



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Obtención de los esteres de forbol a partir de
la semilla de *Jatropha curcas*.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERA QUÍMICA

PRESENTA

GUADALUPE MARLÉN GONZÁLEZ ORELLANA



MÉXICO, D.F.

2012



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: Profesora: **MARÍA RAFAELA GUTIÉRREZ LARA**

VOCAL: Profesor: **MODESTO JAVIER CRUZ GÓMEZ**

SECRETARIO: Profesora: **AÍDA GUTIÉRREZ ALEJANDRE**

1er. SUPLENTE: Profesor: **LUIS MEDINA TORRES**

2° SUPLENTE: Profesor: **NÉSTOR NOÉ LÓPEZ CASTILLO**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO 212 CONJUNTO 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 NOÉ LÓPEZ CASTILLO

SUSTENTANTE:

GUADALUPE MARLÉN GONZÁLEZ ORELLANA

Agradecimientos.

A mis papás y abuelos, que siempre creyeron en mí y confiaron en que este día llegaría. A mi familia, gracias porque sin ustedes yo no podría estar aquí.

Al Doctor Javier Cruz, mi asesor, que me permitió trabajar en el laboratorio y me brindo la oportunidad de realizar mi tesis.

Al Dr. Néstor, por sus consejos, por el apoyo, esa forma tan agradable de ver la vida es única, de verdad muchas gracias por todo.

A mis amigos, que estuvieron presentes en toda esta etapa, quiero que sepan que los respeto, admiro y quiero mucho, Elizabeth, Adrián, Room, Mauro, Monse, Lauras, Anel, Karina y tantos más que sería difícil mencionar.

A Uriel, por estar siempre presente, por ayudarme a crecer tanto, no tengo palabras para ti, literal.

A la UNAM y especialmente a la Facultad de Química por la formación que me han brindado.

No me queda más que decir, ¡ Lo logramos!.

Contenido

1	INTRODUCCIÓN	10
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GENERAL.....	14
2.2	OBJETIVOS PARTICULARES	14
2.3	HIPÓTESIS:.....	14
3	MARCO TEÓRICO	15
3.1	FUENTES ALTERNATIVAS.	15
3.2	LOS BIOCOMBUSTIBLES.	18
3.3	<i>JATROPHA CURCAS</i>	19
3.4	ESTERES DE FORBOL.	20
3.5	TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN.	22
3.6	TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	25
3.6.1	Técnicas utilizadas en la caracterización de los esteres de forbol	28
4	CARACTERIZACIÓN Y CALIBRACIÓN	32
4.1	CARACTERIZACIÓN DE LOS ESTERES DE FORBOL	32
4.1.1	FTIR.....	32
4.1.2	Cromatografía en capa fina (CCF)	34
4.1.3	Cromatografía de líquidos (HPLC)	35
4.1.4	Curvas de calibración utilizando el método de HPLC	36
5	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	39
5.1	MACERACIÓN.....	39
5.2	MÉTODO SOXHLET.....	41
5.2.1	Ciclos de extracción con n-hexano.	43
5.3	METODOLOGÍA OBTENIDA	43
6	RESULTADOS Y ANÁLISIS	45
6.1	OBTENCIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA LA EXTRACCIÓN DE LOS ESTERES DE FORBOL	45
6.1.1	Maceración	46
6.1.1.1	Efecto de la temperatura de maceración.....	46
6.1.1.2	Secado de la semilla	49
6.1.1.3	Diferentes tiempos de análisis.....	51
6.1.1.4	Sección de la semilla con mayor concentración de esteres de forbol	52
6.1.2	Método Soxhlet	53
6.1.2.1	Con un solvente	53
6.1.2.2	Con varios solventes	55
6.1.2.3	Ciclos de extracción con n-hexano.....	56
6.2	METODOLOGÍA ESTABLECIDA.....	59

6.2.1	Análisis de la metodología	60
6.2.2	Semillas se diferentes regiones geográficas	61
7	CONCLUSIONES	63
8	PERSPECTIVAS A FUTURO	66
9	ANEXOS	67
	<i>RESUMEN DE LAS BANDAS DE ABSORCIÓN MÁS IMPORTANTES DE IR</i>	67
10	BIBLIOGRAFÍA	69

Índice de Figuras

Figura 1. Principales productores de bioetanol (CEPAL, 2010)	10
Figura 2. Principales productores de biodiesel (CEPAL, 2010).....	11
Figura 3. Estructura de los esteres de forbol.....	21
Figura 4. Estructura de tigliano.....	21
Figura 5. Propuesta para la estructura de los esteres de forbol	21
Figura 6. Propuesta 2 de estructura de esteres de forbol	21
Figura 7. Propuesta de estructura del forbol con ciclobutano.....	22
Figura 8. Equipo Soxhlet.	24
Figura 9. Cámara de elución, características.	29
Figura 10. Cromatogramas en capa fina	30
Figura 11. Esquema de un sistema HPLC.	31
Figura 12. Estructura del éster de forbol.	33
Figura 13. CCF del estándar de esteres de forbol.....	35
Figura 14. Identificación de las partes de la semilla de <i>Jatropha curcas</i>	39

Índice de Tablas

Tabla 1. Energías renovables. (Biodisol11).....	15
Tabla 2. Señales obtenidas del estándar de esteres de forbol en IR.	33
Tabla 3. Valores para las curvas de calibración de los esteres de forbol.....	36
Tabla 4. Optimización de la técnica de maceración.	40
Tabla 5. Optimización de la técnica de extracción Soxhlet.	41
Tabla 6. Diluciones a temperaturas ambiente y refrigeración (-4°C).....	47
Tabla 7. Concentración por ciclo de extracción del n-hexano.	57
Tabla 8. Condiciones de la <i>Jatropha curcas</i>	61
Tabla 9. Concentraciones de <i>Jatropha</i> por regiones geográficas.	62

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Curva de calibración con base en áreas.....	37
Gráfica 2. Curva de calibración con base en alturas	37
Gráfica 3. Áreas vs ciclo de extracción	58

Índice de Cromatogramas

Cromatograma 1. Estándar de esteres de forbol.	35
Cromatograma 2. Maceración de la almendra a temperatura de -4°C.	46
Cromatograma 3. Maceración de la almendra a temperatura ambiente.	46
Cromatograma 4. Maceración de la semilla a Tamb, dilución 1:15.....	48
Cromatograma 5. Maceración de la almendra a T=- 4 °C, dilución 1:15.....	49
Cromatograma 6. Secado a temperatura ambiente	50
Cromatograma 7. Secado a temperatura de 55 °C	50
Cromatograma 8. Maceración a Tamb con almacenamiento de 3 semanas.	51
Cromatograma 9. Maceración a T= - 4°C con almacenamiento de 3 semanas. ...	51
Cromatograma 10. Maceración de la almendra.	52
Cromatograma 11. Maceración de la cáscara.....	52
Cromatograma 12. Extracción Soxhlet de la almendra con un solvente	53
Cromatograma 13. Extracción Soxhlet de la cáscara con un solvente.....	53
Cromatograma 14. Extracción con metanol a alta T de calentamiento	54
Cromatograma 15. Extracción Soxhlet varios solventes almendra-metanol	55
Cromatograma 16. Soxhlet varios solventes cáscara-metanol.....	56

Acrónimos y unidades

$\mu\text{V}^* \text{ sec}$	Microvoltio segundo
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CEPAL	Comisión Económica Para América Latina
cm^{-1}	Centímetros recíprocos
CP	Cromatografía en Papel
EC	Electrocromatografía
GEI	Gases de efecto invernadero
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IR	Infrarrojo
UV	Ultravioleta

1 Introducción

En los últimos años se ha hecho un trabajo de concientización acerca de las consecuencias del desmedido uso de los combustibles fósiles; por ello, algunos países en el mundo han emprendido la producción de combustible a partir de materias primas que no se encuentren relacionadas con aquéllas que producen el petróleo.

A partir de esta innovadora empresa surgen los denominados biocombustibles, aquéllos que derivan de biomasa (organismos recientemente vivos o sus desechos metabólicos) y que por sus características fisicoquímicas pueden sustituir a los carburantes. Hoy se utilizan, sobre todo, dos grandes tipos: el bioetanol, que sustituye a la gasolina y el biodiesel, que puede utilizarse en lugar del gasóleo.

Las Figuras 1 y 2 muestran los principales países productores de biocombustibles a escala mundial.

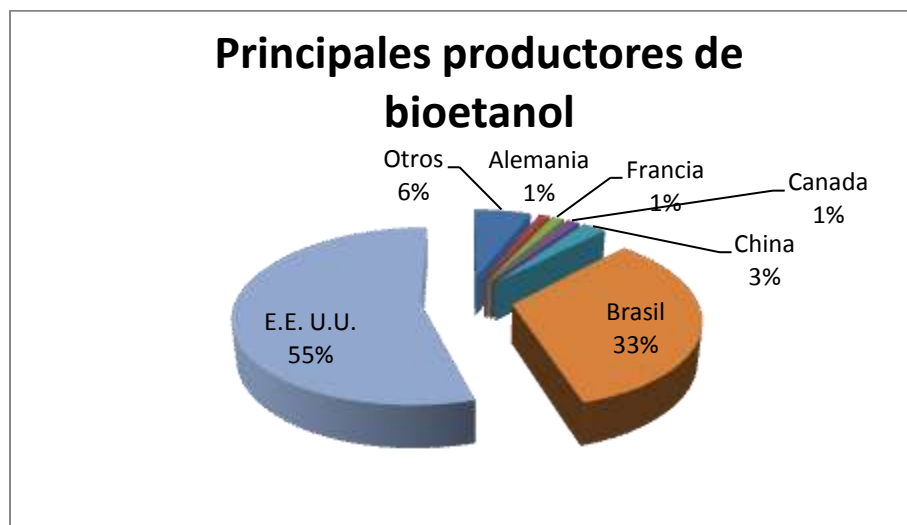


Figura 1. Principales productores de bioetanol (CEPAL, 2010)

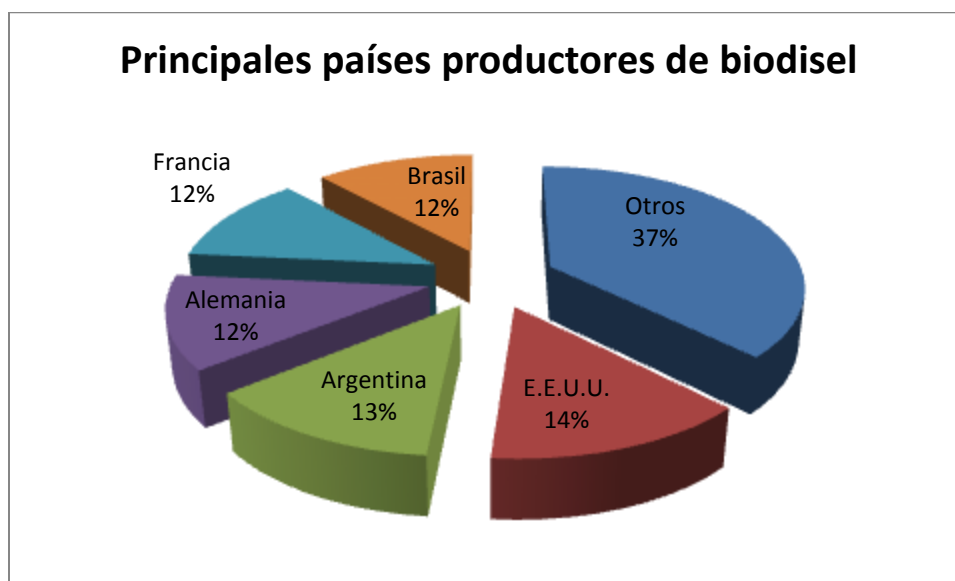


Figura 2. Principales productores de biodiesel (CEPAL, 2010)

Para México, la producción de biocombustibles es un camino muy conveniente ya que cuenta con una amplia biodiversidad; las ventajas más importantes de esta producción serían:

- Energía: disminuir la dependencia frente a la volatilidad de los precios del petróleo, bajar los costos de combustibles por importaciones, disminuir la dependencia de países inestables políticamente.
- Desarrollo rural / agrícola: apoyar a la agricultura nacional, mejorando la situación económica de las áreas rurales y de los ingresos de campesinos.
- Medio ambiente: disminución de GEI (Gases de Efecto Invernadero) y de otros daños ambientales relacionados con la extracción y procesamiento de petróleo.

Aunque también existen las desventajas sobre la elevada demanda de estos nuevos combustibles como lo pueden ser:

- El aumento en el precio de los cultivos energéticos
- El aumento en el precio de los productos que compiten por insumos con los combustibles energéticos (por ejemplo, la carne).

-
- Disminución en los subproductos generados en la producción de biocombustibles (por ejemplo, la glicerina).
 - Escasez de cultivos agrícolas como alimento.

Por lo anteriormente expuesto, es inevitable entrar en un conflicto en el que se decida cuál es la postura más apropiada, sin embargo, ubicados en el actual contexto económico, socio-político y ecológico en el que nos encontramos, pareciera que la producción de biocombustibles es la solución, por lo menos a mediano plazo, más factible para soportar el inminente agotamiento del crudo.

Es así que en México la bioenergía es una de las fuentes de mayor potencial para facilitar la transición energética a los recursos naturales. Últimamente en nuestro país se ha apostado más por la producción de biodiesel que del bioetanol, pero al ser aquél obtenido mediante la fermentación de granos ricos en azúcar o almidón es posible llegar a una crisis alimentaria, en un breve lapso de tiempo, producida por una mala administración de los recursos.

Por su parte, el biodiesel puede ser producido a partir de ácidos grasos derivados de aceites que pueden ser tanto de origen vegetal como animal. Es importante apuntar que la calidad del biodiesel está relacionada con la materia prima utilizada, razón por la cual la semilla de *Jatropha curcas* ha sido de amplio interés a nivel internacional, no solo porque el biocombustible generado a partir de ella es de buena calidad, sino también por la facilidad de reproducción con la que cuenta esta semilla.

Sin embargo, esta semilla cuenta con algunos inconvenientes: al ser considerada materia prima para combustibles de segunda generación, los cuales no tienen un interés comercial en materia de alimentos, tras la obtención del biodiesel se obtiene una cantidad inmensa de torta residual que no puede ser utilizada pues se considera tóxica, por lo que en poco tiempo el problema de los residuos sólidos generados será de igual o mayor magnitud que el problema que podría mitigar.

Ya que esta semilla ha sido ampliamente estudiada en los años recientes, se ha logrado atribuir la toxicidad a los esteres de forbol que puede contener. Los esteres de forbol son considerados compuestos de alto valor agregado ya que se tiene un gran interés de aislarlo y poder ser investigados por los beneficios que pudieran acarrear a la medicina, pues ayudan en el combate del cáncer (Gujan Goel, 2007) o incluso como una posible cura para el VIH (D. N. Muanza, 1995)

Por los beneficios que conlleva el aislar a los esteres de forbol contenidos en la *Jatropha curcas*, este trabajo busca optimizar una metodología de extracción, identificación y análisis de los compuestos contenidos en la semilla nacional.

