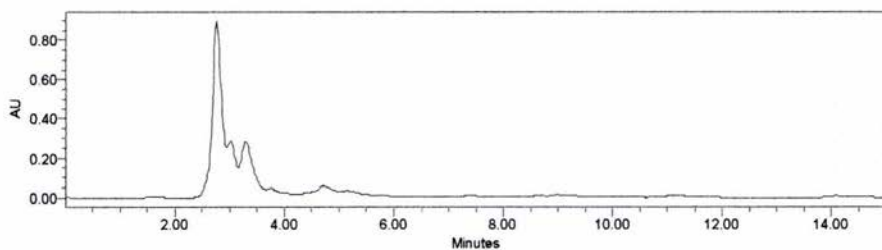


Figura 3.30 Muestra 25 g de Bagazo (Nayarit "tóxica"). Extracción con etanol. Fase móvil: acetonitrilo

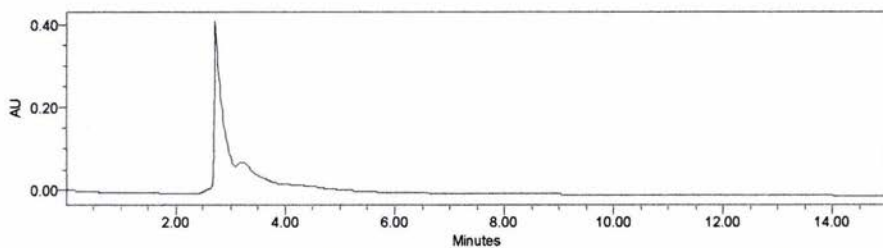
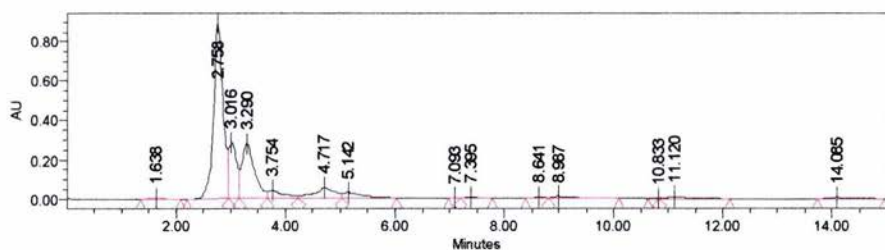


Figura 3.31 Muestra 25 g de Bagazo (Nayarit "tóxica"). Extracción con metanol. Fase móvil: Acetonitrilo



Tiempo de retención (min)	Area	% Area	Altura
1.638	56624	0.25	3624
2.758	10890166	48.54	901903
3.016	2829079	12.61	285620
3.290	4616527	20.58	281773
3.754	866150	3.86	43657
4.717	1450457	6.47	54324
5.142	664600	2.96	28062
7.093	15869	0.07	2090
7.395	77748	0.35	5408
8.641	109648	0.49	7776
8.987	352735	1.57	12682
10.833	3501	0.02	554
11.120	316439	1.41	12149
14.085	185887	0.83	7014

Figura 3.32 Muestra 25 g de Bagazo (Nayarit "tóxica"). Extracción con diclorometano. Fase móvil: acetonitrilo

IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 Relación de peso cáscara-semilla

Como se observa en la tabla 2, la semilla constituye, en promedio, un 60% del peso total, mientras que el 40% corresponde a la cáscara. Recuérdese que estos datos corresponden a los pesos de la semilla seca, proceso que debe realizarse siempre antes de trabajar con la semilla de *Jatropha curcas*.

4.2 Determinación del porcentaje de aceite en la semilla de *J. curcas*

Analizando las tablas 3 y 4, se puede observar que los porcentajes de aceite obtenidos mediante el método de extracción Soxhlet son mayores que los obtenidos mediante la expresión mecánica. Pero ello no quiere decir que este método sea mejor, pues depende de la cantidad de semilla que se trabaje y el fin con el que se haga la extracción. El método Soxhlet es la mejor opción para desengrasar la semilla, pero si concierne la obtención de los ésteres de forbol, no debe desengrasarse de esta manera pues ellos se descomponen con el calor. Para eso, lo mejor sería realizar primero la extracción de los ésteres de forbol, y posteriormente lavar el extracto con hexano, o bien, realizar el desengrasado en frío, extrayendo varias veces con hexano, y posteriormente obtener los ésteres de forbol.

