



Universidad Autónoma De Querétaro

Facultad de Química

Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“COMPOSICIÓN QUÍMICA DE JATROFA (*Jatropha curcas*) TÓXICA, NO TÓXICA
Y DETOXIFICADA, Y EFECTO DE SU CONSUMO SOBRE PARÁMETROS
NUTRICIONALES Y TÓXICOS EN POLLOS”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencia Y Tecnología de Alimentos

Presenta:

IBQ. Ana Lilia Ortiz Calderón

Dirigido por:

Dr. Salvador Horacio Guzmán Maldonado

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

Noviembre 2012

México



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE JATROFA (*Jatropha curcas*) TÓXICA, NO TÓXICA Y
DETOXIFICADA, Y EFECTO DE SU CONSUMO SOBRE PARÁMETROS
NUTRICIONALES Y TÓXICOS EN POLLOS.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

IBQ. Ana Lilia Ortiz Calderón

Dirigido por:

Dr. Salvador Horacio Guzmán Maldonado

SINODALES

Dr. S. Horacio Guzmán Maldonado
Presidente

Dr. Teódulo Quezada Tristán
Secretario

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Vocal

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Suplente

Dr. Eduardo Tostado Castaño
Suplente

MSP. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

RESUMEN

La semilla de jatrofa (*Jatropha curcas*) posee un alto contenido de proteína (24 a 30%), sin embargo, su utilización es limitada debido a la presencia de compuestos tóxicos (ésteres de forbol). En México se ha reportado un ecotipo no tóxico el cual contiene sólo trazas de ésteres de forbol. El objetivo de este trabajo fue evaluar dos métodos de detoxificación de jatrofa tóxica y caracterizar los ecotipos tóxico, no tóxico y detoxificada en su composición proximal, antinutricional, contenido de compuestos tóxicos y composición fenólica, además de evaluar el efecto residual tóxico en pollos de engorda. Se utilizaron dos semillas de jatrofa una proveniente de Puebla (no tóxica) y otra de Chiapas (tóxica). La de Puebla mostró niveles bajos de ésteres de forbol (0.11 mg/g) en comparación con la de Chiapas (1.74 mg/g), mientras que la jatrofa detoxificada en la cual el porcentaje de eliminación de ésteres de forbol fue del 91%, presentó un contenido 0.164 mg/g. La semilla no tóxica presentó un mayor contenido de proteína, sin embargo, su digestibilidad *in vitro* fue menor. El contenido de ácido fítico fue similar para ambas semillas, no así los inhibidores de tripsina teniendo la semilla tóxica 25 ITmg/g y 21 ITmg/g la no tóxica. La semilla tóxica presentó una mayor capacidad antioxidante (10.5 mgET/100g) que la no tóxica (9.2 mgET/100g), mientras que los fenoles totales y taninos no presentaron diferencias. Las unidades experimentales de los tratamientos con jatrofa tóxica murieron aceleradamente (desde el día 2 al 15), mientras que las de los tratamientos con jatrofa detoxificada sobrevivieron hasta el día 30. Por otro lado, el tratamiento suplementado con jatrofa no tóxica no presentó diferencias estadísticas con el control, la cual podría ser considerada para alimentación animal. Los niveles de enzimas ALT y AST de los tratamientos con jatrofa tóxica y detoxificada fueron muy altos evidenciando el daño hepático. En base a los resultados obtenidos, la jatrofa tóxica después del proceso de detoxificación no es apta para alimentación animal debido a que el residuo de ésteres de forbol es altamente dañino.

(Palabras Clave: Jatrofa, tóxicos, antinutricionales, pollos de engorda.)