2 Objetivos

2.1 Objetivo General

- Desarrollar una metodología para obtener y cuantificar esteres de forbol, contenidos en la semilla de *Jatropha curcas* recolectada en algunos estados de la República Mexicana.

2.2 Objetivos Particulares

- Comprobar dos métodos de extracción sólido-líquido para la semilla de *Jatropha curcas*.
- Proponer una técnica de obtención de esteres de forbol.
- Realizar la caracterización de los esteres por diferentes técnicas de análisis.
- Establecer una técnica analítica para la cuantificación de los esteres de forbol.

2.3 Hipótesis:

Si se aplica una técnica de extracción sólido-líquido y se analizan los productos obtenidos mediante una técnica cromatográfica y si se tiene como resultado la presencia de esteres de forbol se podría establecer una metodología de extracción, análisis y cuantificación de estos contenidos en la semilla de *Jatropha curcas* de algunas regiones de la República Mexicana.

3 Marco teórico

3.1 Fuentes alternativas.

Proponer que se renuncie definitivamente a la producción de combustibles de origen fósil, a corto y mediano plazo es una idea inconcebible, pero sí se pueden comenzar a desarrollar nuevas fuentes de abasto, fuentes que sean renovables.

Las fuentes de energías renovables son aquellas cuyo origen reside en fenómenos de la naturaleza, procesos o materiales que pueden ser transformados en energía que a su vez puede ser utilizada y es generada de forma natural, por lo que se encuentran disponibles de manera continua. Aun así el concepto de renovabilidad depende de la escala de tiempo que se utilice y del ritmo de uso de los recursos.

Varias son las fuentes que se podrían utilizar para la generación de energía útil para el hombre, sin embargo han sido pocas las que se han podido aterrizar y contar con una tecnología asociada para su funcionamiento. En la Tabla 1 se presentan estas energías renovables, su fuente y una breve descripción.

Tabla 1. Energías renovables. (Biodisol11)

Energía renovable	Fuente	Descripción
Eólica	Viento	Esta se obtiene mediante la utilización de la energía cinética proveniente de la fuerza del viento.

Tabla 1. Energías renovables (Continuación)

Energía renovable	Fuente	Descripción
Radiación solar	Sol	Los colectores solares parabólicos concentran la radiación solar aumentando la temperatura en el receptor. Los paneles fotovoltaicos convierten directamente la energía luminosa en energía eléctrica. Mediante colectores solares, la energía solar puede transformarse en energía térmica, y utilizando paneles fotovoltaicos la energía luminosa puede transformarse en energía eléctrica.
Hidráulica	Ríos y corrientes de agua dulce	La energía potencial acumulada en los saltos de agua puede ser transformada en energía eléctrica. Las centrales hidroeléctricas aprovechan energía de los ríos para poner en funcionamiento unas turbinas que arrastran un generador eléctrico.
Bioenergía	Materia orgánica o biogás	Fuente procedente indirectamente del sol y puede ser considerada una energía renovable siempre que se sigan algunos parámetros medioambientales para su uso y explotación. La formación de la biomasa se lleva a cabo en la fotosíntesis, donde interviene la energía solar. La biomasa mediante este proceso almacena energía en forma de carbono, esta energía puede ser transformada en energía térmica o eléctrica.

Tabla 1. Energías renovables (Continuación)

Energía renovable	Fuente	Descripción
Geotermia	Calor de la Tierra	Parte del calor interno de la tierra (5000 °C) llega a la corteza terrestre. En algunas zonas del planeta, cerca de la superficie, aguas subterráneas pueden alcanzar temperaturas de ebullición, y por lo tanto, servir para accionar turbinas eléctricas o para calentar.
Mareomotriz	Mares y océanos	La energía mareomotriz se debe a las fuerzas gravitatorias entre la Luna, la Tierra y el Sol, que originan las mareas, es decir, la diferencia de altura media de los mares según la posición relativa entre estos tres astros. Esta diferencia de alturas puede aprovecharse en lugares estratégicos como golfos, bahías o estuarios utilizando turbinas hidráulicas que se interponen en el movimiento natural de las aguas, junto con mecanismos de canalización y depósito, para obtener movimiento en un eje. Esta energía puede ser transformada en energía eléctrica.
Undimotriz	Olas	Energía que trabaja de la misma forma que la mareomotriz pero producida por el movimiento de las olas

De la tabla anterior se puede ver que la bioenergía es una fuente que tiene mucho potencial ya que por su origen vegetal y animal puede ser capturada y usada como fuente química almacenada. La bioenergía resulta cuando los combustibles generados, biocombustibles, son usados para fines energéticos y ya sea por

razones ambientales o económicas estos han cobrado una importancia inimaginable en las últimas décadas.

3.2 Los biocombustibles.

En primer lugar, ¿que son los biocombustibles?, en México la Ley de Promoción y desarrollo (SENER11) los ha definido, de la siguiente manera:

Combustibles obtenidos de la biomasa provenientes de materia orgánica de las actividades, agrícola, pecuaria, silvícola, acuicultura, algacultura, residuos de la pesca, domésticas, comerciales, industriales, de microorganismos, y de enzimas, así como sus derivados, producidos, por procesos tecnológicos sustentables que cumplan con las especificaciones y normas de calidad establecidas por la autoridad.

Estos son clasificados de acuerdo al insumo o materia prima del que provengan, debido a los avances tecnológicos, estos son clasificados por generaciones, es por esta razón que se tiene:

- De primera generación: los “agrocombustibles” son aquellos de procedencia agrícola y están conformados por las partes alimenticias de las plantas, las cuales tienen un alto contenido de almidón, azúcares y aceites. Por ejemplo, el maíz la caña de azúcar, aceite de soya, etc.
- De segunda generación: son elaborados de cultivos no alimentarios que pueden ser convertida en celulosa, como los pastos perennes, la *Jatropha*, residuos de cultivos. También se pretende que esos cultivos no alimentarios ocupen áreas marginales, para no desplazar a los alimentos de las tierras agrícolas.
- De tercera generación: son tecnologías que aplican a materias primas genéticamente modificadas con un objetivo determinado. La mejora de materias primas como etanol de celulosa, biodiesel de algas y gasificación de masa, entre otros.

-
- De cuarta generación: esta tecnología se basa en las modificaciones tanto de materias primas como de los procesos con el objetivo de captar mayor cantidad de carbono posible.

En México se ha dado un apogeo importante en el desarrollo de biocombustibles de segunda generación ya que estos no compiten directamente con el mercado de los alimentos, es por eso que se ha enfocado en tecnologías para el abasto de biodiesel.

El biodiesel puede ser producido por:

- Higuera
- Aceite de palma
- *Jatropha curcas*
- Grasa animal
- Aceites usados.

De estos la *Jatropha curcas* ha sido centro de atención a nivel internacional, por la alta cantidad de aceite que genera, sus características industriales y agronómicas. (Maciel 2009).

3.3 *Jatropha curcas*.

Es una planta perenne, oleaginosa y autóctona de porte arbustivo con más de 3500 especies agrupadas en 210 géneros. Es originaria de México y Centroamérica, pero crece en la mayoría de países tropicales. Es cultivada en América Central, Sudamérica, Sureste de Asia, India y África. Una semilla resistente a las plagas (Harald 2012). Sobrevive a condiciones de tierras áridas y erosionadas y bajo duras condiciones climáticas. Se ha reportado que contiene entre 20 y 60% de aceite según la variedad (Herrera 2011). Este puede ser usado

como lubricante, en la producción de jabón, medicina, cosméticos pero su principal aplicación como ya se mencionó es en la producción de biodiesel.

El residuo de este proceso podría formar un ingrediente rico en proteínas para aves de corral, cerdos e incluso pescado. Sin embargo, las semillas de *Jatropha curcas* son, en general, tóxicas para humanos y animales (Herrera 2006).

Poder manejar todos los componentes de las semillas sería lo ideal para este nuevo mercado de los biocombustibles, es por eso que se investiga las posibles causas de la toxicidad, en general se ha llegado a la conclusión de que se debe a la presencia de la cursina, pero más, por las concentraciones de los esteres de forbol.

Sería muy simple mandar a un tratamiento térmico para desintoxicar a la semilla de compuestos como esteres de forbol y cursina y tal vez de esta manera la torta residual de la producción de biodiesel sea adecuada para su consumo, pero los esteres de forbol son productos de alto valor agregado. (Makkar 2010).

3.4 Esteres de forbol.

El término “forbol” es usado para describir a una familia de compuestos naturales que se pueden referir como diterpenos del tigliano. Los esteres de forbol se definen como compuestos policíclicos en donde dos grupos hidroxilo en átomos de carbono vecino están esterificados con ácidos grasos. Se ha reportado que muchas plantas como *Sapium indicum*, *S. japonicum*, *Euphorbia frankiana*, *E. cocrulescense*, *E. ticulli*, *Croton spareiflorus* *Jatropha curcas* y *Excoecaria agallocha* contienen esteres de forbol (Makkar 2009).

La estructura química de los esteres de forbol depende del diterpeno tetracíclico conocido como tigliano. Este contiene cuatro anillos indicados como A, B, C y D (Figura 4). Si esta estructura básica contiene además grupos hidroxilo en

diferentes posiciones, como un enlace tipo cetona en el anillo A, es conocida como forbol. El forbol, contiene cinco grupos hidroxilo con diferente reactividad de acilación.

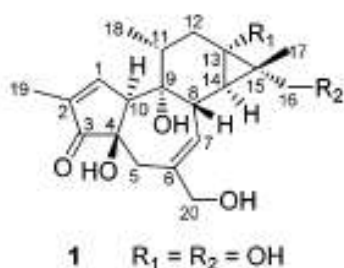


Figura 3. Estructura de los esteres de forbol.

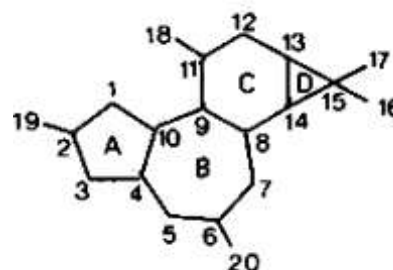


Figura 4. Estructura de tigliano.

Las Figura 5 y 6, muestran dos propuestas para la estructura de los esteres de forbol. Por otro lado también se han planteado un nuevo tipo de esteres de forbol, ya que estos cuentan con un ácido dicarboxilico y contienen una unidad de ciclobutano. (Figura 7) (Wilhelm 2002).

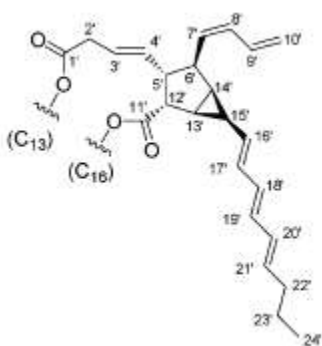


Figura 5. Propuesta para la estructura de los esteres de forbol

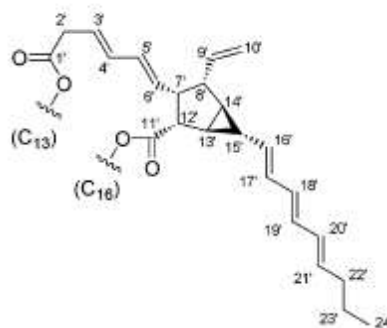


Figura 6. Propuesta 2 de estructura de esteres de forbol

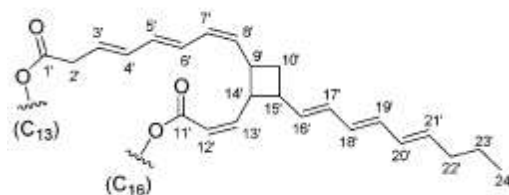


Figura 7. Propuesta de estructura del forbol con ciclobutano.

El forbol y sus diferentes derivados, son potentes promotores de tumores, además de este efecto, inducen a una notable diversidad de otros efectos biológicos a concentraciones excepcionalmente bajas (Gunjan 2007). Al parecer las semillas de *Jatropha* contienen más de cuatro esteres diferentes.

Por los beneficios que promete el aislar a estos compuestos, los esteres de forbol han estado en constante investigación.

3.5 Técnicas de extracción.

Los procesos de extracción varían en función de la escala de producción, de la naturaleza y calidad de la materia prima y la naturaleza del solvente. Los procesos pueden ser divididos en dos grupos.

- Procesos que dan como resultado un equilibrio de las concentraciones entre soluto y residuo.
- Procesos que agotan completamente el compuesto a extraer.

Los procesos que dan como resultado un equilibrio de la concentración son la maceración. Los procesos que agotan el compuesto a extraer son: percolación, la re-percolación y la extracción en contracorriente.

Maceración.

Este proceso consiste en remojar el material a extraer, debidamente fragmentado, con un disolvente apropiado, hasta que este penetre en los tejidos ablandando y disolviendo las porciones solubles. En un recipiente preferentemente de vidrio se coloca el material a extraer y se cubre con el disolvente, este se tapa y se deja en reposo con agitación esporádica. Posterior al reposo se filtra el líquido y si el material aun contuviera sustancias de interés, se repite el proceso con disolvente puro, tantas veces como sea necesario.

Reflujo.

En este proceso, el material fragmentado es disuelto y se somete a ebullición. Debido al calentamiento prolongado este podría llegar a la evaporación total del disolvente, es por esto que se utiliza un balón de destilación (con el material a extraer más el disolvente) y un refrigerante. La temperatura elevada ayuda a la extracción de los componentes deseados. El inconveniente de este método es que muchos compuestos se descomponen a temperaturas de ebullición del disolvente.

Lixiviación o percolación.

Consiste en colocar el material fragmentado en un recipiente cónico o cilíndrico, haciendo pasar un disolvente a través del mismo. El tamaño de las partículas no debe ser menor de 3 mm aproximadamente, dado que el disolvente no percolará. Sin embargo, el material se tiene que encontrar compactado. Este método no difiere significativamente de la maceración aunque requiere el agregado del solvente de forma continua.

Extracción continua.

Es utilizada para “agotar” el material que se esta extrayendo, muchas veces se requieren volúmenes muy grandes del disolvente. Existen tres diseños básicos de aparatos para la extracción continua:

- a) Aparato Soxhlet extracción sólido-líquido.
- b) Aparato para extracción líquido-líquido con disolvente menos denso que la solución con la sustancia a extraer.
- c) Aparato de extracción líquido-líquido con un disolvente más denso que la solución con la sustancia a extraer.

Extracción mediante aparato Soxhlet.

Es un método de extracción exhaustiva de componentes, este se lleva a cabo usando un disolvente orgánico, el cual refluye a través de la muestra que se encuentra contenida en un dedal poroso de celulosa o vidrio. Las ventajas más importantes son el contacto continuo con la muestra con una porción fresca de disolvente, simplicidad, bajo costo y la posibilidad de procesar grandes cantidades de la muestra. En la Figura 8 se puede observar el sistema.

