

Determinación de ésteres de forbol en semilla de *Jatropha Curcas* de la Región Piura del Perú

Mario R. De La Cruz A., MBA¹, Diego M. Huaroto L.², BSc, Libio F. Espinoza M., BSc.¹

¹Universidad Nacional de Ingeniería, Perú, Universidad Nacional de Ingeniería, Perú, mario45b@gmail.com

²Universidad Nacional de Ingeniería, Perú, diego21hl@gmail.com

Resumen– Las principales fuentes para elaborar Biodiesel a nivel mundial son plantas oleaginosas como la Colza, la Soja, el Girasol y la Palma, cada cual focalizada en determinada región del mundo. En el debate por utilizar plantas de carácter alimenticio para generar combustibles, la *Jatropha curcas* se presenta como una buena alternativa por sus características particulares, planta rústica que no requiere tierras fértiles y más bien las mejora entre otras. El 30-35% del peso de su semilla es aceite, la cáscara de ésta el 35-40% y el 30% restante es un residuo rico en proteínas de alto valor nutricional que puede ser transformado en alimentos. Lamentablemente la semilla también contiene compuestos tóxicos y antinutricionales tales como los ésteres de forbol, EF's que promueven tumores y otros efectos biológicos nocivos que limitan su uso. Investigaciones en la Universidad Nacional de Ingeniería, UNI han determinado un proceso de extracción del aceite de la semilla de *Jatropha curcas* proveniente de la Región Piura-Perú y entre otros objetivos está la desintoxicación de los residuos proteicos. Se ha analizado los diversos productos del proceso para determinar el contenido de EF's utilizando el patrón Forbol 12-Miristato 13- Acetato, FMA. Los resultados de los análisis utilizando el Método de Cromatografía líquida de alto rendimiento, HPLC, no muestran presencia de FMA en la semilla analizada.

Palabras Claves: *Jatropha curcas*, Ester de forbol, Biodiesel, HPLC, aceite.

I. INTRODUCCIÓN

El uso por primera vez de aceites vegetales como combustibles, fue en 1900, Rudolph Diésel, lo utilizó por primera vez en su motor de ignición-compresión. Durante la segunda guerra mundial, se destacó la investigación realizada por Otto y Vivacqua en el Brasil, sobre diésel de origen vegetal. A raíz de la crisis energética y al elevado costo del petróleo, en 1970, se desarrolló significativamente el biodiesel. Las primeras pruebas técnicas con biodiesel se llevaron a cabo en 1982 en Austria y Alemania, y en 1985 se construyó la primera planta piloto en Silberberg-Austria, productora de RME (Rapeseed Methyl Ester - metil éster aceite de semilla de colza).

Las principales especies vegetales utilizadas en el mundo para elaborar biodiesel son la colza, soja, girasol y palma; vegetales oleaginosos no nocivos cuyos aceites a la vez son para consumo humano. La Unión Europea utiliza, principalmente, aceite de colza, mientras que Estados Unidos,

Brasil y Argentina producen biodiesel en su mayor parte a partir del aceite de soja y los países del sudeste asiático se basan en la utilización del aceite de palma. En el debate del intenso uso de plantas comestibles para la elaboración de combustibles que podría traer un desequilibrio global, la oleaginosa *Jatropha curcas*, se presenta como una excelente alternativa de reemplazo por las siguientes ventajas: Su producción no compete con plantas destinadas a la alimentación. Es una planta rústica. Su plantación recupera suelos degradados e infértiles y controla su erosión. Resistente a plagas. Su semilla tiene un alto contenido de aceite, cáscaras y proteínas con alto valor nutricional. Por estas ventajas es que se ha intensificado su estudio en los últimos años, en casi todo el mundo, como por ejemplo la India, China, países del Sudeste asiático, países de África y de América Central, en nuestro continente en Colombia y Brasil.

En la Universidad Nacional de Ingeniería, UNI, Lima Perú se han venido desarrollando varios proyectos con semilla de *Jatropha Curcas* proveniente de Morropón en la Región Piura, lo que ha significado proponer un proceso de extracción de aceite UNI, para su posterior transformación en combustible que se muestra en la Figura 1.