SUMMARY

Jatropha curcas seed has a high content of protein (24-30%); however, its use is limited due to the presence of toxic compounds (phorbol ester). Mexico has reported a nontoxic ecotype which contains only traces of phorbol esters. The aim of this study was to evaluate two methods of detoxification of toxic *Jatropha* and characterize the toxic, non-toxic and detoxified ecotype in its proximate composition, anti nutritional content of toxic compounds and phenolic composition. In addition to evaluating the residual toxic effect in broilers. Two seeds were used, one from Puebla (non toxic) and one from Chiapas (toxic), the Puebla seed showed very low levels of phorbol esters (0.11 mg / g) compared with that of the Chiapas seed (1.74 mg / g), while the detoxified *Jatropha* in which the percentage removal of phorbol esters was 91%, showed a content of 0.164 mg / g. Proximate analysis showed that the non-toxic seed had a higher protein content. However, *in vitro* digestibility was lower. The phytic acid content was similar for both seeds, but not trypsin inhibitors the toxic seed had 25/21 ITmg g / g non-toxic seed. The toxic seed had a higher antioxidant capacity (10.5 mgET/100g) than the non-toxic (9.2 mgET/100g), while total phenols and tannins were not significantly different. The experimental units treated with toxic *Jatropha* died rapidly (from day 2 to 15), while the treatments with detoxified *Jatropha* survived until day 30. On the other hand, the treatment supplemented with nontoxic *Jatropha* did not present statistical differences with the control, which could be considered for animal feed. Enzyme levels of ALT and AST in treatments with toxic and detoxified *Jatropha* showed very high liver damage. The toxic *Jatropha* after the detoxification process is not suitable for animal feed because the phorbol ester residue is highly damaging.

(Keywords: *Jatropha*, toxic, antinutritional broilers.)

DEDICATORIAS

A mi madre que siempre me ha apoyado en toda y cada una de mis decisiones, por estar siempre cuando más lo he necesitado y sobre todo por creer en mí. Te amo mamá.

A mi papá, sé que me cuidas desde el cielo y también que seguramente estas orgulloso por esté nuevo logro, siempre te llevó en mi corazón.

A mis hermanas (María, Rosa y Martha) por su apoyo y comprensión, por aguantar durante esta etapa mis malos ratos y compartir conmigo los buenos. Las quiero mucho.

A ti David Hernández mi amigo y guía, por siempre estar ahí para alentarme y apoyarme, por tu confianza. Porque siempre has creído que puedo y has colaborado para que pueda cumplir esta meta con éxito.

A Dios por permitirme concluir esta etapa, por todas las personas que has puesto en mi camino para que me ayuden y también por los obstáculos, porque gracias a ellos he aprendido mucho.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por contribuir con la beca que me permitió realizar mis estudios de posgrado.

Al Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República (PROPAC) por la oportunidad de formar parte de él y realizar mis estudios de maestría.

Al Dr. Horacio Guzmán Maldonado por brindarme la oportunidad de formar parte de su laboratorio, por su confianza y por todo su apoyo para la realización de este trabajo.

Al Dr. Teódulo Quezada Tristán por el apoyo y sus múltiples consejos, por recibirme y permitirme realizar gran parte de este trabajo en sus instalaciones.

A la Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca por permitirme trabajar en su laboratorio, por su asesoramiento y apoyo, además por sus observaciones para el mejoramiento de este trabajo.

A la Dra. Rosalía Reynoso Camacho y el Dr. Eduardo Tostado Castaño por sus observaciones para la realización y mejora de éste proyecto.

A Lupita Herrera por tu gran colaboración en este proyecto, por tu ayuda y soporte técnico, por todos esos consejos para la mejora de mi trabajo, pero sobre todo por brindarme tu amistad y por creer en mí. Muchísimas gracias por todo.

Al Dr. Gerardo Segura por su colaboración en el proyecto, por asesorarme y ayudarme, por tomarse el tiempo de ir hasta La Posta aun estando de vacaciones pero sobre todo por la disponibilidad que siempre me mostro gracias.