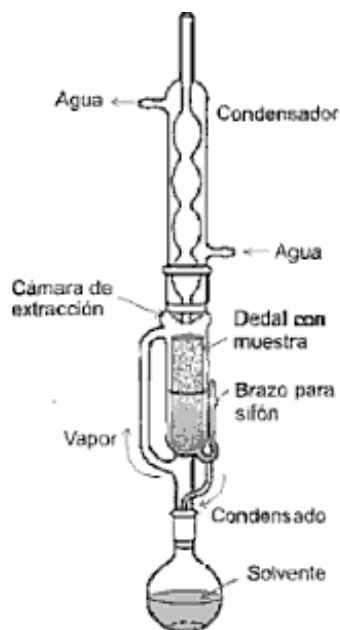
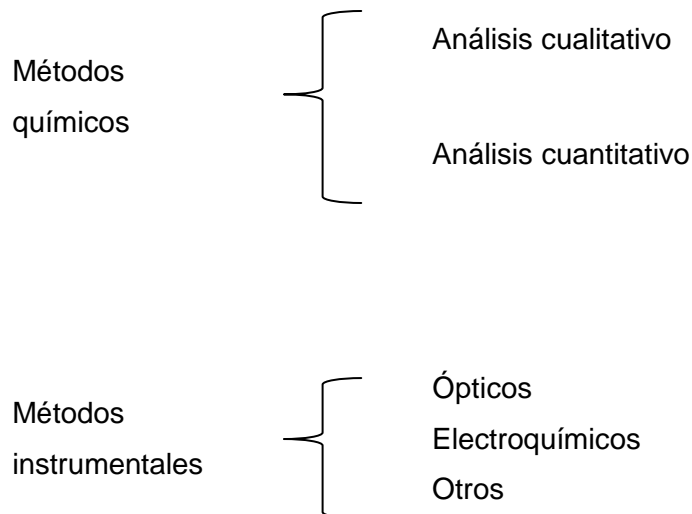


Figura 8. Equipo Soxhlet.

3.6 Técnicas de caracterización

La caracterización de materiales consiste en la obtención de información acerca de un material bajo estudio (composición, estructura, topología, topografía, morfología, propiedades en general) a partir de la interacción de una señal (eléctrica, térmica, luminosa, etc.) con una porción de dicho material.

Estos métodos suelen clasificarse en químicos e instrumentales.



Los métodos químicos están basados en interacciones materia- materia, es decir, en reacciones químicas. Mientras que los métodos instrumentales están basados en interacciones materia-energía.

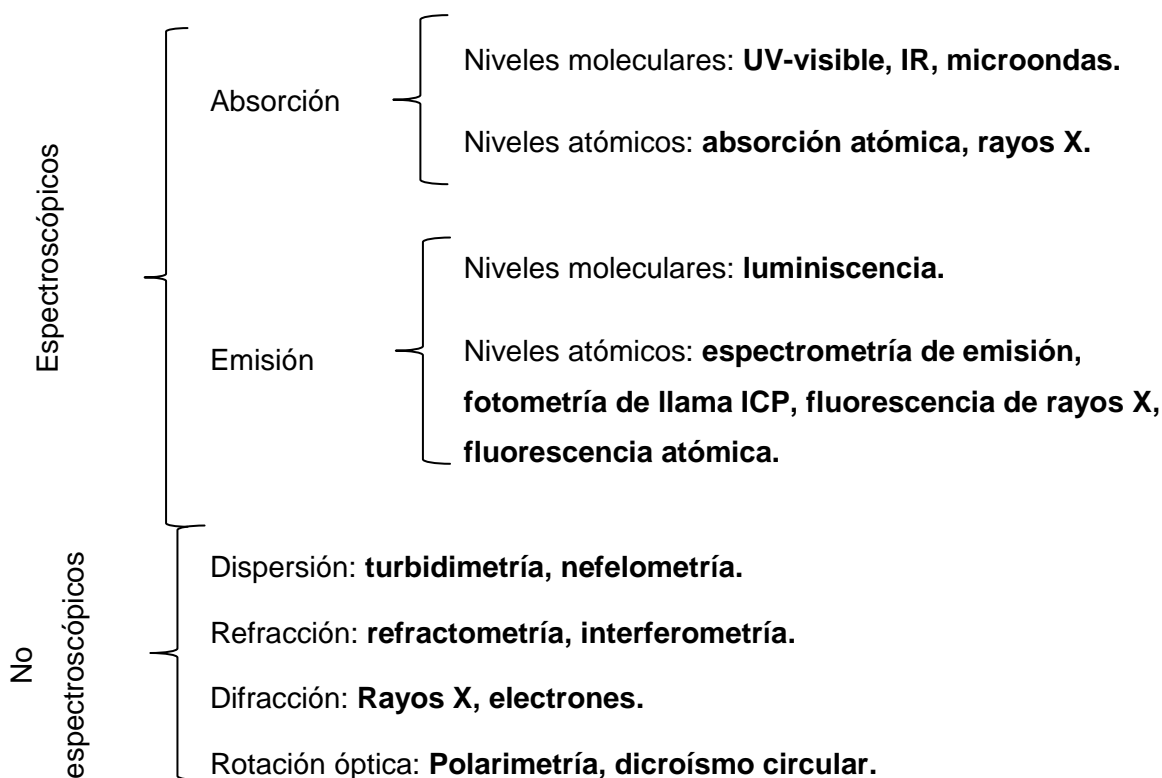
Un método físico se considera cuando la operación no modifica la composición química del sistema.

Métodos ópticos.

Los métodos ópticos de análisis cubren un amplio campo de aplicación, incluyendo todos aquellos que implican la medida de radiación electromagnética emitida por la materia o la interacción con ella.

Estos métodos se clasifican en espectroscópicos, en donde existe intercambio de energía entre la radiación electromagnética y la materia, y no espectroscópicos, donde no hay intercambio de energía como consecuencia de la interacción materia radiación electromagnética.

Los primeros pueden basarse en procesos de absorción y emisión mientras que las transiciones entre los distintos niveles energéticos pueden tener lugar a nivel atómico o molecular. En los segundos, los mecanismos son de dispersión, difracción, refracción y polarización. A continuación se muestra la clasificación de los métodos ópticos, indicando algunos de los más utilizados.



Métodos electroanalítico.

Las aplicaciones electroquímicas al análisis tienen su fundamento en la evolución de la intensidad, potencial, tiempo y resistencia mecánica que transcurre en las reacciones. A continuación se muestra la clasificación de los métodos electroanalíticos:

- a) Métodos sin transferencia electrónica neta, pueden considerarse estrictamente físicos. El movimiento de las cargas se produce fundamentalmente por la migración, o mediante fenómenos de polarización dieléctrica.
- b) Métodos con transferencia electrónica neta, métodos basados en la medida del potencial a intensidad que puede ser nula o intensidad de corriente no nula.

Métodos cromatográficos.

La cromatografía es un método muy utilizado que permite la separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas. Es difícil definir rigurosamente el término cromatografía ya que se ha aplicado este nombre a varios sistemas y técnicas. Sin embargo, todos los métodos tienen en común el uso de una fase móvil y una estacionaria. Los componentes de la mezcla son transportados a través de la fase estacionaria por el flujo de la fase móvil, y las separaciones se dan por las diferencias de velocidad de migración entre los distintos componentes de la mezcla.

Estos métodos son de dos tipos:

- Cromatografía en columna. La fase estacionaria esta contenida en un tubo estrecho y se fuerza el paso de la fase móvil a través del tubo, ya sea a presión o por gravedad.

- Cromatografía planar. La fase estacionaria esta sostenida sobre una placa plana o en los poros de un papel, mientras la fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por capilaridad o por efecto de gravedad.

3.6.1 Técnicas utilizadas en la caracterización de los esteres de forbol.

Cromatografía en capa fina.

Los métodos de cromatografía en plano incluyen a la cromatografía en capa fina (CCF) la cromatografía en papel (CP) y electrocromatografía (EC). En la actualidad, la cromatografía en plano se centra en la técnica de capa fina, ya que es más rápida, tiene mejor resolución, bajos costos y es más sensible que su alternativa en papel. Pero lo más importante es que puede servir como guía para el desarrollo de las condiciones óptimas para realizar separaciones por cromatografía de líquidos en columna.

Las separaciones en capa fina se realizan en placas de vidrio o plástico que se recubren con una capa delgada y adherente de partículas divididas: ésta constituye la fase estacionaria. La fase móvil se mueve a través de la fase estacionaria por capilaridad, a veces ayudada por gravedad o por aplicación de un potencial eléctrico.

Los tamaños comunes para la placa, en centímetros, son de 5 x 20, 10 x 20 y 20 x 20. Las placas son presentadas en dos categorías: convencional y de alta eficiencia.

La aplicación de la muestra es tal vez el aspecto más crítico. Por lo general se aplica una disolución de 0.01 al 0.1 por 100 como una mancha a 1 ó 2 cm del extremo de la placa. Para mejorar la eficiencia la mancha debe tener un diámetro aproximado de 5 mm.

La aplicación manual de las muestras se realiza por contacto entre placa y un capilar que contiene la muestra, o utilizando una jeringa hipodérmica.

El desarrollo de la placa consiste en marcar la posición de aplicación de la muestra con un lápiz. Se coloca la placa en un recipiente cerrado y saturado con vapores de disolvente con el que se efectuará el desarrollo, uno de los extremos de la placa se introduce en el eluyente evitando contacto directo con la muestra (Figura 9). El eluyente asciende por capilaridad. Después que el eluyente ha recorrido $2/3$ de la placa, se retira del recipiente y se seca.

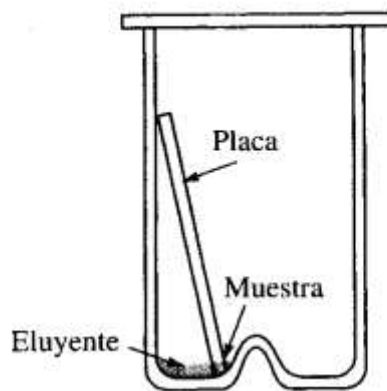


Figura 9. Cámara de elución, características.

Existen diversos procedimientos para localizar a los componentes de la muestra después de la separación. Uno de estos métodos de detección es una lámpara de UV, donde los componentes se muestran en ocasiones hasta su desplazamiento.

En la Figura 10 se muestra una placa cromatográfica con las características que debe de cumplir, desde línea de aplicación hasta frente del eluyente, esto con dos muestras diferentes.

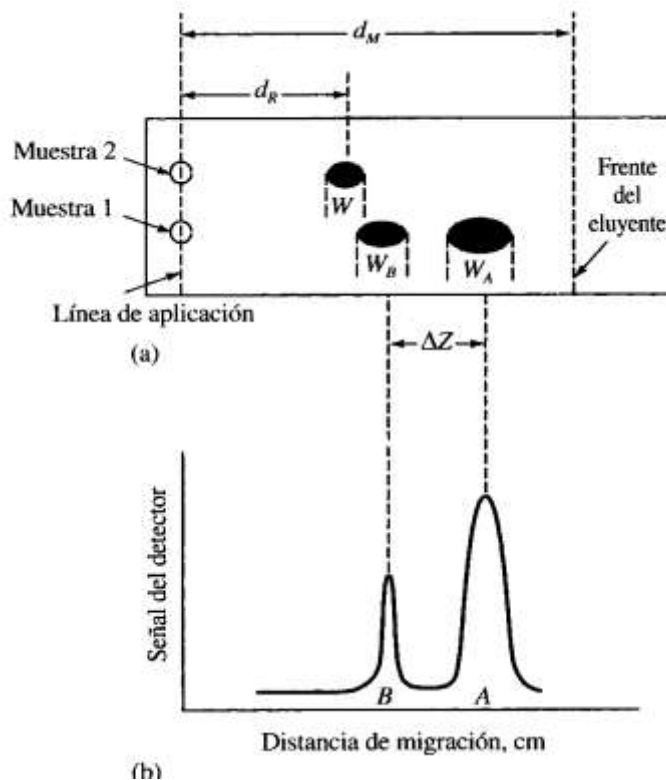


Figura 10. Cromatogramas en capa fina

Para medir la eficiencia de las placas se utiliza R_f (factor de retardo) que viene dado por:

$$R_F = \frac{d_R}{d_m}$$

Donde d_R y d_M son las distancias lineales medidas desde la línea de aplicación. Los valores de R_F pueden variar desde 1 para los solutos que no se retrasan a valores que se aproximan a 0, lo ideal es un R_F entre 0.6 y 0.8.

Cromatografía de líquidos (HPLC).

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia es la técnica de separación más utilizada, las razones son su sensibilidad, fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies volátiles o termolábiles.

Un sistema de HPLC moderno esta equipado con recipientes de vidrio para el disolvente, estos por los general cuentan con sistema para eliminar los gases disueltos. Un desgasificador puede consistir en un sistema de bombeo por vacío, sistemas de purga que permiten arrastrar a los gases disueltos. Con frecuencia cuentan con un dispositivo para la filtración de polvo. La Figura 11 muestra un esquema general de lo que es un sistema HPLC.

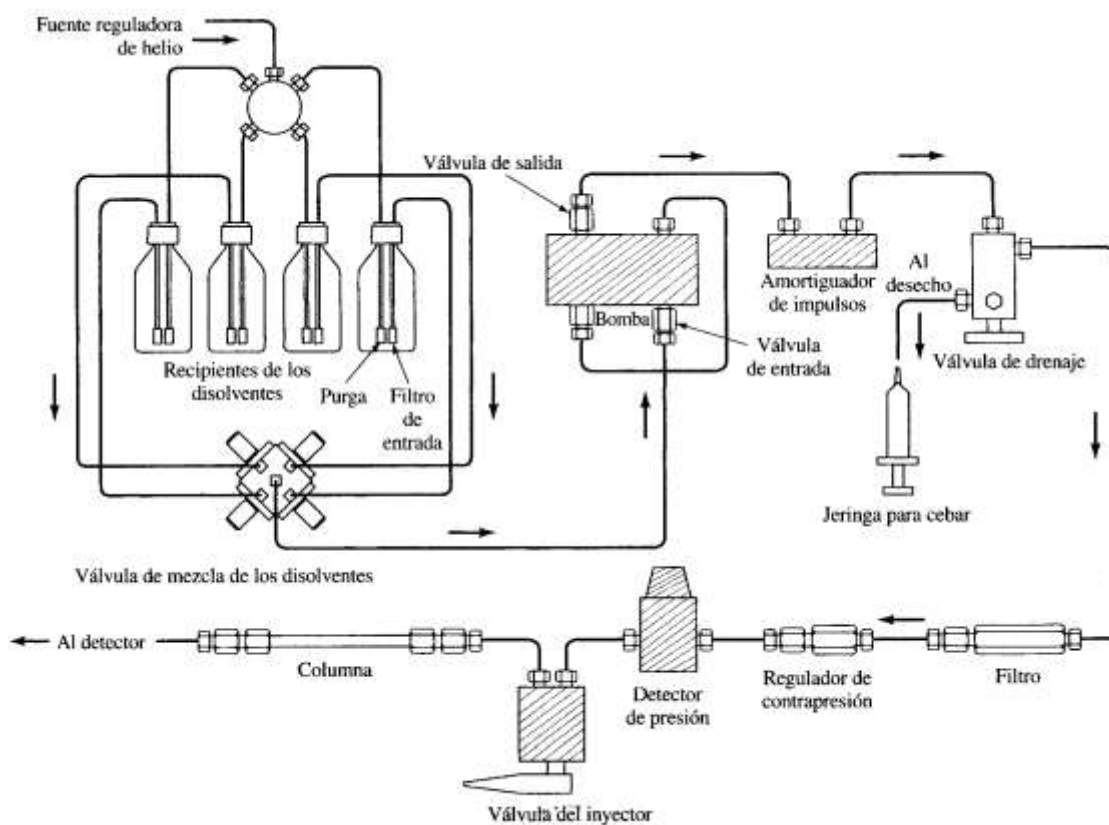


Figura 11. Esquema de un sistema HPLC.