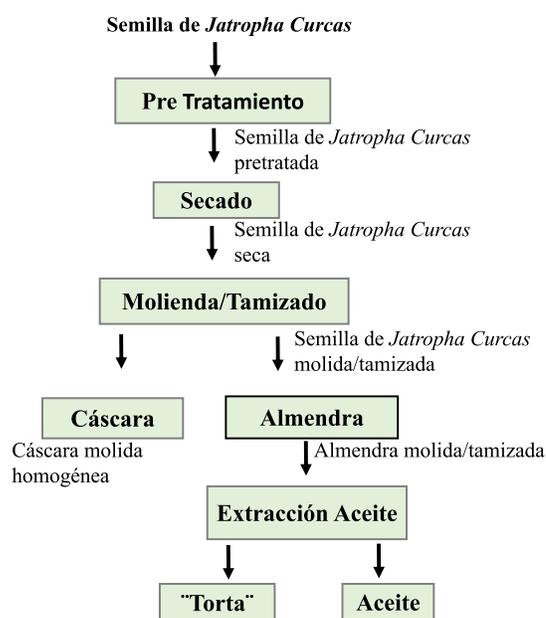


Fig. 1 Proceso UNI de extracción de aceite de semilla de *Jatropha Curcas*

En el proceso se obtiene además del aceite, cáscara molida homogénea con un tamaño definido de partícula y una "torta" rica en proteínas como se aprecia en la Figura 2.

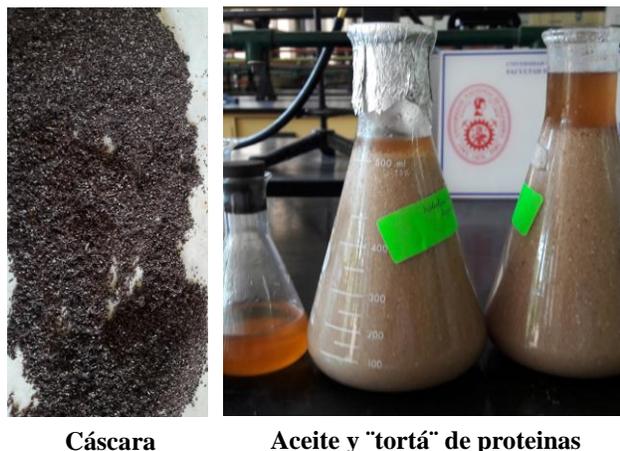


Fig. 2 Materiales que se obtienen en la extracción de aceite de semilla de *Jatropha Curcas* – Proceso UNI

Usualmente el aceite representa del 30-35% en peso de la semilla, la cáscara del 35-40% y la torta 30% respectivamente. La cáscara molida y separada en su mayor parte en la etapa de molienda, es homogénea y de tamaño de malla definido y en el proyecto se utilizará para la obtención de Biogás. La caracterización de la semilla de la Región Piura-Perú a través de un análisis proximal realizada en el Laboratorio USAQ de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú, dio como resultado lo mostrado en la Tabla 1.

TABLA 1
ANÁLISIS PROXIMAL DE LA SEMILLA *JATROPHA CURCASCAS*

ANÁLISIS	RESULTADOS
Proteínas	19,30%
Carbohidratos	2,14%
Aceites y Grasas	42,53%
Humedad	7,36%
Cenizas	3,37%
Cáscaras	25,30%
	100,00%

Métodos: Humedad: AOAC 930.04, Determinac. Gravimétrica: USAQ-ME-A9, Fibras en Plantas: AOAC 930.10, Cenizas: AOAC 942.05, Proteínas: APHA 4500-Norg B

La "torta" es rica en proteínas y por tanto se configura como un potencial recurso para elaborar alimentos. Sin embargo su uso como fuente de proteínas para animales y humanos se limita sustancialmente por la presencia de compuestos tóxicos y antinutricionales tales como los ésteres de forbol, EF's. Los EF's promueven la formación de tumores, apoptosis y una diversidad de efectos biológicos negativos y a concentraciones excepcionalmente bajas, de allí la importancia de determinar su contenido a fin de evaluar su potencial como alimento (Rakshit K. *et al.* 2010).