A mis amigas Raquel y Vicky por apoyarme y ayudarme, por compartir conmigo todos y cada uno de los momentos que pase en Querétaro sin importar si fueron buenos o malos siempre estuvieron ahí junto a mí, muchas gracias las quiero mucho. A Consuelo porque aunque fue poco el tiempo que compartimos fue muy agradable pelear contigo y reír también, eres una persona admirable. A ti Marco porque siempre me ayudaste con todos esos trámites administrativos, pero lo más importante gracias por brindarme tu amistad, te quiero ñoño.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Ise, Chivis, Andy y Fer por hacer mi estancia en Inifap mucho más agradable, por desvelarse conmigo cuando fue necesario y por todos esos momentos que vivimos dentro y fuera del laboratorio, gracias por formar parte de mi vida, los quiero INIS.

A mis amigos Médicos Veterinarios por su gran ayuda durante mi estancia en La Posta, por hacer más ameno todos esos días de arduo trabajo Luis, Ana, Adolfo, Memo, Paco, Gera y Brian. Muchas gracias.

A mis amigos Lore, Memo. Faby, Timmy, Adri, Picus, Chino, Bolens, Adrián, Dianita, Jonitas, Gaby por el apoyo, motivación y sobre todo por brindarme su amistad incondicional, porque sé que siempre están y estarán ahí para mí.

A mis amigos Acambarenses Mary, Chen y Agustín por recibirme siempre con una sonrisa y darme aliento para seguir adelante.

Y por ultimo pero no menos importante gracias a ti Mane por escucharme siempre aún y cuando no entendías mucho de lo que te platicaba, siempre estuviste ahí para brindarme tu amistad, consuelo y apoyo. Te quiero mucho.

ÍNDICE

	Página
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
ÍNDICE	vi
Índice de cuadros	ix
Índice de figuras	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 <i>Jatropha curcas</i> y su cultivo	3
2.2 Antinutrientes	6
2.2.1 Ácido fítico	7
2.2.2 Inhibidores de tripsina	8
2.2.3 Curcina	9
2.3 Compuestos con actividad biológica	10
2.3.1 Fenoles totales	10
2.3.2 Taninos	10
2.4 Compuestos tóxicos	11
2.4.1 Ésteres de forbol	11
2.5 Métodos de detoxificación	13
2.6 Evaluación de efecto tóxico	15
2.6.1 Evaluación de semilla de jatrofa en modelos animales	15
2.6.2 Evaluación de efectos tóxicos en aves	17
III. JUSTIFICACIÓN	19
IV. OBJETIVOS	20
4.1 Objetivo general	20
4.2 Objetivos	20

V. MATERIALES Y METODOS	21
5.1 Materiales	21
5.1.1 Semilla de jatrofa	21
5.2 Estrategia de detoxificación	21
5.3. Métodos	22
5.3.1 Análisis proximal	22
5.3.1.1 Cenizas	22
5.3.1.2 Fibra	22
5.3.1.3 Proteína cruda	23
5.3.1.4 Extracto etéreo	25
5.3.2 Minerales y calidad de proteína	25
5.3.2.1 Minerales	25
5.3.2.2 Digestibilidad de proteína	26
5.3.3 Compuestos antinutricionales	27
5.3.3.1 Acido fítico	27
5.3.3.2 Inhibidores de tripsina	27
5.3.3.3 Curcina	28
5.3.4 Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante	29
5.3.4.1 Fenoles totales	29
5.3.4.2 Taninos	30
5.3.4.3 Compuestos fenólicos simples por HPLC	31
5.3.4.4 Capacidad antioxidante <i>in vitro</i> por el método TEAC.	32
5.3.5 Compuestos tóxicos	33
5.3.5.1 Ésteres de forbol	33
5.3.6 Evaluación toxicológica en pollos	33
5.3.6.1 Pruebas bioquímicas	34
5.3.6.2 Parámetros productivos	35
5.3.6.4 Análisis histopatológico	36
5.4 Diseño experimental y análisis estadístico	37
5.4.1 Estrategia general	37