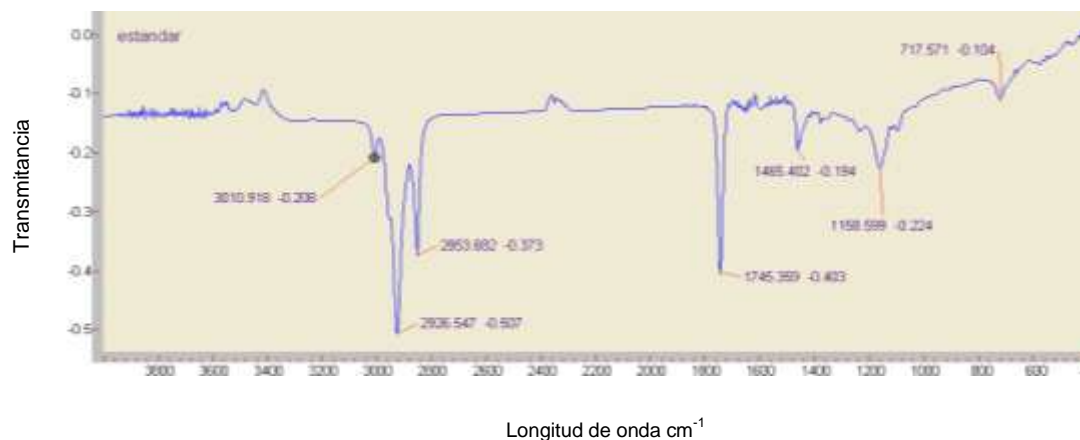
4 Caracterización y calibración

4.1 Caracterización de los esteres de forbol

Para poder identificar los esteres de forbol de las muestras obtenidas por las diferentes metodologías, se caracterizó el estándar de éster de forbol Sigma-Aldrich 12-miristato 13-acetato de forbol (phorbol 12-myristate 13-acetate con 99% de pureza) por diferentes técnicas de análisis.

4.1.1 FTIR

Se realizó el espectro de infrarrojo (ver IR 1) del estándar de esteres de forbol en solución con metanol, a temperatura ambiente con un FT-IR Varian 800-Scimitar series, el cual se muestra a continuación:



IR 1. Estándar de éster de forbol.

En la Tabla 2 se reporta el promedio de las señales obtenidas y los posibles grupos funcionales (utilizando las tablas del anexo 1) a los que corresponde cada señal. Para esto se utilizó el espectro IR 1 y la Figura 12, que corresponde a la estructura de los esteres de forbol.



Figura 12. Estructura del éster de forbol.

Tabla 2. Señales obtenidas del estándar de esteres de forbol en IR.

Señal (cm ⁻¹)	Grupo funcional
3011	Alquenos
2926	Metilos y/o metilenos
2854	Alcanos
1745	Compuestos carbonilos
1465	Esteres
1158	Éteres
718	Cadena larga

Este análisis no se les realizó a las muestras obtenidas ya que por el método de extracción se tendrán presentes muchos compuestos y complicaría la determinación de los esteres de forbol pero se consideró que la técnica de IR se utilizaría cuando se logre aislar a estos compuestos, sin embargo los objetivos de este trabajo no abarcan ese procedimiento, pero se servirán como referencia para trabajos futuros basados en esta investigación.

4.1.2 Cromatografía en capa fina (CCF)

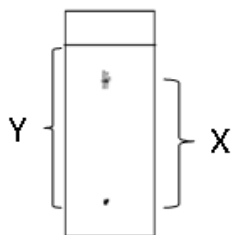
Para esta prueba fue necesario encontrar el solvente o par de ellos que permita un buen desplazamiento en el absorbente (silica gel para este caso). El procedimiento realizado se describe de la siguiente manera:

- Se preparó la cámara de elución, es decir, se colocó el solvente o par de ellos durante 1 hora aproximadamente para lograr la saturación de la atmósfera.
- Se recortaron las placas (5 x2 cm).
- Se aplicó una gota del estándar de esteres de forbol.
- Se dejó correr la muestra, se sacó antes que el eluyente llegara al tope de la placa.
- Las placas fueron reveladas con una lámpara de UV- corta longitud de onda.

Para esta determinación se utilizaron diferentes solventes basándose en la polaridad y afinidad en caso de las mezclas, se obtuvieron dos mezclas con Rf similares, finalmente se eligió una mezcla de 1:10 cloroformo-metanol.

Por el problema de reproducibilidad, del 20 %, que presenta este método, se realizaron 3 corridas más en las mismas condiciones, los resultados reportados están basados en un promedio de las 4 placas, figura 13.

Para poder confirmar que el par elegido es una buena opción se calculó la constante Rf (Ratio of front) obteniendo un valor de 0.79, que se encuentra en los rangos aceptables por este método que son entre 0.6 y 0.8.



$$R_F = \frac{X (\text{distancia del origen a la muestra})}{Y (\text{distancia del origen al frente del eluyente})} = 0.79$$

Figura 13. CCF del estándar de esteres de forbol.

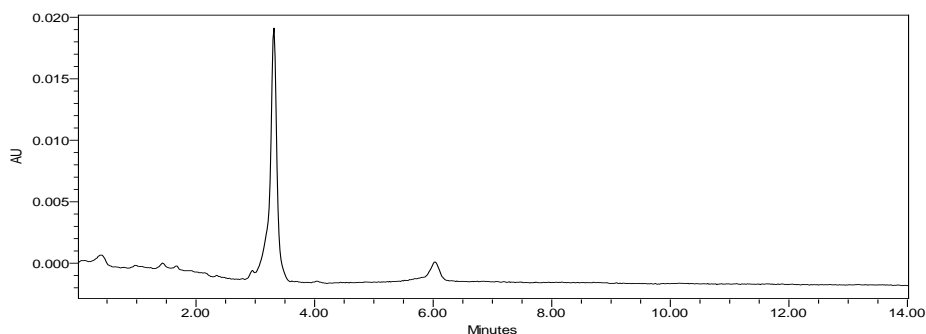
Debido a que la cromatografía en capa fina es una técnica de caracterización donde es requerido el estándar en cada muestra y la reproducibilidad de ésta es tan baja la técnica fue descartada para el análisis de las muestras.

4.1.3 Cromatografía de líquidos (HPLC)

Estas pruebas se realizaron a temperatura ambiente en un equipo Waters 2695, utilizando una columna de 250 x 4 mm Phenomenex tipo LICHROSORBSRP-18.

Para realizar las pruebas fue necesario conocer el tiempo de retención de los esteres de forbol, por lo que a la primer corrida se le dio un tiempo de 14 minutos.

El tiempo de retención obtenido fue de 3.375 min, como se puede observar en el Cromatograma 1.



Cromatograma 1. Estándar de esteres de forbol.

Con base en esta prueba se determinó la longitud de onda, con la que se trabajó en las siguientes muestras, considerando el rango donde se han reportado la presencia de los esteres de forbol de 250-290 nm, el valor elegido para este trabajo fue de 260 nm, por la definición de las señales que se obtuvieron.

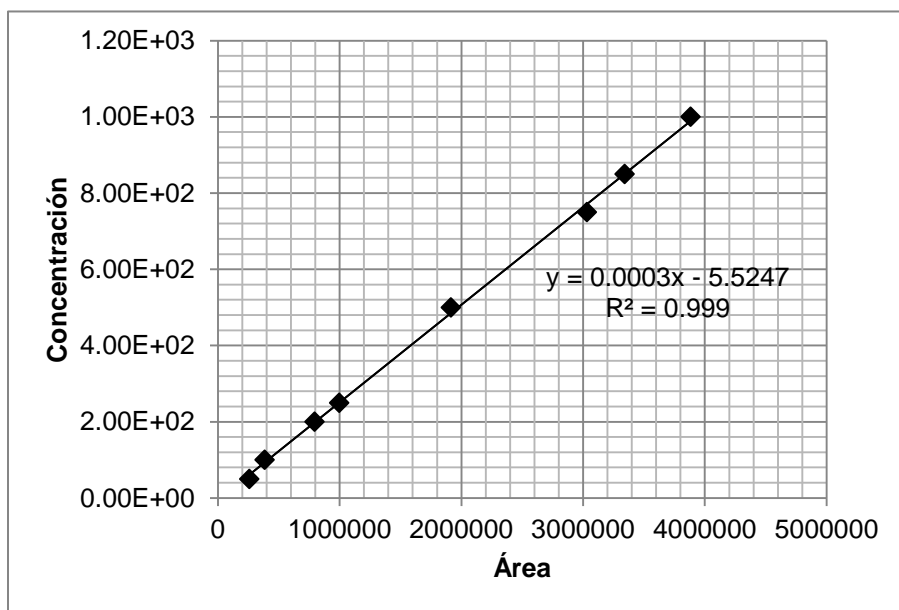
4.1.4 Curvas de calibración utilizando el método de HPLC

Para realizar las curvas de calibración se manejaron muestras del estándar de éster de forbol a diferentes concentraciones, se analizaron en HPLC con una longitud de onda de 260 nm. Los valores obtenidos de áreas y alturas se presentan en la Tabla 3.

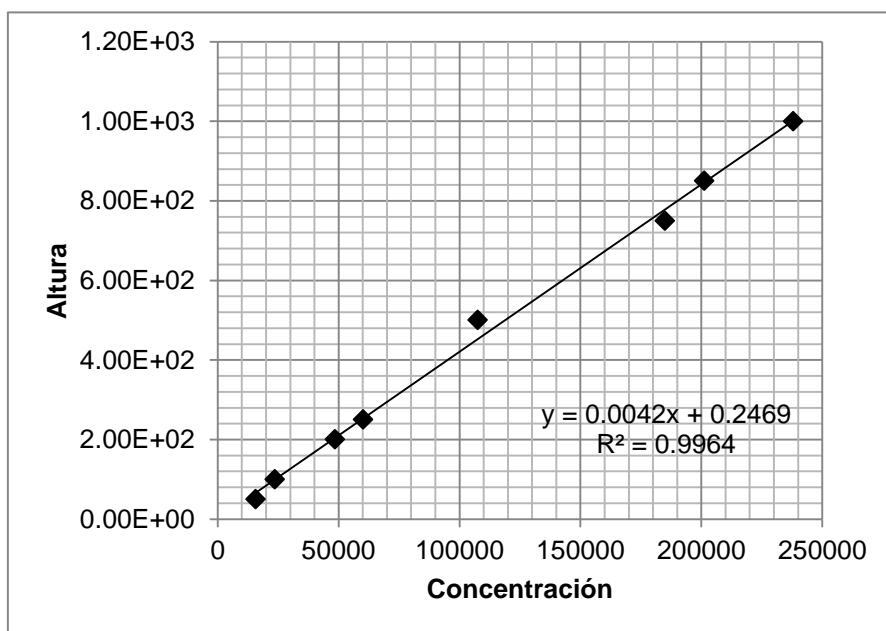
Tabla 3. Valores para las curvas de calibración de los esteres de forbol

Curva de calibración.			
Concentración ppm	Área ($\mu\text{V} \cdot \text{sec}$)	Altura (μV)	Tiempo de retención (min)
50	258724	15710	3.374
75	463021	27971	3.375
100	386074	23657	3.357
200	794995	48489	3.370
250	996881	60195	3.369
500	1916246	107471	3.370
750	3032819	184955	3.359
850	3343077	201161	3.343
1000	3885348	237963	3.343
		Promedio	3.3622

Con los valores de la tabla anterior se realizaron la Gráfica 1 y Gráfica 2.



Gráfica 1. Curva de calibración con base en áreas



Gráfica 2. Curva de calibración con base en alturas

Las ecuaciones obtenidas mediante regresión lineal de los puntos experimentales de las gráficas 1 y 2 son:

$$\text{Área} \qquad Y = 0.0003X - 5.5247$$

$$\text{Altura} \qquad Y = 0.0042X + 0.2469$$

Con ambas ecuaciones y con el comportamiento de las rectas de correlación, se optó por utilizar únicamente aquella que relaciona áreas ya que este valor es más representativo ya que engloba también a las alturas para su cálculo.

5 Procedimiento Experimental

Para esta primera etapa experimental se trabajó únicamente con *Jatropha curcas* proveniente de Nayarit (Predio Manuel Herrera), para poder hacer un comparativo con las demás pruebas y solo tener una variable a analizar.

En busca de una propuesta de desintoxicación sencilla se probó con la maceración.

5.1 Maceración

Con base en la literatura:

- Se eligió el metanol ya que éste disuelve a los esteres de forbol.
- Los análisis de los espectros se realizó con una $\lambda=260$ nm, por ser esta la longitud de onda promedio para la identificación de esteres de forbol.
- La *Jatropha curcas* se clasificó, como se muestra en la

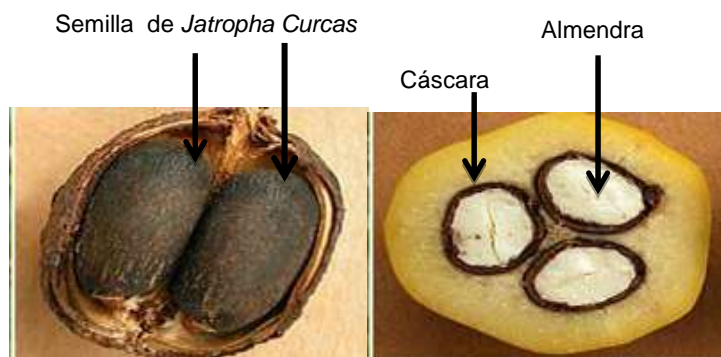


Figura 14. Identificación de las partes de la semilla de *Jatropha curcas*.

En general la metodología para la maceración es la siguiente:

- Pelar la semilla hasta obtener aproximadamente 20 g de la almendra.
- Molerla

- Colocarla en un recipiente con tapa y agregar el metanol (grado analítico) necesario para cubrir las almendras.
- Cubrir con papel aluminio y se dejar un tiempo de 48 horas.
- Pasado este tiempo las muestras se filtran con una membrana.
- Tomar una porción y analizar en HPLC, con un tiempo de 15 minutos por muestra, los cromatogramas se analizan con una longitud de onda de $\lambda = 260$ nm.
- Si las muestras se encuentran concentradas diluirlas.

Las variables manejadas en esta etapa experimental se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Optimización de la técnica de maceración.