II. ANTECEDENTES

Los compuestos tóxicos en la semilla de *Jatropha Curcas* pueden ser variados como por ejemplo saponinas, lecitinas (curcina), filatos, inhibidores de la proteasa, ácido curcalonic, y EF's. Estudios realizados con el fin de separar los EF's en las cepas tóxicas y no tóxicas de *Jatropha Curcas* han determinado que los EF's son los compuestos de mayor interés (Wink *et al.*, 1997).

Se entiende que los EF's se encuentran básicamente en el aceite y que precisamente las trazas de aceite que quedan en la "torta" son las que contienen los EF's que la contaminan. Los EF's son diterpenoides tetracíclicos conocidos en general por su actividad promotora de tumores. Imitan la acción del diacil glicerol (DGA), activador de la proteína quinasa C, la cual regula las diferentes vías de transducción de señales y otras actividades metabólicas de las células (Gunjan Goel *et al.* 2007). Se producen naturalmente en muchas plantas de la familia Euphorbiaceae (donde pertenece la *Jatropha Curcas*) y Thymelaeaceae.

Ludy C. Pabón (2012), describe que los principales componentes proteicos de la torta desgrasada de *Jatropha Curcas* son: esterasa JEA, JEB, lipasa JL, curcina, así como el efecto en esta proteína debido al proceso de extracción del componente tóxico (éster de forbol), Betty (2014) indicó que una muestra de torta desgrasada a partir de la semilla de *Jatropha Curcas* de Brasil contiene alrededor de 12 g de éster de forbol/Kg torta seca.

Bermejo *et al.*, determina; en una investigación realizada en México y utilizando el método de Soxhlet (AOAC 1997), la existencia de Ésteres de Forbol en las plantas de *Jatropha Curcas* proveniente de Sinaloa y Puebla pero no así en las de Morolejos. Los resultados del HPLC arrojaron que en Puebla, la cantidad de esteres de forbol está entre 0.018-0.035 g/g y en Sinaloa 0.132mg / g y en Morolejos no había.

Los EF's de origen natural son inestables y susceptibles a la oxidación, a la hidrólisis, transesterificación, y a la epimerización durante los procedimientos de aislamiento (Haas *et al.*, 2002). El método más sencillo y económico para

Digital Object Identifier: (to be inserted by LACCEI).
ISSN, ISBN: (to be inserted by LACCEI).

la reducción de EF's es por degradación bioquímica durante el proceso de compostaje aeróbico. Un estudio realizado por Devappa demostró que la toxicidad de la torta de semillas expuesta al aire disminuye a niveles insignificantes después de 30 días en todos los experimentos (2010)

Otros métodos para la desintoxicación consideran tratamientos térmicos con temperaturas de 121 °C aunque se corre el riesgo de degradar al contenido proteico. Los EF's son termoestables y pueden resistir temperaturas de 160° hasta por 30 minutos (Rakshit et al 2008). De igual manera se ha logrado reducir sustancialmente el contenido de EF's en procesos de extracción utilizando metanol, etanol e hipoclorito de sodio/soda cáustica o bicarbonato de sodio por encima de los 90%. El inconveniente es que pueden quedar contaminantes químicos en el producto proteico y generar efluentes contaminantes. (Aregheore et al. 2003, Martínez et al. 2006)

La patente Europea EP 2 397 240 B1 del 21.05.2014 refiere a la descomposición de EF's por fermentación de un material orgánico que contiene EF's utilizando la bacteria *Bacillus subtilis* var. Natto. Esta bacteria se encuentra en el suelo y en el tracto gastrointestinal de rumiantes y humanos. El proceso no requiere de solventes orgánicos y no genera efluentes contaminantes y puede descomponer totalmente los EF's. Chusnul Hidayat y otros, mencionan un procedimiento de degradación enzimática de los EF's utilizando Lipasa proveniente de salvado en la torta de semilla de arroz, reportando una reducción del contenido de EF's hasta del 99.35%.