4.3 Extracción de la fracción tóxica a partir del aceite de Chiapas

Como se observa en la tabla 5, al agregar cualquier disolvente alcohólico al aceite, éste adquirió una coloración rosa, lo cual pudiera ser indicio de una reacción química, o bien de alguna interacción entre el disolvente y algún compuesto presente en la mezcla, el cual se encontraba previamente insoluble. Por esta razón, decidió descartarse esa materia prima, pues la finalidad de utilizar los disolventes es extraer los ésteres de forbol sin alterar la composición del aceite.

4.4 Extracción de la fracción tóxica a partir de la semilla proveniente de Nayarit e identificación de los ésteres de forbol por medio de cromatografía en capa fina (CCF).

En la figura 3.1 se observa que al correr la placa cromatográfica con acetonitrilo, únicamente se desplaza el estándar, mientras que la muestra no corre. Al disminuir la polaridad del disolvente con el sistema acetonitrilo/cloroformo (1:1), el R.F. del estándar disminuye un poco, mientras que la muestra eluye con el frente del disolvente y no se puede determinar su Rf, tal como se observa en la figura 3.2.

En la figura 3.3, se muestra lo que ocurre al aumentar la polaridad del sistema de elución, utilizando una mezcla acetonitrilo/metanol (7:3), tanto el estándar como la muestra se desplazan tan rápido que sus R.F. no pueden determinarse. Por último en la figura 12, se observa que al disminuir un 20% la proporción del metanol, tanto el estándar como la muestra tienen el mismo Rf., pudiendo identificar así los ésteres de forbol en la muestra. Además, ya que la CCF proporciona también un criterio de pureza, se puede concluir que el método de extracción de la fase tóxica fue efectivo para obtener los ésteres de forbol, sin la presencia de

impurezas, aunque esto habría de verificarse mediante HPLC, pues es una técnica de una alta resolución a diferencia de la CCF.

4.5 Pruebas para la obtención de un derivado estable de los ésteres de forbol

El espectro IR del producto obtenido (Figura 3.5) muestra las siguientes bandas:

Tabla 7. Espectro IR del producto obtenido por la reacción de Williamson

Frecuencia (cm ⁻¹)	Grupo funcional correspondiente
3439.48	Alcohol
2924.16	Metilenos
2854.50	Metilenos
1743.51	Éster
1561.82	Nitro
1378.02	Metilos
1243.48	Éster
1091.12	Éster
802.08	Alqueno trisustituido
662.01	Alqueno, Alcano, Alcohol
605.92	Éster
468.15	Nitro

La figura 3.6 muestra el resultado de la cromatografía de capa fina para el producto obtenido por la reacción de Williamson, en la cual se observa que la muestra se separa en dos manchas, una que presenta un R_f muy similar al del

estándar, y otra que presenta un R.F. muy pequeño, la cual seguramente corresponde a una impureza en el producto.

De acuerdo a las frecuencias del espectro de IR, se puede decir que están presentes todos los grupos funcionales que componen la estructura de los ésteres de forbol, aunque las bandas de 1561 y 468 cm^{-1} sugieren la presencia de un grupo nitro, lo cual puede corresponder a alguna impureza. No aparece ninguna banda correspondiente a un grupo éter, por lo que no hay indicio de que se obtuvo algún derivado de éster de forbol. A pesar de que aparecen bandas de los grupos funcionales característicos de los ésteres de forbol no se puede afirmar su presencia, pues podríamos hablar de una mezcla de compuestos presentes en el extracto, ya que no se llevó a cabo ningún proceso de purificación de los ésteres previo al experimento IR.

4.6 Diseño de un método de HPLC para la identificación y cuantificación de los ésteres de forbol

4.6.1 Espectros de absorción

Tal como se observa en la figura 3.7, la longitud de onda adecuada para la detección de los ésteres de forbol es de 250 nm, pues la absorción del disolvente a este valor es mínima, mientras que la del estándar es muy grande, esto permite una buena eficacia en la detección del analito.

4.6.2 Cromatogramas del TPA y los disolventes utilizados

La acetona muestra un pico muy grande a la longitud de onda de 250 nm por lo cual se descartó como disolvente. La señal que muestra el acetato de etilo es más pequeña comparada con la de la acetona, pero la del acetonitrilo es incluso

insignificante, lo cual era de esperarse pues es el eluyente, por ello todas las soluciones son aforadas utilizando este disolvente.