Variable	Condiciones	Objetivo
Diferentes temperaturas de maceración	Temperatura ambiente Temperatura de -4°C	Determinar la influencia de la temperatura de extracción mediante el método de maceración.
Secado de la almendra	Temperatura ambiente Temperatura de 55 °C por 3 días.	Comprobar si es necesario un tratamiento previo de la almendra.
Tiempo de análisis de las muestras.	Almacenamiento a temperatura ambiente y temperatura de -4°C por 3 semanas	Comprobar si existe una degradación de los compuestos.
Sección de la semilla con mayor concentración	Maceración cáscara y maceración semilla.	Encontrar que sección de semilla es mas rica en esteroides de forbol.

5.2 Método Soxhlet

Se eligió una extracción continua por su eficiencia y su capacidad de agotar el compuesto de su fuente natural.

En general la metodología Soxhlet es la siguiente:

- Pelar la almendra necesaria para llenar el dedal del Soxhlet.
- Moler la almendra.
- Colocar la almendra molida en el filtro y disponer al armado del equipo Soxhlet.
- Se agregó la cantidad necesaria, según el tamaño del equipo, para iniciar la extracción.
- Mantener la temperatura, por medio de agitación.
- Realizar el número de extracciones establecidas.
- Se tomó una porción de cada muestra y se analizó en HPLC, donde se dio un tiempo análisis de 15 minutos a cada muestra. Los cromatogramas obtenidos se analizaron $\lambda = 260$ nm.

Las variables que se trabajaron en esta técnica de extracción se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Optimización de la técnica de extracción Soxhlet.

Variable	Condiciones	Objetivo
Extracción Soxhlet con un solo disolvente	Disolvente: Metanol (grado analítico) Temperatura de extracción (T_{ext}): 60 °C Número de extracción (N_{ext}): 10	Conocer la eficacia del método Soxhlet con un solo disolvente.

Variable	Condiciones	Objetivo
Diferentes velocidades de calentamiento con un solo disolvente	Velocidad alta y baja de calentamiento.	Probar la afectación de las concentraciones de esteres de forbol, con base en la velocidad de calentamiento.
Varios solventes	Solventes: <ul style="list-style-type: none"> • n-hexano (grado analítico) $T_{ext}= 65^{\circ}C$ $N_{ext}= 6$ • Cloroformo (grado analítico) $T_{ext}= 60^{\circ}C$ $N_{ext}= 6$ • Metanol (grado analítico) $T_{ext}= 60^{\circ}C$ $N_{ext}= 6$ 	Contribuir a la solubilización de esteres quitando los compuestos que pueden crear impedimento, como son las grasas.
Varios solventes por sección de semilla	Solventes: <ul style="list-style-type: none"> • n-hexano $T_{ext}= 65^{\circ}C$ $N_{ext}= 6$ • Cloroformo $T_{ext}=65^{\circ}C$ $N_{ext}= 6$ • Metanol $T_{ext}= 65^{\circ}C$ $N_{ext}= 6$ 	Comprobar si por este método la sección de semilla con mayor contenido de esteres de forbol.

5.2.1 Ciclos de extracción con n-hexano.

En este experimento se buscó encontrar aquel ciclo de extracción donde las concentraciones de los aceites presentes en la semilla lleguen a su máximo.

Metodología:

- Se peló la semilla necesaria para llenar con almendra el dedal.
- Se molió cada porción.
- Se colocó en el filtro y se armó el equipo Soxhlet.
- Se colocaron 150 mL de n-hexano.
- Se prepararon y marcaron los viales de cada extracción.
- En cada ciclo extractivo se tomó una muestra.
- Cada muestra fue disuelta y se llevó a un análisis en HPLC, con un tiempo de corrida de 5 minutos con una longitud de onda $\lambda = 260$ nm.

5.3 Metodología obtenida

Con todos los experimentos anteriores se pudo proponer una metodología para la extracción de los esteres de forbol.

En esta parte experimental las semillas son de las siguientes regiones de la República Mexicana:

- Puebla
- Chiapas
- Nayarit
- Guerrero

Metodología:

- Pelar la semilla requerida para el llenado del dedal.
- Separar almendra y cáscara y moler cada porción.
- Colocar en el filtro y después armar el equipo Soxhlet.
- Colocar el n-hexano requerido por el equipo (dependiendo del tamaño).
- Manteniendo la agitación trabajar a una temperatura de 65 °C y realizar 7 extracciones.
- Retirar el producto obtenido, este se manda a un rotavapor, el aceite obtenido se coloca en un embudo de separación utilizando metanol para la separación de fases.
- Después de separar las fases se analiza la fase con metanol en HPLC con 5 minutos de corrida con longitud de onda de 260 nm.
- De la extracción Soxhlet se deja secar tanto el filtro como el material que contiene.
- Colocar metanol requerido por el equipo.
- Manteniendo la agitación se trabajó a una temperatura de 65 °C se realizan 10 extracciones.
- La muestra obtenida se diluye a razón de 1:15 y se analiza en HPLC con un tiempo de 5 minutos y longitud de onda de 260 nm.
- Los valores se registran en la Tabla 9. Concentraciones de *Jatropha* por regiones geográficas. (se encuentra en Resultados y Análisis).

6 Resultados y Análisis

Los resultados obtenidos se dividen en dos secciones:

- Obtención de la metodología para la extracción de los esteres de forbol empleando las técnicas de extracción sólido-líquido :
 - Maceración
 - Extracción Soxhlet
- Cuantificación de los esteres de forbol contenidos en las semillas recolectadas de distintas regiones de la República Mexicana.

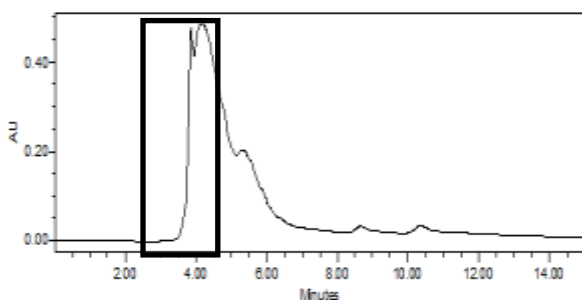
6.1 Obtención de la metodología para la extracción de los esteres de forbol

En esta etapa se comprobaron las hipótesis sobre la metodología de obtención de los esteres de forbol que han sido reportadas. Al finalizar de todos los experimentos realizados se obtuvo una técnica optimizada para la extracción de los compuestos deseados de la semilla de *Jatropha curcas*.

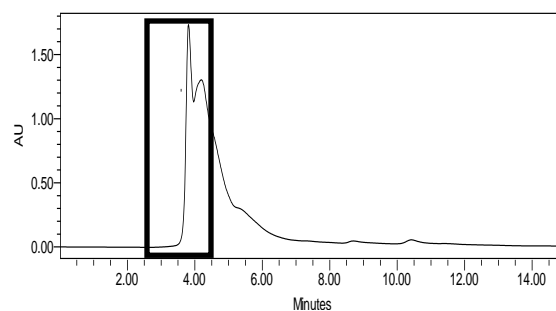
6.1.1 Maceración

6.1.1.1 Efecto de la temperatura de maceración

Los resultados de la maceración a diferentes temperaturas se muestran en los Cromatograma 2 y 3.



Cromatograma 2. Maceración de la almendra a temperatura de -4°C.



Cromatograma 3. Maceración de la almendra a temperatura ambiente.

En el cromatograma 2 se observa una señal desde los 3:30 min. y que finalmente declina pasados los 6 minutos, también señales más pequeñas a los 8:30 y 10:30 minutos.

Para el cromatograma 3 se tiene un comportamiento similar, señales desde los 3:30 min hasta los 6 min y otras muy pequeñas pasando los 10 minutos.

Para ambas muestras las señales están muy concentradas, por lo que se hicieron diluciones para cada muestra, los resultados de dichas diluciones se muestran en la Tabla 6.

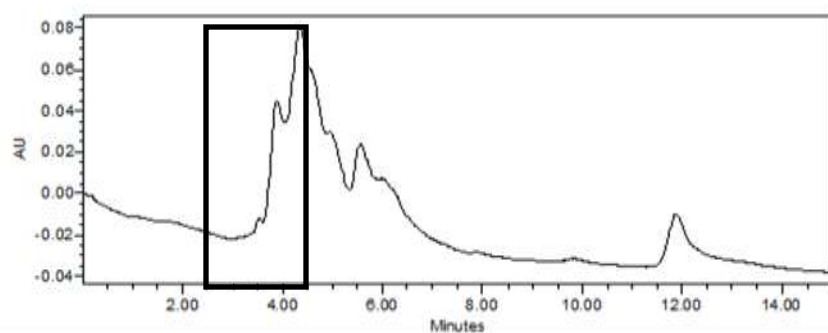
Tabla 6. Diluciones a temperaturas ambiente y refrigeración (-4°C).

	Dilución	Tiempo de retención (min)	Área	Concentración de área (ppm)	%	Comentario
Temperatura de -4°C	1:10	3.469	93691	23	0.74	Muy concentrada
		4.191	8087282	2421	64.26	
				2443	65	
	1:5	4.255	16487483	4941	70.21	Muy concentrada
	1:3	4.126	11609518	3477	8.07	Señal muy baja
		4.421	32328051	9693	22.46	
				13170	30.53	
	1:15	3.515	174917	47	1.58	Varias señales bien definidas
		3.882	1053794	311	9.52	
		4.37	5881262	1759	53.12	
				2116	64.22	
	Temperatura ambiente	1:10	3.758	466945	135	7.71
4.451			984448	290	16.26	
				424	23.97	
1:5		3.579	846097	248	0.34	Con señal muy pobre
		4.148	3608462	1077	1.47	
				1325	1.81	
1:3		3.723	1186220	350	4.23	Señal muy baja
		4.125	6517114	1950	23.23	
				2300	27.46	
1:15		3.356	370335	106	7.81	Varias señales bien definidas
		4.03	638745	186	13.47	
		4.287	529335	153	11.16	
			445	32.44		

■ Corresponden a las concentraciones totales de cada dilución.

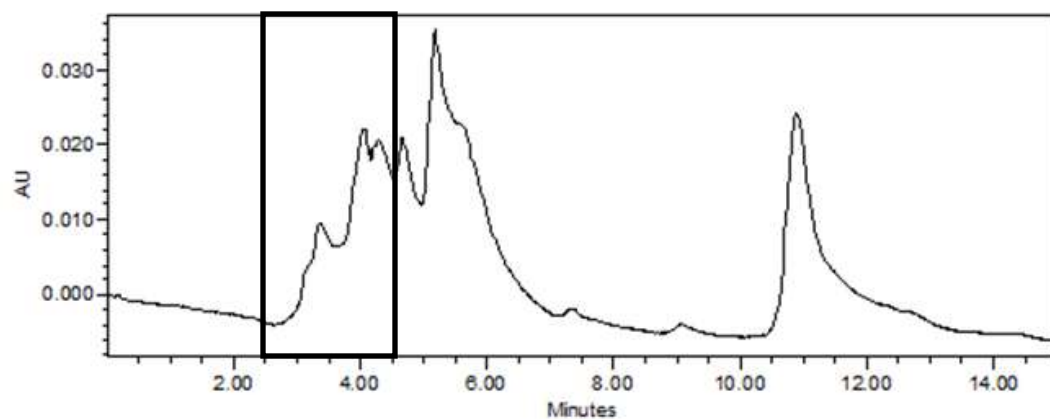
Con las muestras anteriores se eligieron aquellas diluciones donde se tuvo una mejor distribución de las señales que se encuentran en el rango de 2.37-4.37, tiempo que se estableció donde pueden encontrarse los diferentes esteres de forbol, ya que el tiempo de retención del estándar fue de 3.375 y se consideró ± 1 min.

En el Cromatograma 4 se pueden apreciar diferentes señales desde los 3:30 min hasta 6:30 y una señal aunque pequeña bien definida a partir de los 11:30 minutos, esta muestra corresponde a la maceración de la semilla a temperatura ambiente en una dilución de 1:15 con metanol.



Cromatograma 4. Maceración de la semilla a Tamb, dilución 1:15

De igual manera en el Cromatograma 5 se presenta la muestra de la maceración de la semilla pero a temperatura de refrigeración de -4°C en una dilución 1:15, en donde se puede ver la presencia de una mayor cantidad de compuestos desde los 3:00 minutos y terminando hasta los 6:30 minutos, hay señales muy pequeñas a los 8 y 10 minutos para finalmente terminar con otra señal a los 11 minutos.



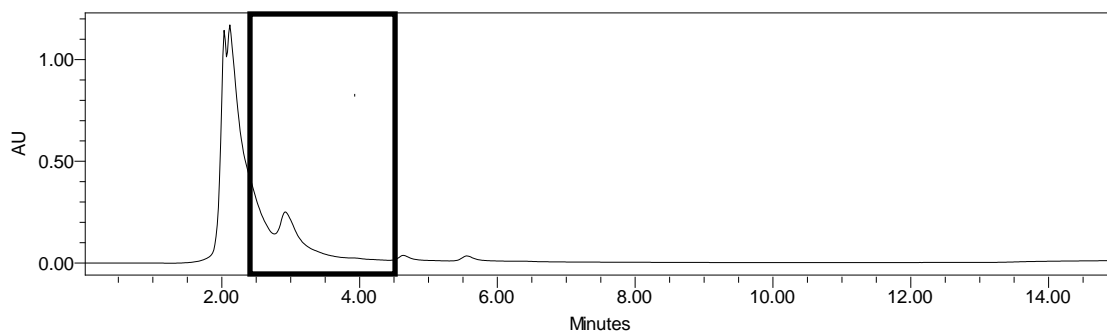
Cromatograma 5. Maceración de la almendra a T=- 4 °C, dilución 1:15

Con base a estos resultados, las muestras posteriores se analizaron utilizando la concentración 1:15, muestra-metanol, porque se definen una mayor cantidad de señales para ambas temperaturas.

Debido a que la diferencia de señales es muy pequeña, se ha elegido la maceración a temperatura ambiente por el fácil manejo de las condiciones y la estabilidad del proceso.

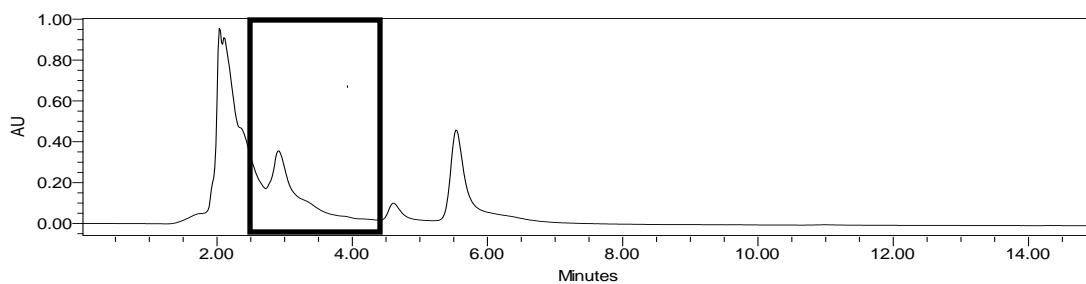
6.1.1.2 Secado de la semilla

Los resultados a temperatura ambiente, Cromatograma 6, muestran una disminución en la concentración de todas las señales después de los 2:30 minutos, lo que está generando una disminución considerable en los esteres de forbol.