El contenido de EF's en las semillas de *Jatropha Curcas* varía según la variedad y procedencia de la planta. Éstos se determinan cualitativamente mediante la cromatografía en capa fina, (que no pudo realizarse por la escasa muestra patrón disponible) y cuantitativamente mediante la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para tal efecto se utiliza una sustancia patrón tal como (PMA) forbol - 12 miristato - 13 acetato, Makkar (1998), Betty (2004), J. Martínez-Herrera (2006).

El equipo de investigación viene desarrollando un proyecto para la obtención de aceite a partir de semilla de *Jatropha Curcas* proveniente del distrito de Morropón, capital de la Provincia de Morropón en la Región Piura, Perú que se encuentra a 80 kilómetros de la ciudad de Piura. En el esquema global el proyecto considera la utilización de la cáscara de la semilla de *Jatropha Curcas* para la elaboración de Biogás y la "torta" producto de la extracción del aceite como una potencial fuente de alimentos. Por lo que se hace necesario determinar su nivel de toxicidad, centrándonos en el elemento principal, el contenido de EF's.

III. PARTE EXPERIMENTAL

A. Marcha Fitoquímica

Previamente se realizó una marcha fitoquímica del extracto de las semillas de *Jatropha Curcas* según método de Marcha Fitoquímica (Rondina & Coussio, 1969). Los resultados se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2
MARCHA FITOQUÍMICA M DE LA SEMILLA *JATROPHA CURCAS*

ANÁLISIS	RESULTADOS	MÉTODO DE REFERENCIA
Aminogrupos primarios y secundarios	Prueba positiva	Prueba de Ninhidrina
Grupos Fenólicos libres	Prueba negativa	Pruebas de reactivo férrico
Taninos	Prueba positiva	Prueba de la gelatina
Flavonoides	Prueba negativa	Reacción de Shinoda
Triterpenoides y esteroides	Prueba positiva	Reacción de Liebermann-Buchard
Naftaquinonas y antraquinonas, antronas y antranoles	Prueba negativa	Reacción de Bomträger
Alcaloides	Prueba positiva	Test de Dragendorff y Mayer
Leucoantocianidinas y catequinas	Prueba negativa	Reacción de Rosenbeim
Saponinas	Prueba negativa	Prueba de la espuma

El análisis se llevó a cabo en el Laboratorio LABICER (Laboratorio N° 12) de la UNI, a 22°C y 61% de humedad relativa.

B. Análisis cromatográfico HPLC -I

Se utilizó el método de análisis de Cromatografía líquida de alto rendimiento por parte del Laboratorio LABICER de la Facultad de Ciencias de la UNI. Para tal efecto se adquirió un Ester de Forbol patrón considerando el más abundante indicada por la bibliografía.

1) Método utilizado

Cromatografía líquida de alto rendimiento tomando como Referencia [14].

2) Los equipos utilizados fueron:

- Cromatógrafo Líquido de alto rendimiento-HPLC SHIMADZU.
- Desgasificador DGU-20A5R
- Automuestreador: SIL-30AC
- Horno de columna: CTO-20AC
- Detector de Arreglo de diodos: SPD-M30A
- Control de Sistema: CBM-20^a
- Balanza Analítica Digital: Sartorius CPA225D
- Equipo de Ultrasonido: WISD Laboratory Instruments
- Equipo de Agua Ultra Pura, ELGA PURELAB CLASSIC UV.

Digital Object Identifier: (to be inserted by LACCEI).

ISSN, ISBN: (to be inserted by LACCEI).

- 3) *Los Reactivos* que se utilizaron en todas las pruebas fueron:
- Estándar Forbol 12–Miristato 13–Acetato, 99% adquirido de SIGMA ALDRICH.
 - Acetonitrilo, gradiente 240nm/far UV HPLC grade, adquirido de MERCK PERUANA
 - Ácido fosfórico (85%) P.A., adquirido de MERCK PERUANA
 - Agua Ultra Pura de equipo ELGA PURELAB CLASSIC UV
 - Metanol, gradiente HPLC grade adquirido de MERCK PERUANA.