Como se observa en las figuras 3.11 y 3.12 el tiempo de retención del TPA al utilizar como fase móvil agua/acetonitrilo (80:20%v/v) se encuentra entre los 15 y 18 minutos, tiempo que disminuye hasta los 7.9 – 8.1 minutos modificando la fase móvil a 100% de acetonitrilo (Figuras 3.13 – 3.14). Al calcular el factor de capacidad para el TPA resulta:

$$K' = (t_R - t_M) / T_M = (8 - 2.8) / 2.8 = 1.86$$

Ya que el valor está por encima de la unidad y debajo de 10, se puede decir que el tiempo de retención del analito es aceptable, de acuerdo a lo consultado en la literatura.

Los tiempos de retención se mantienen constantes al utilizar como eluyente 100% acetonitrilo, mientras que si la fase móvil contiene agua, los tiempos de retención varían algunos minutos, esto puede deberse a las interacciones que presentan los grupos hidrofílicos de la molécula de TPA con el agua y con la fase estacionaria. Este problema podría solucionarse al utilizar una solución amortiguadora de pH.

El utilizar acetonitrilo como eluyente resulta una buena opción para el compuesto estándar, pues reduce el tiempo de retención, obteniendo buena reproducibilidad en las señales, pero tiene la desventaja de que no asegura una buena resolución para las muestras, pues a pesar de que el acetonitrilo es un buen disolvente para una muy amplia gama de compuestos, el utilizar como eluyente un disolvente puro, implica que el poder de elución disminuya y no exista una buena separación de los componentes.

4.6.3 Curvas de calibración del TPA

Como se observa en la figura 3.17 la curva de calibración obtenida ajusta muy bien a una función lineal, con un coeficiente de correlación (R) muy cercano a 1, lo cual indica que el sistema sigue la Ley de Lambert-Beer, la cual relaciona la absorción de la luz con las propiedades del material, y se expresa con la siguiente ecuación:

$$A = \alpha lc$$

Donde:

- A es la absorbancia
- l es la distancia del paso óptico
- c es la concentración de sustancia absorbente en el medio
- α es el coeficiente de absorción o la absortividad molar de la sustancia

La ley tiende a no ser válida para concentraciones muy elevadas, especialmente si el material dispersa mucho la luz.

4.7 Cromatogramas de las muestras

De acuerdo a la bibliografía consultada, se pueden tomar en cuenta como señales cromatográficas pertenecientes a los diferentes ésteres de forbol, aquellas que aparezcan alrededor de hasta 5 minutos de la señal del compuesto de referencia (TPA).

Utilizando la metodología propuesta, el TPA aparece en un tiempo promedio de 8 minutos, por lo que se tomó en cuenta como señales de ésteres de forbol los picos obtenidos de 6 a 12 minutos.

En la tabla 8 se muestran las señales de importancia obtenidas para cada uno de los cromatogramas de las muestras:

Tabla 8. Cálculo del contenido de ésteres de forbol.

Figura	Muestra	Disolvente para la extracción	Tiempo de retención de la señal (min)	Área Integrada	Concentración de ésteres de forbol (mg/g)
3.18	Aceite "Ramoncita"	Metanol			No detectados
3.19	Aceite "Julia 4"	Metanol	6.652 7.021 7.847 9.522 11.456	1334413 2293425 258049 394472 1823905	0.16
3.20	Aceite "Marichuy"	Metanol	8.761 11.442	8497738 9307462	0.486
3.21	Aceite "tóxica"	Metanol	11.267	9175756	0.251
3.22	Aceite "no tóxica"	Metanol	9.123	557394	0.0027
3.23	Semilla "Ramoncita"	Acetona			No detectados
3.24	Semilla "Ramoncita"	Metanol			No detectados
3.25	Semilla "Ramoncita"	Diclorometano	desconocido	desconocido	desconocido
3.26	Semilla "Zacatlán"	Metanol (Fase móvil acetónitrilo)	7.999	118594114	6.45
3.27	Semilla "Zacatlán"	Metanol (Fase móvil agua/acetónitrilo 10:90)	10.406 11.106 14.645	5907627 7236970 21532316	1.89
3.28	Semilla "Nayarit Tóxica"	Metanol	9.681	41706452	2.27
3.29	Semilla "No tóxica"	Metanol	11.482	1047380	0.061
3.30	Bagazo "tóxico"	Etanol			No detectados
3.31	Bagazo "tóxico"	Metanol			No detectados
3.32	Bagazo "tóxico"	Diclorometano			No detectados

En la tabla 9 se muestran valores reportados en la literatura consultada, del contenido de ésteres de forbol en diferentes muestras de *J. curcas*.