Cromatograma 6. Secado a temperatura ambiente

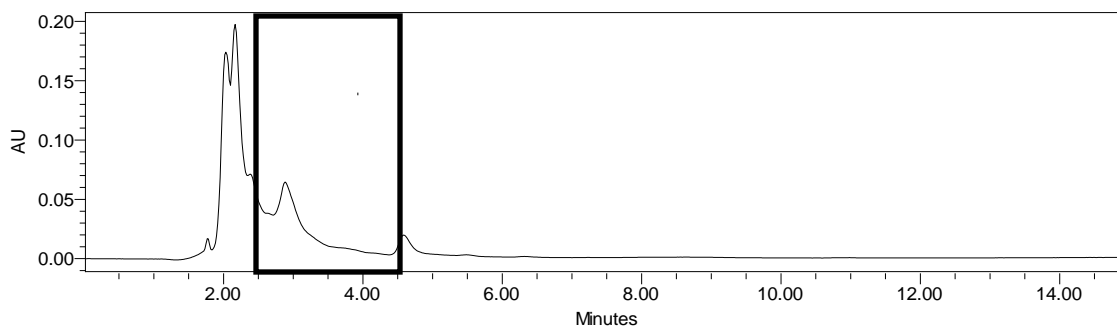
Por otro lado en el Cromatograma 7 aunque la concentración de algunos compuestos es mayor como es el caso de los esteres de forbol son concentraciones muy bajas por lo que el secado a temperatura de 55°C es igualmente descartado.



Cromatograma 7. Secado a temperatura de 55 °C

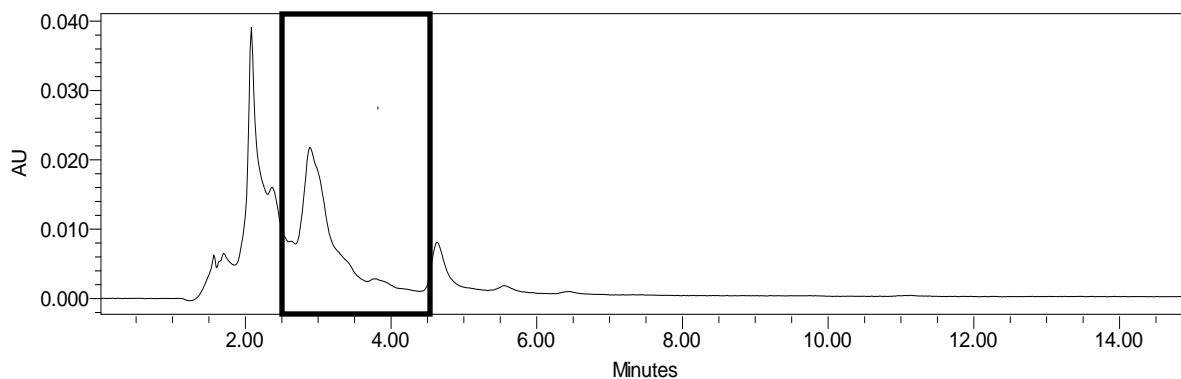
Es por estos resultados que no se realizó ningún tipo de secado a las semillas procurando realizar toda la metodología el mismo día, para así evitar pérdidas de los compuestos a estudiar.

6.1.1.3 Diferentes tiempos de análisis



Cromatograma 8. Maceración a Tamb con almacenamiento de 3 semanas.

En los Cromatograma 8 y 9 se tiene un comportamiento similar, una disminución de las concentraciones de los esteres de forbol, sin embargo son mayores en temperatura de refrigeración.

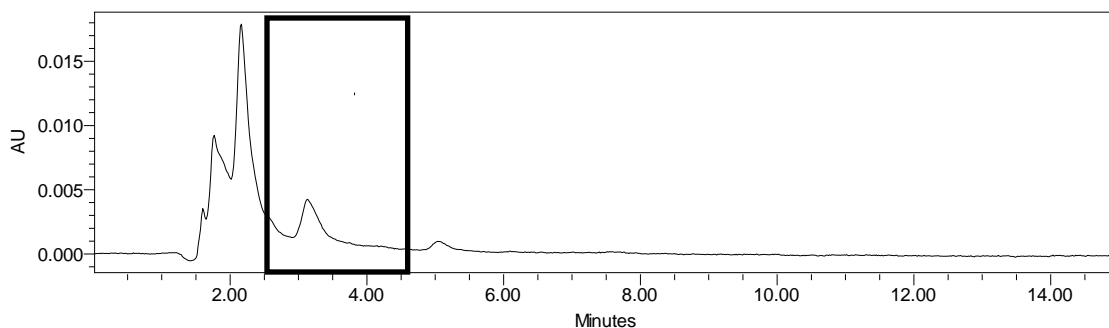


Cromatograma 9. Maceración a T= - 4°C con almacenamiento de 3 semanas.

Los resultados arrojan que los compuestos que se logran extraer de la semilla se van degradando, esto puede deberse a la luz pero también se determinó que es mejor mantener las muestras refrigeradas ya que se obtiene menor disminución de las concentraciones de todos los compuestos.

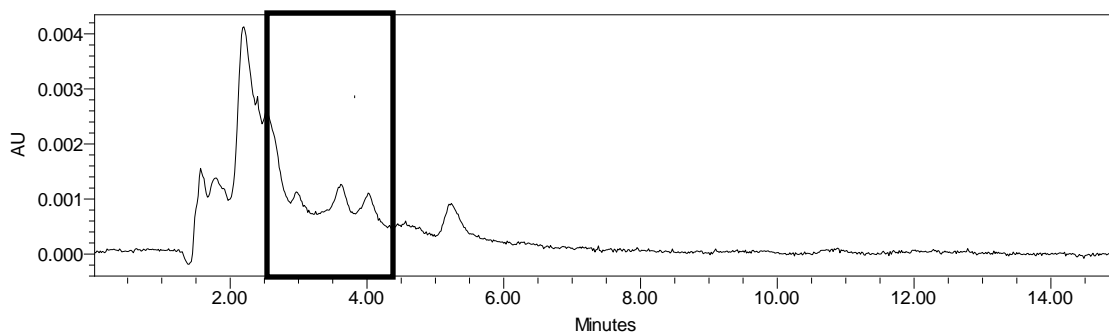
6.1.1.4 Sección de la semilla con mayor concentración de esteres de forbol

El Cromatograma 10 es de la muestra obtenida por la maceración de la almendra, a temperatura ambiente, donde se aprecia una señal pequeña en el rango de 2:30-4:30 minutos.



Cromatograma 10. Maceración de la almendra.

En el caso de la maceración de la cáscara, Cromatograma 11, se puede notar una mayor presencia de compuestos en el rango que se estableció para conjuntar a los esteres de forbol.



Cromatograma 11. Maceración de la cáscara

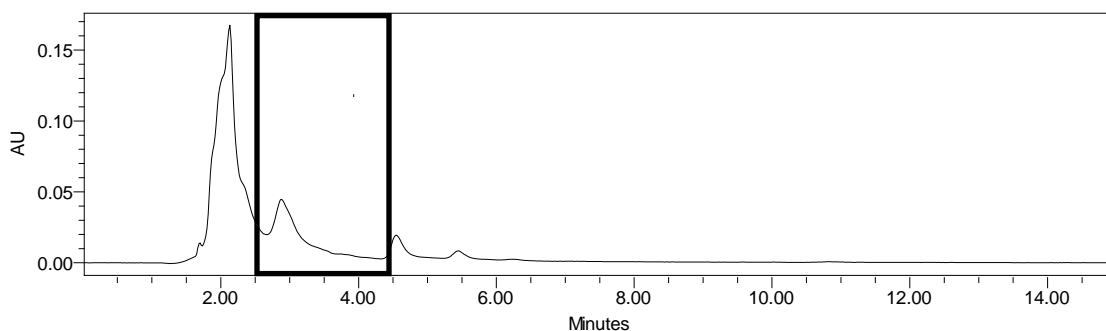
Como resultado de este experimento se logró comprobar que existen más compuestos en la cáscara que en la almendra, para el caso de la semilla procedente de Nayarit, pero para los experimentos posteriores se analizaron tanto cáscara como almendra.

6.1.2 Método Soxhlet

6.1.2.1 Con un solvente

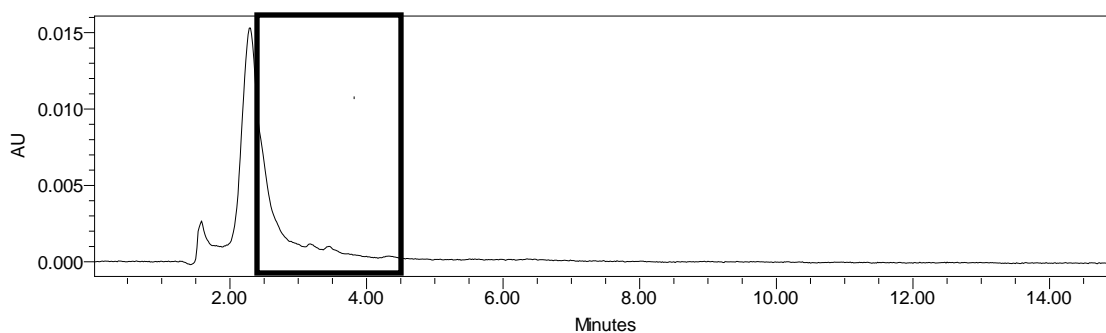
6.1.2.1.1 Secciones de semilla a analizar

En el Cromatograma 12 se muestra los resultados de la extracción de la almendra, donde aparecen muy pocas señales y las que están en el rango de interés son muy pobres.



Cromatograma 12. Extracción Soxhlet de la almendra con un solvente

Caso contrario al experimento anterior, sección de mayor concentración, en esta muestra no se obtienen señales entre 2:30 y 4:30 minutos, por lo que se podría pensar que no hay presencia de esteres de forbol para esta semilla (Cromatograma 13).

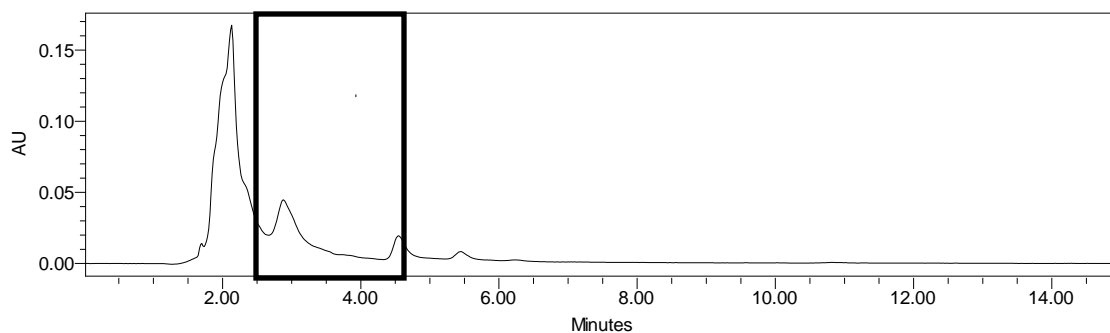


Cromatograma 13. Extracción Soxhlet de la cáscara con un solvente

En ambos casos, almendra y cáscara, las señales presentes son pocas y en concentraciones muy bajas, es por eso que se optó por buscar diferentes solventes para poder quitar compuestos que puedan interferir en la solubilización de los esteres de forbol en el metanol.

6.1.2.1.2 Rapidez de calentamiento

Para el rango de tiempo de los esteres de forbol aparece un pico, muy pequeño a los 3 minutos.



Cromatograma 14. Extracción con metanol a alta T de calentamiento

En este experimento se comparan los Cromatograma 12 y 14 donde la diferencia solo fue la rapidez de calentamiento para las extracciones, el resultado fue:

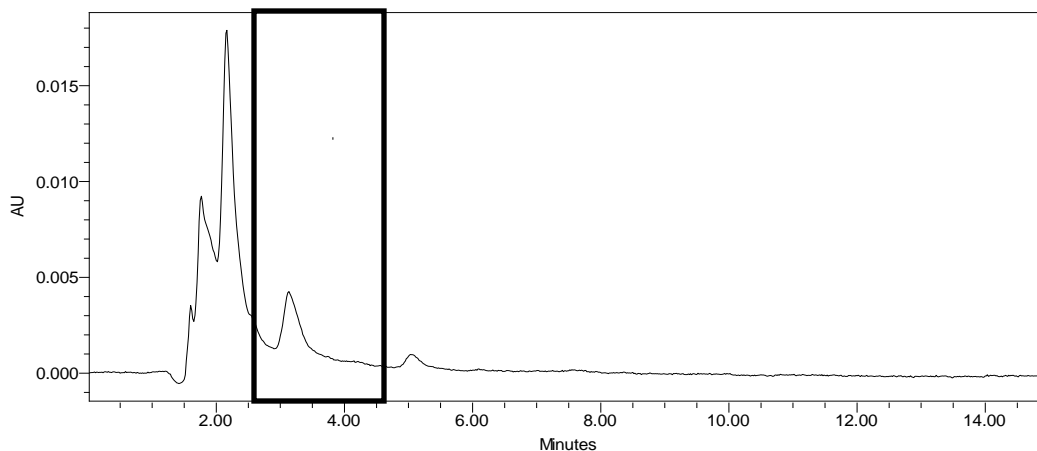
- Menor tiempo en cada extracción por lo que menor tiempo de contacto de solvente-semilla.
- Diferentes concentraciones y compuestos obtenidos entre cada muestra.
- La coloración amarillenta de cada ciclo de extracción es mayor a un calentamiento mayor. Esta coloración se le atribuyó a la cantidad de aceite extraído.

6.1.2.2 Con varios solventes

6.1.2.2.1 Por secciones de semilla

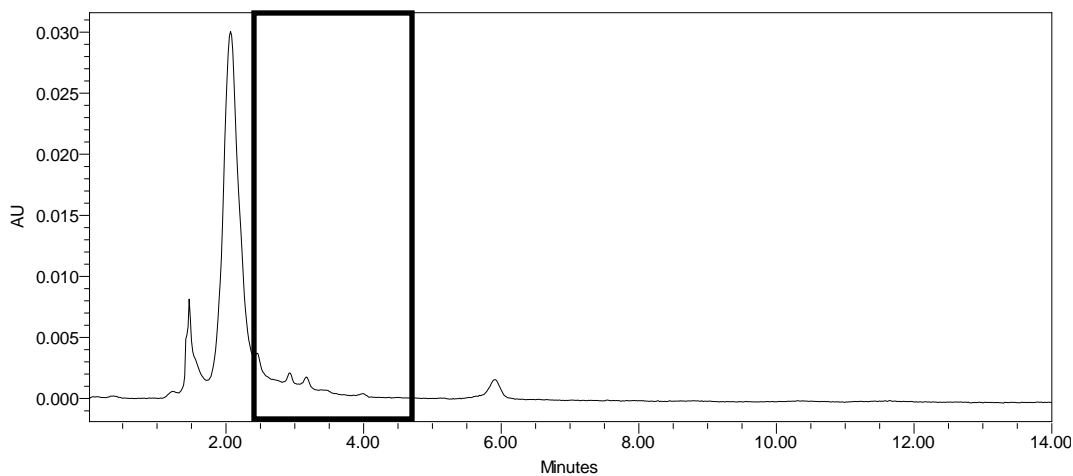
Para los solventes utilizados se obtuvieron resultados muy diferentes dependiendo del orden en que se realizaron las extracciones. El mejor resultado se obtuvo utilizando primero n-hexano, cloroformo y metanol, pero ya que el cloroformo y metanol disuelven a los esteroides de forbol y en los últimos cromatogramas se observa que el metanol extrae más cantidad de éstos se evita utilizar el cloroformo.