4) *Datos del Estándar*

- Nombre del Producto: FORBOL 12-MIRISTATO 13- ACETATO, FMA.
- Número del Producto: P8 139
- Número de Lote: MKBX7276V
- Marca: SIGMA
- Pureza: > 99 %
- Contenido: 5 mg.

5) *Condiciones cromatográficas.*, se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3
CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS DE LAS PRUEBAS

Columna	RP C18 de 250 mm x 4.6 mm ID x 5 µm Partícula (Restek)
Horno de columna	40°C
Detector	Arreglo de Diodos
Longitud de onda	234 nm
Bomba	Cuaternaria
Flujo	1.5 mL/min
Fase móvil	A: CH3CN B: H3PO4 al 0.175%
Volumen de Inyección	20 µL
Tiempo de corrida	40 minutos
Integración	Área vs Concentración
Límite de detección, L.D.D.	0.586 mg/L

6) *Soluciones estándar*

Se preparó una solución STOCK de 100 ppm de FMA en Acetonitrilo: Acido. Fosfórico 0.175% (63:37). Luego se prepararon las siguientes soluciones estándar de FMA: 2.5, 5.0, 10, 20 ppm en metanol a partir de la solución STOCK.

7) *Muestras seleccionadas*

Para el análisis se tomaron muestras de materiales que se presentan en las diversas etapas del proceso de extracción de aceite de la semilla de *Jatropha Curcas*.

Estas muestras se indican en la Tabla 4 y corresponden a diversos lotes.

TABLA 4
MUESTRAS DE PRODUCTOS DE SEMILLA DE
JATROPHA CURCAS

MUESTRA	DESCRIPCIÓN
M1	Semilla pretratada molida. Proveniente de MC10 y MC13 producto de hidrólisis (blanco)
M2	Aceite de la 5ta Extracción por solventes. Proveniente de la molienda M12
M3	Torta desengrasada de la 4ta extracción por solventes
M4	Semilla pretratada molida bajo la malla Tyler 30
M5	Semilla molida original
M6	Almendra seca

8) *Procedimiento*

Las muestras M1, M3 y M4 fueron secadas previamente a 40°C, posteriormente se pesó entre 2-3 gramos de muestra seca. M3 y M4 fueron fortificadas con 600 uL de la solución STOCK de 100 ppm. Se dejó secar por el periodo de 1 hora a 40°C. La muestra M2 fue fortificada con 400 uL de la solución STOCK de 100 ppm y se dejó homogenizar por 1 hora.

Posteriormente en todas las muestras (M1, M2, M3, M4, M5 y M6) se llevó a cabo el procedimiento de extracción con 5 mL de metanol en el equipo de ultrasonido por 30 minutos. Este procedimiento se repitió tres veces, recolectando en un tubo de centrifuga la fase metanólica de cada extracción.

Finalmente se centrifugó y se recuperó el sobrenadante. El sobrenadante recuperado se concentró hasta obtener un residuo aceitoso. El residuo aceitoso fue redisoluto en metanol a un volumen final de 2 mL en las muestras M1, M2, M3 y M4; y en las muestras M5 y M6 se llevó a un volumen final de 5 mL. Antes de ser inyectados en el equipo de HPLC fueron filtrados en filtros de jeringa de 0.45 µm.

9) *Resultados de Análisis cromatográfico HPLC*

La Tabla 5 muestra los resultados del análisis de las muestras M1, M2, M3, M4, M5 y M6 obtenidos de acuerdo al procedimiento mencionado.

TABLA 5
RESULTADO DEL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE MUESTRAS
DE PRODUCTOS DE LA SEMILLA DE *JATROPHA CURCAS*

MUESTRA		TIEMPO DE RETENCIÓN Minutos	CONTENIDO DE FMA mg/L < ppm
M1	Inyección 1	No se detectó el pico del estándar	<L.D.D.
	Inyección 2	No se detectó el pico del estándar	<L.D.D.
M2	Inyección 1	No se detectó el pico del estándar	<L.D.D.
	Inyección 2	No se detectó el pico del estándar	<L.D.D.
M3	Inyección 1	No se detectó el pico del estándar	<L.D.D.
	Inyección 2	No se detectó el pico del estándar	<L.D.D.
M4	Inyección 1	No se detectó el pico del estándar	<L.D.D.
	Inyección 2	No se detectó el pico del estándar	<L.D.D.
M5	Inyección 1	No se detectó el pico del estándar	<L.D.D.
	Inyección 2	No se detectó el pico del estándar	<L.D.D.
M6	Inyección 1	No se detectó el pico del estándar	<L.D.D.
	Inyección 2	No se detectó el pico del estándar	<L.D.D.