Tabla 9. Contenido de ésteres de forbol en *J. curcas* reportados en la literatura.

Referencia	País de origen de la semilla	Tipo de muestra	Concentración de ésteres de forbol reportada (mg/g)
Hass, W. <i>et al.</i> (10)	Nicaragua	Aceite (toxicidad desconocida)	0.00031
Becker, K. <i>et al.</i> (5)	Coatzacoalcos, Veracruz	Semilla tóxica	3.85
Aderibigbe, A. <i>et al.</i> (3)	Cape Verde Nicaragua Nigeria Papantla, México	Semilla tóxica Semilla tóxica Semilla tóxica Semilla no tóxica	2.70 2.17 2.30 0.11
Becker, K. <i>et al.</i> (7)	Suchiapa, Chiapas Villaflora, Chiapas Tlaxmalac, Guerrero Chiapa de Corzo, Chiapas	Semilla tóxica Semilla tóxica Semilla tóxica Semilla tóxica	2.03 0.60 1.88 4.05
Juman, S. <i>et al.</i> (14)	México Indonesia India Malaysia	Aceite no tóxico Aceite tóxico Aceite tóxico Aceite tóxico	0.27 mg/g 15.8 mg/g 5.8 mg/g 2.3 mg/g

V. Conclusiones

- Se probó diferentes métodos de extracción, reportados en la literatura, de los ésteres de forbol a partir de *Jatropha curcas*, encontrando:
 - a) para la extracción a partir de la semilla el disolvente más efectivo es el diclorometano, y el metanol también resulta efectivo a tiempos largos de maceración.
 - b) como en las muestras de las extracciones realizadas a partir del bagazo no se detectaron ésteres de forbol, podría pensarse que la presencia de la cáscara de la semilla influye en una baja eficiencia en la extracción, por lo cual habría que realizar el procedimiento con tiempos más largos de maceración. Por otro lado, para la semilla tóxica, Makkar y colaboradores (2008), reportaron que el aceite contiene de 70% a 75% del total de los ésteres de forbol, y el 25-30% restante, lo contiene la semilla, lo cual da otra explicación a el por qué no se detectaron los compuestos en el bagazo.
 - c) en la extracción a partir del aceite se encontró que lo más práctico y eficiente es la utilización del sistema hexano-metanol, pues se evita la formación de emulsiones estables, permitiendo la separación de la fase oleosa y la que contiene los ésteres de forbol.
- Se calculó las concentraciones aproximadas de los ésteres de forbol en las muestras extraídas:
 - a) la concentración promedio en el aceite "aparentemente" tóxico es de 0.3 mg/g de aceite, mientras que en el aceite "aparentemente" no tóxico es de 0.0027 mg/g de aceite.
 - b) la concentración promedio en la semilla "aparentemente" tóxica es de 2.08 mg/g, mientras que en la semilla "aparentemente" no tóxica es de 0.061 mg/g.
- Los valores de las concentraciones de los ésteres de forbol en variedades tóxicas y no tóxicas de *J. curcas* reportadas en este trabajo, son similares a aquellos encontrados en la literatura consultada:

- a) para la semilla tóxica el promedio es de 2.44 mg/g.
 - b) para la semilla no tóxica únicamente se encontró el dato de 0.11 mg/g, lo cual corresponde casi al doble del valor reportado en este trabajo.
 - c) para el aceite proveniente de variedades mexicanas, el promedio es de 0.27 mg/g
 - d) para el aceite tóxico de especies asiáticas el promedio es de 7.96 mg/g de aceite
-
- No debe considerarse a las variedades de semilla donde no se detectó los ésteres de forbol como variedades no tóxicas, pues hay que recordar que otros compuestos como la cursina y otros inhibidores de tripsina son responsables de la toxicidad de la planta. Para poder realizar una clasificación objetiva de las variedades de semilla de *J. curcas*, es necesario realizar los bioensayos pertinentes para determinar su toxicidad.
 - En este trabajo se aporta como contribución el uso exclusivo de acetonitrilo como eluyente único en el método cromatográfico empleado, en contraste con las diversas –y a menudo complejas y difíciles de manejar– mezclas de solventes utilizadas por otros autores, según consta en la bibliografía contemporánea. El solo uso del acetonitrilo conduce a resultados en la detección de los compuestos dentro de los rangos reportados y aun puede observarse cierta mejoría en los tiempos de retención registrados, así como en la reducción en los intervalos de aparición de los picos de los analitos.
 - Los resultados de este trabajo de investigación pueden servir –ya de manera inmediata– como guía para la identificación de los compuestos de interés; *tanto para su extracción* –donde se observó una cierta mejoría al macerar durante dos semanas– a partir de las muestras de semilla o de la planta jatrofa; *como para su detección cromatográfica y el cálculo aproximado de su concentración*. Si bien es necesario aun afinar los parámetros de la técnica para la determinación cuantitativa de los ésteres de forbol de manera altamente reproducible y confiable.

VI. Recomendaciones

Uno de los principales objetivos del proyecto institucional, del cual esta investigación forma parte, es encontrar –o promover su desarrollo en el laboratorio– una variedad mexicana de *J. curcas* de una calidad excepcional, es decir, que contenga un gran porcentaje de aceite, y además que contenga grandes cantidades de productos de valor agregado. Por esto mismo es de capital importancia la obtención de lotes homogéneos y frescos de las muestras de semillas y plantas de las variedades de jatropa que crecen en el territorio nacional.

Asimismo se destaca la necesidad de optimizar el transporte y almacenamiento de las muestras hasta su utilización en el laboratorio, pues de la calidad de las muestras depende radicalmente el éxito obtenido en el laboratorio, ya que la degradación de las muestras no permite el completo y adecuado análisis que requiere la cuantificación de los ésteres de forbol y otras sustancias presentes en la jatropa.

Para el seguimiento inmediato de esta investigación debe tenerse en cuenta lo siguiente:

- Para mejorar la eficacia de las extracciones de los ésteres de forbol, principalmente en el bagazo de la semilla, se recomienda incrementar los tiempos de maceración. También sería recomendable el desengrasado previo de las muestras, recordando que este procedimiento no debe realizarse a altas temperaturas; este procedimiento permitiría diferenciar con precisión en qué proporción se encuentran los ésteres de forbol tanto en la semilla como en el aceite.
- Para optimizar el método cromatográfico utilizado en la identificación y cuantificación de los ésteres de forbol, posiblemente deba modificarse la fase móvil para permitir una mejor resolución de la técnica, es decir, que pueda identificarse y cuantificarse todas las especies químicas presentes en la muestra. Sería recomendable la adición de proporciones pequeñas de disolventes polares como agua o metanol, así como el uso de una solución amortiguadora de pH.
- Una vez optimizado el método cromatográfico, será posible determinar cuantitativamente los ésteres de forbol, y posteriormente seguir con la etapa de identificación y purificación de los diferentes diterpenos que contienen las variedades con las que se trabajará en el corto plazo. Para ello sería recomendable incluir técnicas cromatográficas tales como las de columna abierta y de cromatografía por afinidad; asimismo, técnicas

instrumentales tales como la Espectroscopía de Masas y la Resonancia Magnética Nuclear, para la caracterización de los compuestos aislados.

Para la continuación a futuro de esta investigación, sería necesario extrapolar los procesos de extracción y purificación de los ésteres de forbol a niveles industriales, evaluando la factibilidad y rentabilidad de obtener y comercializar estos compuestos.

En mi opinión, en México, la planta *J. curcas* tiene mucho potencial en lo que se refiere a su uso como un cultivo energético, así como alimento para ganado, y los esfuerzos inmediatos deberían concentrarse en promover el cultivo de las variedades no tóxicas de la planta, pues ellas únicamente se encuentran en nuestro país. El utilizar estas variedades, además de aumentar el aprovechamiento de la planta, permite eliminar el riesgo de los trabajadores al manipular el aceite e incluso la semilla, disminuyendo así los costos de producción tanto para la fabricación de los biocombustibles como del alimento para ganado.