En el Cromatograma 15 se muestran las señales obtenidas de la extracción por método Soxhlet, donde hay una mayor presencia de compuestos y a concentraciones más altas que por un solo solvente, sin embargo, para los tiempos de interés el aumento solo es en la concentración de la única señal que aparece en el rango de 2:30-4:30 min.



Cromatograma 15. Extracción Soxhlet varios solventes almendra-metanol

Para el Cromatograma 16, se observa un comportamiento casi similar a la extracción Soxhlet con un solo solvente, ya que las señales de 2:30-4:30 minutos son muy pequeñas que no pueden ser contabilizadas.



Cromatograma 16. Soxhlet varios solventes cáscara-metanol.

Para ambos casos de extracción con Soxhlet se nota una mayor concentración en la almendra, sin embargo, en la maceración el resultado fue inverso, esto puede atribuirse a las semillas que se utilizaron para las muestras, que aunque sean del mismo lote, el tiempo en que se trabajaron fueron diferentes.

Es por esta razón que la metodología encontrada se trabajará tanto con cáscara como con almendra.

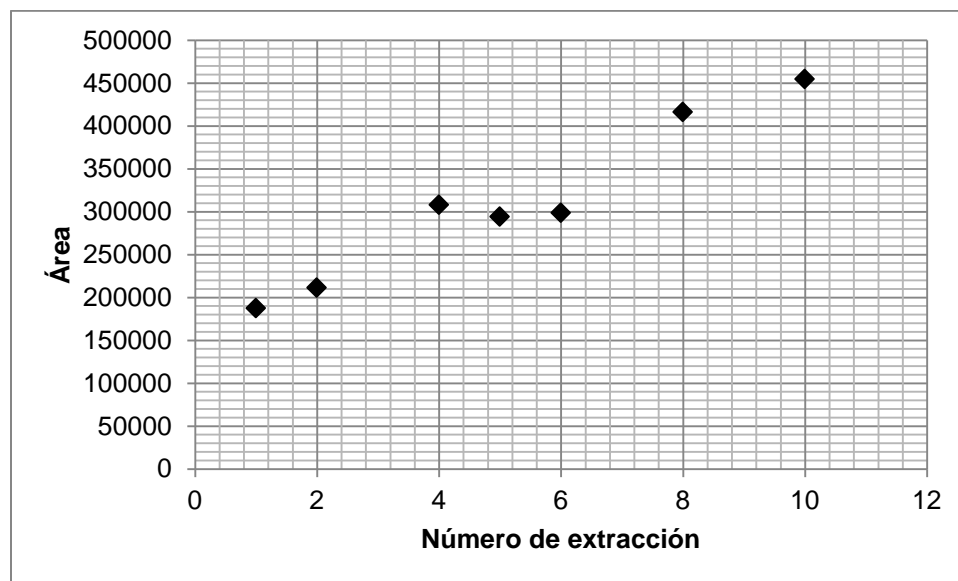
6.1.2.3 Ciclos de extracción con n-hexano

. Los resultados se muestran en la Tabla 7:

Tabla 7. Concentración por ciclo de extracción del n-hexano.

Número de extracción	Tiempo	Área	%
1	2.543	55065	29.39
	2.691	132285	70.61
2	2.533	74114	35.08
	2.669	137167	64.92
3	2.536	44729	31.33
	2.666	98054	68.67
4	2.535	110734	33.66
	2.667	197050	59.9
5	2.523	98532	33.49
	2.649	195651	66.51
6	2.529	91435	30.64
	2.663	206963	69.36
7	2.517	155207	35.37
	2.642	63.05	63.05
8	2.522	141385	33.62
	2.4649	274594	65.29
9	2.522	301669	51.86
	2.667	244300	42
	3.883	2068	0.36
	4.001	5661	0.97
10	2.52	163313	33.91
	2.644	291220	60.47
	4.019	6187	1.28
	4.469	7857	1.63

Para una mejor interpretación de estos valores han sido resumidos en la Gráfica 3. Donde se puede apreciar que la concentración de algunos compuestos llega a un máximo desde la extracción 6, y cuando los puntos vuelven a tener un aumento es por que se comienzan a solubilizar compuestos con tiempos de retención mayores como se puede observar en el ciclo de extracción número 9 de la Tabla 7 a partir de la extracción 10 se obtienen compuestos con tiempos de retención mayores.

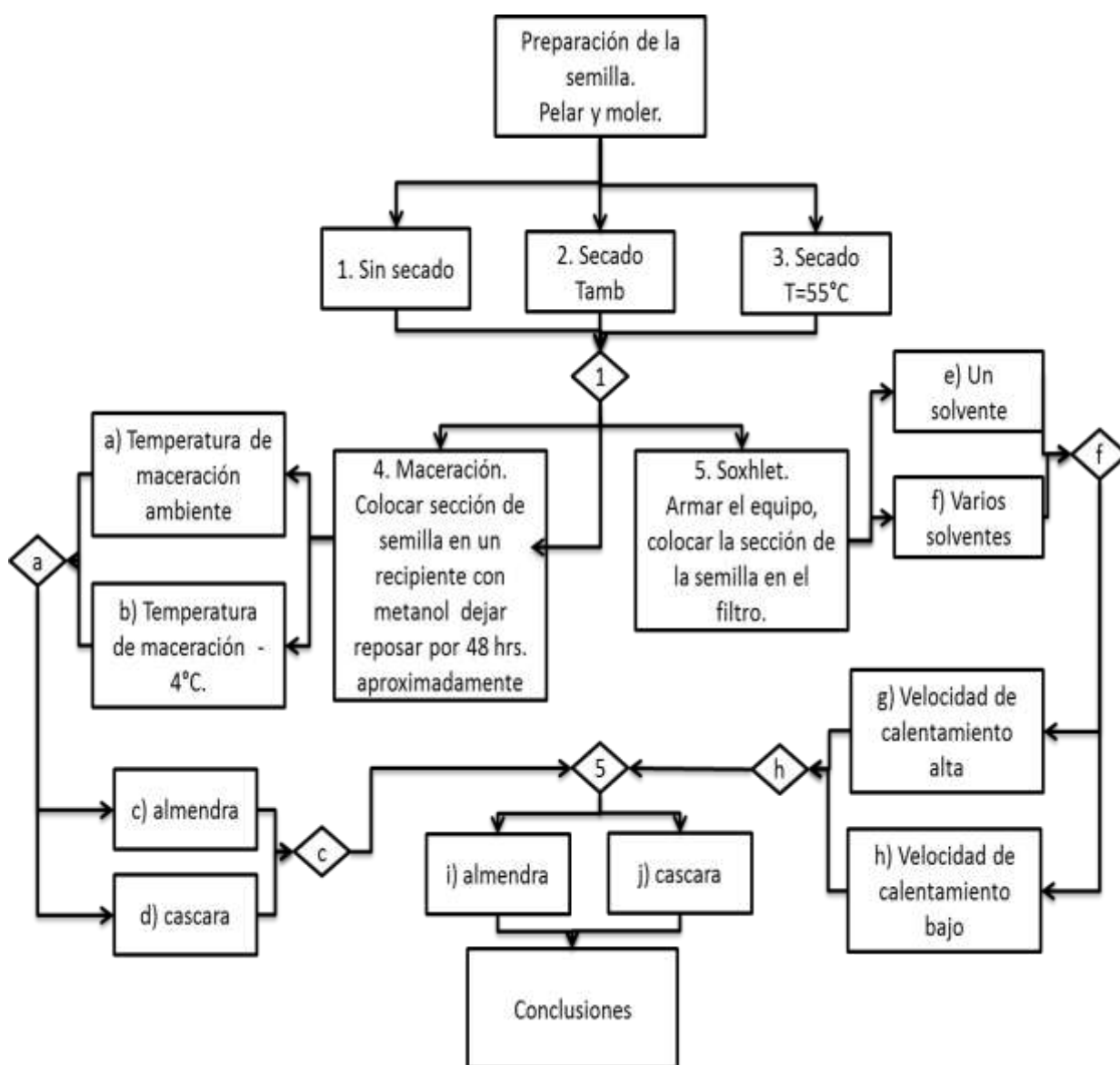


Gráfica 3. Áreas vs ciclo de extracción

Con base a los resultados obtenidos se eligió realizar solo 7 extracciones para dar un rango de tiempo en lo que el sistema baja su temperatura, ya que a partir de la extracción 9 los compuestos que aparecen se encuentran en el rango de tiempo establecido para identificación de los esteres de forbol.

6.2 Metodología establecida

En esta sección se han simplificado todos los experimentos realizados en el siguiente diagrama:



Nota:

Para el análisis en HPLC se utilizaron diluciones 1:15 con metanol y longitud de onda $\lambda=260$ nm por la definición que presentan las señales con estas condiciones.

6.2.1 Análisis de la metodología.

- Secado de la semilla: si la semilla se mantiene pelada y expuesta durante algunos días ó se calienta; en cualquier método no presenta esteres de forbol, es por eso que no se realiza secado previo.
- Maceración: este método se trabajó por más de 48 horas para cada caso, de donde se obtuvo que, a temperatura ambiente la concentración de los esteres de forbol es mayor mientras que los demás compuestos presentes en las muestras tienen concentraciones menores, caso contrario en temperatura de -4°C .
 - Almendra-cáscara: para esta técnica se encontró que la almendra es más rica en esteres de forbol.
- Extracción Soxhlet: para esta prueba encontramos que al utilizar varios solventes la última muestra extraída con metanol tiene la mayor presencia de esteres de forbol y muy poca de otros compuestos.
 - Rapidez de calentamiento: se optó por que sea lenta para evitar que se quemen los compuestos.
 - Almendra-cáscara: para esta técnica se obtuvo que la cáscara es más rica en esteres de forbol.
- Maceración-Soxhlet: las concentraciones totales tanto de cáscara como de semilla fueron mayores por el método Soxhlet sin embargo en maceración se encontró una mayor concentración de esteres en cáscara mientras que el método Soxhlet sugiere lo contrario, por estos motivos se analizan tanto cáscara como almendra.
- El tiempo en que se analizaron las muestras fue un factor importante ya que los compuestos se degradaban, es por esto que el procedimiento tiene que ser de inmediato.

6.2.2 Semillas se diferentes regiones geográficas

En la Tabla 8 se muestran las condiciones de la semilla de *Jatropha curcas* que fueron analizadas, cabe destacar que la primera parte de los experimentos, para establecer la metodología, fue realizada con la semilla de Nayarit que tenía ya poco más de un año almacenada y todas las pruebas de esa etapa experimental duraron aproximadamente 4 meses, por lo que si existe una degradación de la semilla por tiempo, este puede influir.

Tabla 8. Condiciones de la *Jatropha curcas*.

Región	Toxicidad	Tiempo de almacenaje	Estado de la semilla	Dificultades
Nayarit	No tóxica	1 año	Regular	Al pelar : cáscara muy dura y una gran cantidad de almendras en mal estado
Puebla	Tóxica	1 año	Regular	Ninguna
Chiapas	Tóxica	Ninguno	Muy bueno	Ninguna
Guerrero	Tóxica	Ninguno	Malo	Al pelar y moler

Con la metodología establecida se analizaron las semillas de *Jatropha curcas* de diferentes regiones de la República Mexicana, los resultados de estas pruebas se encuentran en la Tabla 9.

El cálculo de las concentraciones se realizó con la correlación obtenida de la gráfica de Concentración vs Área.

Tabla 9. Concentraciones de *Jatropha* por regiones geográficas.

Región	Solvente	Peso de la almendra (g)	Peso de cáscara (g)	Concentración de la almendra [ppm]	% esteres/ peso almendra	Concentración cáscara [ppm]	% esteres/ peso cáscara
Nayarit	cloroformo	19.331	16.653	3.64355	1.8848E-06	41.93915	2.518E-05
	metanol			23.16485	1.1983E-05	96.53555	5.796E-05
Puebla	cloroformo	17.420	14.091	14.6023	8.3824E-06	ND	ND
	metanol			56.4635	3.241E-05	ND	ND
Chiapas	hexano	22.988	18.278	0.125	5.4376E-08	6.969	3.812E-06
	Aceite-hexano			12.58235	5.4734E-06	20.603	1.1272E-05
	Aceite-metanol			34.50955	1.501E-05	4.03695	2.208E-06
Guerrero	hexano	18.702	17.566	1.7687	9.4572E-07	ND	ND
	metanol			78.9125	4.2194E-05	ND	ND

ND: no detectable

Para la cáscara de la semilla de Guerrero no se obtuvieron señales bajo ninguna circunstancia, esto se le atribuye a la gran humedad contenida en la semilla, ya que ésta no se puede secar, se prefirió trabajarla del modo como se encontraba, sin embargo los resultados fueron negativos, ya que no se encontró rastro de los esteres de forbol.

Para las otras semillas tenemos que hay mayor concentración de esteres en la cáscara que en la almendra en Nayarit donde la semilla es considerada como no tóxica mientras que en Chiapas donde es considerada como muy tóxica se encuentra mayor presencia en la almendra que la cáscara.

7 Conclusiones

Una vez desarrollado este proyecto de investigación y analizados los resultados obtenidos se puede determinar que se lograron identificar y cuantificar los esteres de forbol de las semillas de *Jatropha curcas* recolectadas en diferentes regiones del territorio nacional mediante la técnica de HPLC, lo cual llevó a desarrollar una metodología para las mejores condiciones de extracción de estos compuestos.

Las conclusiones particulares para cada una de las etapas experimentales son:

Caracterización

- En CCF se encontró una mezcla de disolventes (1:10 cloroformo-metanol) que permiten una buena separación de los esteres de forbol, esto puede ayudar en futuras investigaciones sobre todo como preámbulo en la creación de una columna cromatográfica, si se pretende separar estos compuestos en cantidades mayores a las trabajadas en el laboratorio.
- Con FTIR se obtuvo el espectro, con el cual se podrá hacer el comparativo cuando esta muestra se encuentre totalmente aislada.
- En HPLC a las condiciones que se lograron establecer se obtuvo una curva para la identificación de los esteres de forbol.

Metodología establecida.

- Se lograron grandes avances en este trabajo al entender los factores que afectan la obtención de esteres de forbol, siendo estos:
 - Una maceración de entre -4 °C hasta los 20 °C teniendo mejores resultados si las muestras se mantienen en refrigeración.