La Tabla 6 muestra los resultados del análisis de la muestra M2 que fuera fortificada con La solución estándar FMA de 100 ppm.

La Fig. 3 muestra el cromatograma del estándar FMA Inyección1 -10 ppm,

TABLA 6
DATOS CROMATOGRÁFICOS DEL FMA EN MUESTRA M2

Inyección N°	Tiempo de Retención Minutos	Área	Altura	Concentración HPLC, mg/L	Concentración agregada del estándar, mg/L
M2 fortificada M2 inyección 1	23.787	82844	2741	20.14	20
M2 fortificada M2 inyección 2	23.767	81132	2624	19.72	20
Promedio	23.777	82008	2682.5	19.93	20
Desviación Estándar	0.014	1238.85	82.73	0.2969	0

La Fig. 4, muestra el cromatograma de la Muestra M2 fortificada con el Estándar de FMA Inyección 1.

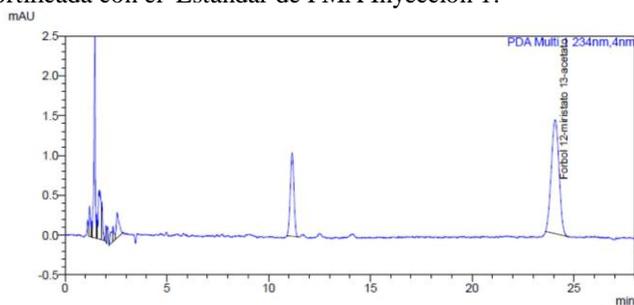


Fig. 3 Cromatograma del Estándar de FMA Inyección 1- 10 ppm

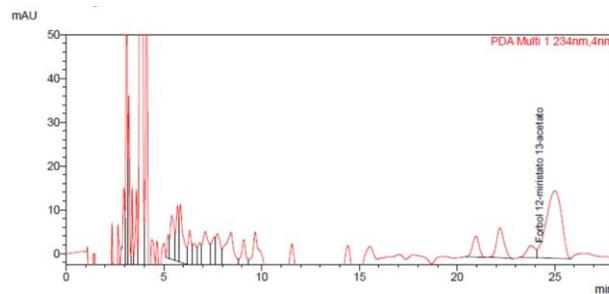


Fig. 4 Cromatograma de la Muestra M2 fortificada con el Estándar de FMA Inyección 1

C. Análisis cromatográfico HPLC -2

Se repiten las condiciones de la mencionada en ítem B con el fin de confirmar los resultados y se consideran las muestras indicadas en la Tabla 7. Todas las muestras provienen de un solo tipo de semilla, las que se obtienen en diversas etapas en el proceso de extracción de aceite.

Los resultados se repiten como en el caso de los resultados del ítem B. No se detectó el pico del estándar en ninguna de las muestras analizadas.

TABLA 7
MUESTRAS DE PRODUCTOS DE SEMILLA DE
JATROPHA CURCAS

MUESTRA	DESCRIPCIÓN
M7	Semilla original
M8	Almendra de la semilla original
M9	Semilla Pretratada en reactor fr 20 L
M10	Semilla Pretratada secada al ambiente por una semana
M11	Semilla Pretratada molida, Malla Tyler 50
M12	Semilla Pretratada molida, Malla Tyler 30
M13	Proteína proveniente de la Extracción de aceite de la hidrólisis ácida

De igual manera se hicieron pruebas de fortificación con el fin de detectar cantidades mínimas por debajo del rango del equipo. Se obtuvieron los mismos resultados que la prueba del ítem B.

La Tabla 8 muestra los resultados del análisis de la muestra M2 que fuera fortificada con la solución estándar FMA.