De cualquier manera no debe dejarse a un lado el estudio de las variedades tóxicas con las que se cuenta en México, con fines de aumentar el conocimiento que se tiene de los productos naturales del país, así como de las aplicaciones que pueden tener estas toxinas tanto en la investigación biomédica básica, como en el desarrollo de fármacos y otros productos de importancia.

VII. Referencias

1. Abbott, D., Andrews, R. (1970) Introducción a la cromatografía. Editorial Alhambra. España. 2ª ed.
2. Adolf, W., Opferkuch, H., Hecker, E., (1984) Irritant phorbol derivatives from four *Jatropha* species. *Phytochemistry*. Vol.23 No.1, 129-132.
3. Aderibigbe, A., Becker, K., Makkar, H. (1998) Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition,

digestibility, protein degradability and toxic factors. Food chemistry Vol.62 No.2, 207-215.

4. Ashwani, K., Satyawati, S. (2008) An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. Industrial crops and products. Vol. 28, 1-10.
5. Becker, K., Dávila-Ortíz, G., Francis, G. Siddhuraju, P., Martínez-Herrera, J. (2006). Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. Food Chemistry 96, 80-89.
6. Becker, K., Francis, G., Goel, G., Makkar, H. (2007) Phorbol esters: Structure, Biological activity, and Toxicity in animals. International Journal of Toxicology. Vol. 26, 279-288.
7. Becker, K., Francis, G., Makkar, H., Martínez, A., Martínez, J. (2010) Agroclimatic conditions, Chemical and Nutricional Characterization of Different Provenances of *Jatropha Curcas* L. from Mexico. European Journal of Scientific Research. Vol.39 No. 3, 396-407.
8. Canell, R. (1988). Natural Products Isolation. Humana Press. U.S.A.
9. Colegate S., Molyneux, R. (2008). Bioactive natural products. 2^a ed. CRC Press. U.S.A
10. Dimitrijevid, S., Evans, F., Hassan, N., Humer, U., Ryves, J., Shehadeh, M. (1996) Analysis and purification of phorbol esters using normal phase

HPLC and photodiode-array detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Vol. 15, 393-401.

11. Gandhi, V., Cherian, K., Mulky, M. (1995) Toxicological Studies on Ratanjyot oil. Fd Chem. Toxic. Vol.33 No.1 , 39-42.
12. Giiibitz, L., Mittelbach, M., Trabi, M. (1999) Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* . Bioresource Technology. Vol. 67, 73-82.
13. Haas, W., Mittelbach, M. (2000) Detoxification experiments with the seed oil from *Jatropha curcas* L. Industrial Crops and Products. Vol. 12, 111-118.
14. Jumat, S., Waled, A. (2009) Phorbol ester as Toxic Constituents of Tropical *Jatropha Curcas* Seed Oil. European Journal Of Scientific Research. Vol. 31 No.3, 429-436.
15. Onofre, C. (2006) Tesis de licenciatura: Determinación de factores tóxicos en la almendra de Piñoncillo (*Jatropha curcas*) consumida en el municipio de Zacualtipan, Hidalgo. Facultad de Química. UNAM. México, D.F.
16. Salamanca, G. La familia Euforbiaceae como condición promisoría para la obtención de metabolitos secundarios. Facultad de Ciencias - Departamento de Química. Universidad del Tolima, Colombia.
17. SENER. 2009. Programa de introducción de bioenergéticos. México.
18. Stock, R. (1963). Chromatographic methods. Reinhold. Great Britain.
19. Vogg, G., Achatz, S., Kettrup, A., Sandermann, H. (1999) Fast, sensitive and selective liquid chromatographic-tandem mass

spectrometric determination of tumor-promoting diterpene esters.
Journal of Chromatography A, 855, 563-573.

20. http://es.wikipedia.org/wiki/Cromatograf%C3%ADa_l%C3%ADquida_de_alta_eficacia (2009)
21. <http://depa.pquim.unam.mx/proteinas/estructura/EPPrpc.html> (2009)
22. <http://www.montes.upm.es/Dptos/DptoIngForestal/OperacionesBasicas/Docencia/PDF/Presentaciones/Tema%204.pdf> (2009)
23. <http://www.i-sis.org.uk/JatrophaBiodieselIndia.php> (2007)
24. <http://ladiaria.net/suplemento/energia-1/> (2008)
25. <http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8246/6/T2cromagraf.doc> (2009)