-
- El secado de la semilla no es conveniente debido a que las concentraciones de los compuestos de interés se ven afectadas.
 - La exposición a la luz es otro de los factores que provocan la disminución en la concentración de esteres de forbol.
 - Para la extracción por medio del Soxhlet con varios solventes mejora la separación de compuestos y así obtener los compuestos de interés
 - Se pudo establecer el número de ciclos de extracción de 7.
 - La rapidez de calentamiento se realizó de forma lenta de otra manera el solvente se puede quemar más fácilmente y el tiempo de contacto con la semilla es mucho menor.
 - El orden en que se utilizaron los disolventes en el equipo Soxhlet ayudó para comprobar que el metanol solubiliza más a los esteres que el cloroformo, por lo que conviene La concentración de la semilla según el método puede ser mayor para la cáscara o la almendra.
 - tración de la semilla según el método puede ser mayor para la cáscara o la almendra.

Regiones analizadas.

Este resultado es muy interesante ya que la semilla que es considerada tóxica, por los pobladores donde fue recolectada, tiene una mayor concentración de esteres de forbol en la almendra, mientras que la semilla que es considerada como no tóxica es más rica en esteres de forbol en el lado de la cáscara.

Para estos resultados es importante tener en cuenta que las concentraciones de esteres de forbol son considerando tiempos cercanos (± 1 min) a los del estándar (Sigma-Aldrich, phorbol 12-myristate 13-acetate), sin embargo estos podrían tener tiempos de retención muy alejados, ya que como se mostró en el marco teórico se están proponiendo nuevas estructuras constituidas por grupos funcionales muy

diferentes a los que se ha logrado aislar, por lo que serán necesarias más pruebas de caracterización para probar o no la presencia de esteres de forbol.

Finalmente para este trabajo se encontró que a pesar del tiempo y las condiciones en que se mantuvieron, la semilla con mayor concentración de esteres en la almendra es la proveniente del estado de Puebla, mientras que la proveniente de Nayarit es más rica en esteres de forbol en la cáscara.

8 Perspectivas a futuro

Con este trabajo se buscó y logró obtener una metodología de extracción de compuestos de alto valor agregado como lo son los esteres de forbol. Con ella se puede trabajar más fácilmente en futuros trabajos como:

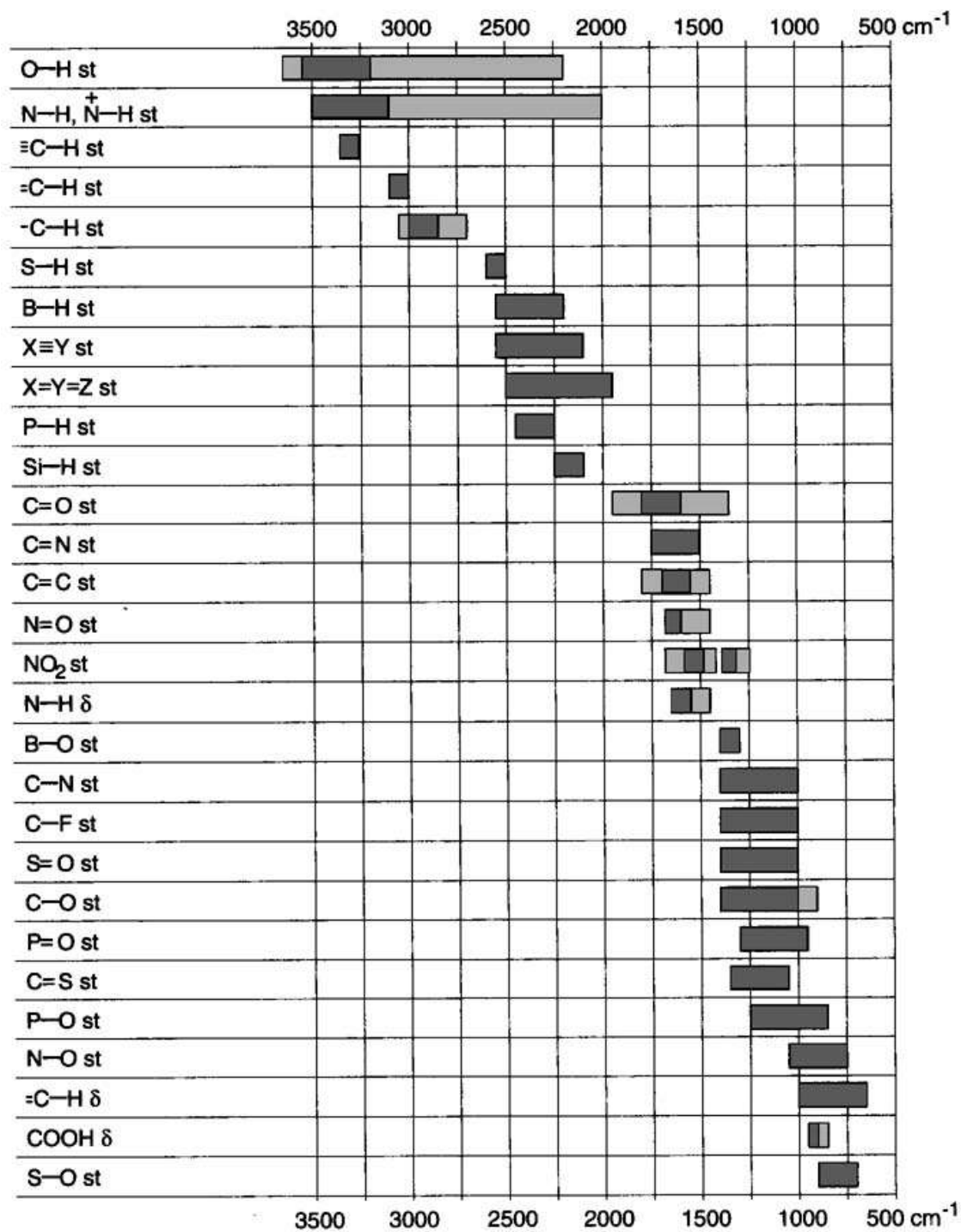
- Demostrar que todos los compuestos obtenidos son esteres de forbol.
- Aislar los compuestos obtenidos para realizarles más pruebas y así poder definir las concentraciones de cada señal obtenida.
- En esta metodología se encontró que en el método Soxhlet al utilizar metanol, retirar el líquido y ponerlo en refrigeración se obtienen precipitados. Se necesitará saber que son éstos.

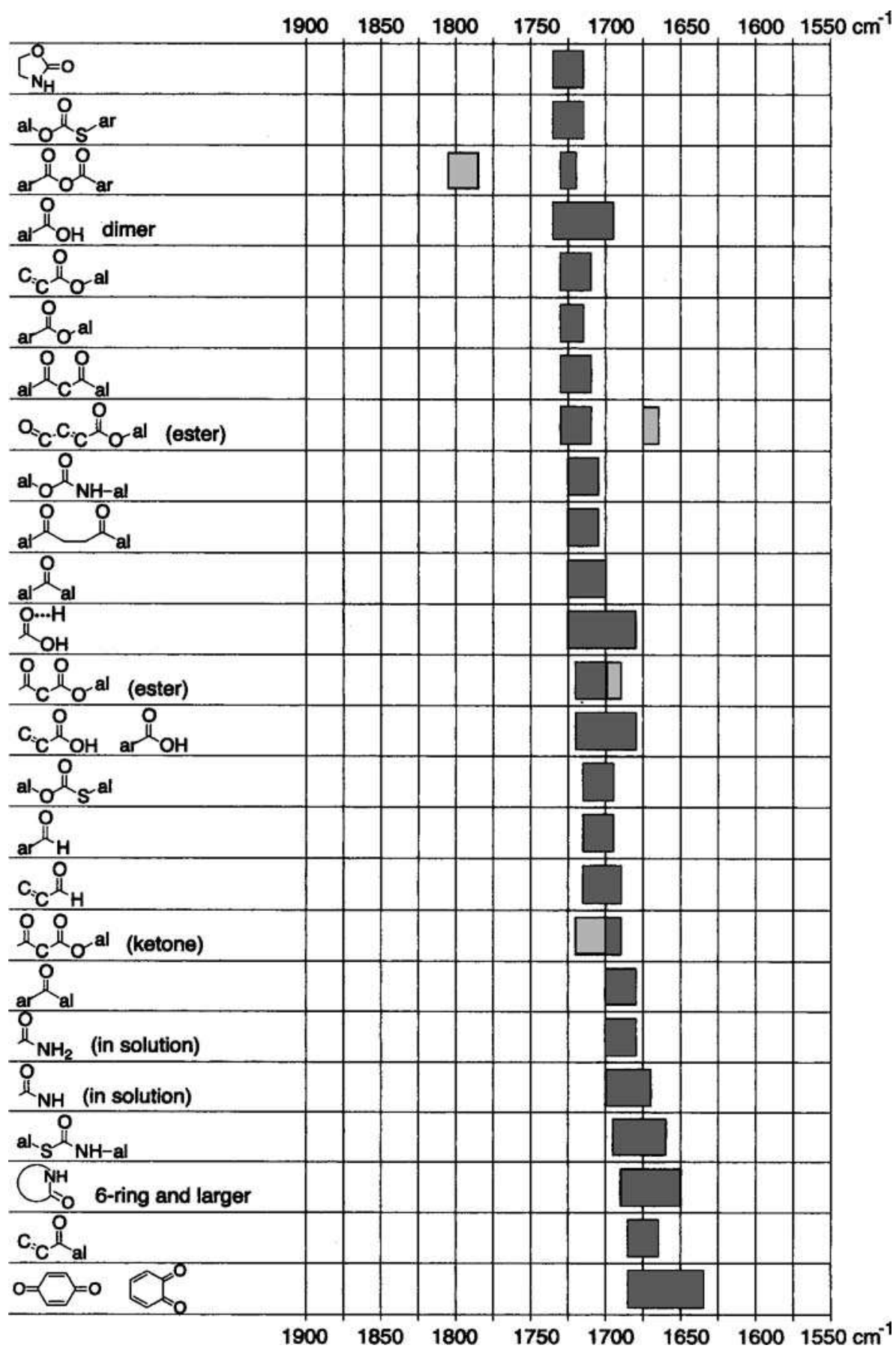
Por otro lado a nivel industrial los resultados de esta investigación son prometedores si se logran comprobar que la toxicidad de las semillas es atribuible en mayor medida a los esteres de forbol, ya que se tiene una técnica de extracción tanto de la cáscara como de la almendra para que la semilla al pasar un proceso de producción de biodiesel, la torta residual pueda tener otro fin como lo puede ser forraje para animales. De lograrse detoxificar a la semilla y darle uso como forraje esto le da un valor agregado a la producción de biocombustibles, por lo que el proceso se vuelve competitivo contra la producción de diesel.

Para una extracción a niveles mayores se tendría que escalar el proceso y en general la semilla tendría que ser separada en cáscara y almendra, molerlos y realizar una extracción sólido-líquido en equipo Soxhlet por otro lado para separar a los esteres de forbol se puede utilizar la cromatografía en columna utilizando metanol como fase móvil. Como apoyo en esta investigación se adelantó un poco con la técnica en capa fina y se obtuvo una de las posibles mezclas de eluyentes (1:10 cloroformo-metanol) para poder extraer a los esteres de forbol.

9 Anexos

Resumen de las bandas de absorción más importantes de IR.





10 Bibliografía

Ashwani Kumar Satywati Sharma An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.) [Publicación periódica]. - India : ScienceDirect, 2010. - 1-10 : Vol. 28.

Biodisol [En línea]. - Diciembre de 2011. - www.Biodisol.com.

Cai-Yan Li Rakshit k. Devappa, Jian-Xin Liu Toxicity of *Jatropha curcas* phorbol esters in mice [Publicación periódica]. - [s.l.] : Food and Chemical Toxicology, 2010. - 620-625 : Vol. 48.

Comisión económica para América Latina y el Caribe [En línea]. - 12 de Noviembre de 2011. - <http://www.eclac.org/>.

D. N. Muanza K. L. Euler, L. Williams and D. J. Newman Screening for Antitumor and Anti-HIV Activities of Nine Medicinal Plants from Zaire [Publicación periódica]. - USA : Pharmaceutical Biology, 1995. - 2 : Vol. 33.

Dr. Harald Norbert Böhnel Dr. Román Pérez Enríquez, Mc. Fernando Corbo Camargo Geociencias UNAM [En línea]. - Enero de 2012. - <http://www.geociencias.unam.mx/~bole/eboletin/treRebecaLM09.pdf>.

E. Pretsch P. Bühlmann, C. Affolter Structure Determination of Organic Compounds [Libro]. - Germany : Springer, 2000.

Gujan Goel Harinder P.S. Makkar, George Francis and Klaus Becker Phorbol Esters: Structure, Biological Activity, and toxicity in animals [Publicación periódica]. - Alemania : International Journal of Toxicity, 2007. - 279-288 : Vol. 26.

Harinder Makkar Joroen Maes, Wim De Greyt Removal and degradation of phorbol esters during pre-treatment from jatropha oil [Publicación periódica]. - Alemania : Biomass and bioenergy, 2010. - 1125-1133 : Vol. 34.

Herrera Martínez, Martinez Ayala Alma y Davila Ortiz Gloria El piñon mexicano (Jatropha Curcas L.) Fuente de energía renovable [En línea] // Universidad Autónoma del Estado de México. - Octubre de 2011. - http://www.uaemex.mx/Red_Ambientales/docs/memorias/Extenso/CB/EO/CBO-18.pdf.

J. Martínez-Herrera P. Siddhuraju, G. Francis, g. Dávila Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of Jatropha curcas L. from Mexico [Publicación periódica]. - Mexico : Food Chemistry, 2006. - 80-89 : Vol. 96.

Lamarque Alicia, Zygodlo Julio y López Liza Fundamentos Teórico-Prácticos de las Química Orgánica [Libro]. - Córdoba -Argentina : Brujas, 2001.

Maciel Carlos Álvarez Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional [Publicación periódica]. - México : Revista economía informa, 2009. - 359.

Miguel Ángel Sogorb Sánchez Eugenio Vilanova Gisbert Preparación de las muestras [Sección de libro] // Técnicas analíticas de contaminantes químicos. - [s.l.] : Diaz de Santos, 2004.

Rakshit K.Devappa H.P.S.Makkar, K.Becker Optimization of conditions for the extraction of phorbol esters from Jatropha oil [Publicación periódica]. - Alemania : sciencedirect, 2010. - 1125-1133 : Vol. 34.

SAGARPA [En línea] // bioenergeticos.gob.mx. - Noviembre de 2010. - www.bioenergeticos.gob.mx.

Secreteria de Energía [En línea]. - 02 de Diciembre de 2011. - <http://www.sener.gob.mx/>.

Sharapin Nikolar Tecnicas extractivas [Sección de libro] // Fundamentos de la Tecnología de productos Fitoterapéuticos. - Barcelona : CAB, 2000.

Skoog Dougla, Holler, James y Nieman Timothy Principios de análisis instrumental [Libro]. - España : Mc Graw Hill, 1992.

Skoog West, Holler, Crouch. Fundamentos de Química Analítica [Libro]. - México : Thomson, 2005.

Wilhelm Haas Heinz Sterk, Martin Mittelbach Novel 12-Deoxy-16-hydroxyphorbol Diesters Isolated from the Seed Oil of *Jatropha curcas* [Publicación periódica]. - Austria : Journal Natural Products, 2002. - 1434-1440 : Vol. 65.