TABLA 8
DATOS CROMATOGRÁFICOS DEL FMA EN MUESTRA M13

Inyección N°	Tiempo de Retención Minutos	Área	Altura	Concentración HPLC, mg/L	Concentración agregada del estándar, mg/L
M13 fortificada M13 inyección 1	21.722	17044	604	4.233	4.974
M13 fortificada M13 inyección 2	21.700	17091	607	4.243	4.841
Promedio	21.711	17067.5	605.5	4.238	4.908
Desviación Estándar				0.007	0.094

IV. OBSERVACIONES Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A. Marcha Fitoquímica

De acuerdo a los resultados de la marcha fitoquímica, la muestra contiene los siguientes componentes: aminogrupos primarios y secundarios con probable existencia de proteasas.

Contiene además Triterpenoides y esteroides. Contiene determinado grupo de hormonas, los cuales podrán ser aislados en medio de n-hexano

La muestra dio pruebas positiva de Alcaloides, evidenciando una posible existencia de variedades de EF's.

La muestra dio prueba positiva de Taninos, que existen en todo tipo de plantas.

B. Análisis cromatográfico HPLC

La Tabla 5 muestra que en ninguna de las muestras analizadas se ha detectado la presencia de FMA hasta el Límite de Detección, LDD del equipo que es de 0.586 mg/L o 0.586 ppm.

Lo anterior puede implicar que el contenido de EF's de la muestra podría estar por debajo del LDD o que la semilla no contenga el tipo de FMA patrón.

A fin de evaluar la primera hipótesis se fortificó la muestra M2 con el FMA estándar. La Tabla 6 indica que la cantidad de EF's en M2 no es mayor a la cantidad de FMA agregado para su fortificación. Se repitió lo mismo con las muestras M7 al M13 dando resultados similares como se muestra en la Tabla 7. Se elimina la primera hipótesis.

Al comparar los cromatogramas del FMA patrón con el de la muestra fortificada, Fig. 3 y Fig. 4, se aprecia en la última picos cercanos al pico correspondiente al del patrón, que podría significar la presencia de otro tipo de EF's.

En la Prueba del ítem C, se realizó el análisis completo de un solo tipo de semilla y sus productos que se generan

en el proceso de extracción de aceite. En este caso se fortificaron todas las muestras con el patrón de FMA, obteniéndose los mismos resultados que las pruebas del ítem B.

IV. CONCLUSIONES

La marcha fitoquímica a la semilla de *Jatropha Curcas* de la Región Piura-Perú dio prueba positiva de Alcaloides lo que evidencia posible presencia de EF's.

Los análisis utilizando el Método de Cromatografía líquida de alto rendimiento, HPLC, no muestran presencia de FMA en la semilla de *Jatropha Curcas* de la Región Piura-Perú. Aun cuando las muestras fueron fortificadas con FMA para salvar el Límite de Detección del equipo de análisis.

RECONOCIMIENTO

El equipo de investigación agradece el apoyo administrativo financiero de parte Vicerrectorado de Investigación y del Instituto General de Investigación de la UNI.

Agradece a las autoridades de la Facultad de Ingeniería Química y Textil, por el uso de las instalaciones y laboratorios para el logro de los objetivos de la investigación

Agradece asimismo el soporte técnico del LABICER, Laboratorio N° 12 de la Facultad de Ciencia de la UNI.

REFERENCIAS

- [1] Bermejo, M. E.Chel, L. A.; Dra. Silvia Evangelista Lozano; Ing. José Guadalupe Félix; Martínez, A.L "Cuantificación de ésteres de forbol en semillas de *Jatropha Curcas* l. silvestres y cultivadas en México" Sincelejo-Barranquilla: Universidad de Sucre-Universidad del Atlántico.
- [2] Betty Jarma Aroyo, Yenis Vanegas O., Marcelo Francisco Pompelli, Carlos Garrido P, Egídio Benzerra Neto, Alfredo Jarma Orozco, "Detoxification of *Jatropha curcas* L. seed meal as posible alternative live stock feed in the Colombian Caribbean", Rev. U.D.C.A. Act & Div. Cient. 17 (1), Enero- Junio 2014; 171-178.
- [3] Chusnul Hidayat, Pudji Hastuti, Avita Kusuma Wardhani, and Lana Santika Nadia. "Method of phorbol ester degradation in *Jatropha Curcas* L. seed cake using rice bran lipase" Journal of Bioscience and Bioengineering VOL. 117 No. 3, 372e374, 2014
- [4] Gunjan Goel, Harinder P. S. Makkar, George Francis, and Klaus Becker. "Phorbol Esters: Structure, Biological Activity, and Toxicity in Animals", International Journal of Toxicology, 26:279-288, 2007.
- [5] J. Martínez-Herrera, P. Siddhuraju, G. Francis, G. Dávila-Ortiz, K. Becker (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. Volume 96, Pages 80-89.
- [6] Jarma Arroyo, Betty et al. "Desintoxicación de la torta de *Jatropha Curcas* L., como posible alternativa de alimento para ganado bovino en el caribe colombiano". Rev.udcaactual.divulg.cient., Jun 2014, vol.17, no.1, p.171-178. ISSN 0123-4226
- [7] Kumar V, Makkar HPS, Becker K (2011) "Detoxified *Jatropha curcas* kernel meal as a dietary protein source: growth performance, nutrient

Digital Object Identifier: (to be inserted by LACCEI).

ISSN, ISBN: (to be inserted by LACCEI).

- utilization and digestive enzymes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings". *Aquacult Nutr* 17:313– 326.
- [8] Lestari D, Wim JM, Johan PMS (2011) "Jatropha seed protein functional properties for technical applications". *Biochem Eng J* 53:297–304.
- [9] Ludy C. Pabón, Patricia Hernández Rodríguez. "Importancia química de *Jatropha Curcas* y sus aplicaciones biológicas, farmacológicas e industriales". Universidad de La Salle, Colombia.
- [10] Makkar HPS, Aderibigbe AO, Becker K (1998) "Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors". *Food Chem* 62:207–215.
- [11] M. C. Rafael Jiménez Ocampo, Dr. Jorge Alberto Rodríguez González, M. C. Luz Adriana Ruíz Flores, Dr. Juan Carlos Mateos Díaz, Dr. Rigoberto Rosales Serna, "Detoxificación de pastas de higuierilla y jatropha", Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Progreso 5, Barrio de Santa Catarina, Delegación Coyoacán, C. P. 04010, México, D. F., Folleto Técnico Núm. 71, ISBN: 978 -607 -37-0207-2. Primera Edición 2013
- [12] María Ester Cariello, Liliana Castañeda, Inés Riobo; Jimena González, R.C.Suelo, "Inoculante de microorganismos endógenos para acelerar el proceso compostaje de residuos sólidos urbanos" *Nutr. Veg.* 7 (3) 2007 (26-37) *J. Soil Sc. Plant Nutr.* 7 (3) 2007 (26-37)
- [13] Rakshit K. Devappa, H.P.S. Makkar, K. Becker, "Optimization of conditions for the extraction of phorbol esters from *Jatropha* oil". *Biomass and Bioenergy* Volume 34, Issue 8, August 2010, Pages 1125-1133.
- [14] Rakshit K. Devappa, et al. "High performance liquid chromatography method for rapid quantification of phorbol esters in *Jatropha curcas* seed". *Industrial Crops and Products* 49 (2013) 211–219.
- [15] Runumi Gogoi, Utpal Kumar Niyogi, Ajay Kumar Tyagi., "Reduction of phorbol ester content in jatropha cake using high energy gamma radiation" "Reducción del contenido de éster de forbol en la torta *Jatropha* utilizando radiación gamma de alta energía", *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, Volume 7, Issue 3, Pág 305–309, July 2014,
- [16] Srinivasan Nithiyantham, Perumal Siddhuraju, George Francis, "Potential of *Jatropha curcas* as a Biofuel, Animal Feed and Health Products". *J Am Oil Chem Soc*, vol 89, 961–972.
- [17] Vyas DK, Singh RN (2007) "Feasibility study of *Jatropha* seed husk as an open core gasifier feedstock". *Renew Energy* 32:512–51.