5.4.2	Diseño de experimento del análisis con pollos	38
5.4.3	Diseño estadístico	40
VI.	RESULTADOS Y DISCUSION	41
6.1	Detoxificación	41
6.2	Composición proximal	43
6.3	Contenido de minerales y digestibilidad de proteína	45
6.4	Contenido de antinutrientes	46
6.5	Composición fenólica y capacidad antioxidante	47
6.6	Compuestos tóxicos	49
6.7	Evaluación nutricional y tóxica de la semilla de jatrofa en pollos engorda	50
6.7.1	Hallazgos clínicos	51
6.7.2	Parámetros bioquímicos	52
6.7.2.1	Proteína total y albumina	52
6.7.2.2	Actividad de enzimas ALT y AST	53
6.7.3	Parámetros productivos	55
6.7.3.1	Peso promedio	55
6.7.3.2	Conversión, ganancia diaria de peso y eficiencia alimentaria	56
6.7.4	Hallazgos a la necropsia	58
6.7.5	Hallazgos de la histopatología	59
VII.	CONCLUSIONES	62
VIII.	REFERENCIAS	64

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Principales factores antinutricionales y sus efectos en modelos animales.	7
2	Métodos de detoxificación.	21
3	Características nutricionales del alimento comercial.	39
4	Contenido de ésteres de forbol en semilla de jatrofa tóxica después de la aplicación del método combinado.	42
5	Contenido de ésteres de forbol en semilla de jatrofa tóxica después de su exposición directa al sol.	43
6	Composición proximal de semilla de jatrofa.	44
7	Contenido de hierro, zinc y digestibilidad de proteína en semillas de jatrofa.	45
8	Contenido de factores antinutricionales en semilla de jatrofa.	46
9	Composición fenólica y capacidad antioxidante en semilla de jatrofa.	47
10	Contenido de compuestos fenólicos simples (mg/100g) en semilla de jatrofa.	48
11	Contenido de ésteres de forbol en semilla de jatrofa.	49
12	Contenido de proteína total y albúmina en suero sanguíneo de pollos sacrificados después de dos semanas de tratamiento.	52
13	Contenido de proteína total y albúmina en suero sanguíneo de pollos sacrificados después dos y seis semanas de tratamiento.	53
14	Actividad enzimática de ALT y AST en suero sanguíneo de pollos sacrificados después de dos semanas de tratamiento.	54
15	Actividad enzimática de ALT y AST en suero sanguíneo de pollos sacrificados después de cuatro semanas de tratamiento.	55

16	Actividad enzimática de ALT y AST en suero sanguíneo de pollos sacrificados después de seis semanas de tratamiento.	55
17	Parámetros productivos presentados por pollos alimentados con Los tratamientos control y no tóxico durante el tratamiento.	57
18	Parámetros productivos presentados por pollos de engorda alimentados con el tratamiento tóxico y detoxificado durante dos y cuatro semanas de tratamiento respectivamente.	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Planta de Jatrofa.	4
2	Semilla de jatrofa con y sin testa.	5
3	Estructura de ésteres de forbol presentes en <i>J. curcas</i> .	12
4	Soluciones utilizadas en el procesador automático de tejidos.	36
5	Soluciones utilizadas en la tinción de cortes para histología.	37
6	Estrategia general de trabajo.	38
7	Cromatogramas HPLC de ésteres de forbol en semillas de Jatrofa.	50
8	Representación de síntomas presentados por tratamientos con jatrofa tóxica y detoxificada.	51
9	Peso promedio de pollos de engorda durante las seis semanas de tratamiento.	56
10	Anormalidades presentadas por los tratamientos T ₂ y T ₄ .	59
11	Cortes de hígado de pollos de tratamiento control y tóxico	60
12	Cortes de riñón de pollos de tratamiento control y tóxico.	61

I. INTRODUCCIÓN

Jatropha curcas, especie conocida comúnmente como jatrofa, es un arbusto que ha sido utilizado para el control de erosión de suelos, como cerco, leña, alimento para ganado, y usos medicinales. Existen dos tipos de jatrofa, la tóxica y la no tóxica, la diferencia entre estos dos tipos radica en el contenido de ésteres de forbol (compuestos tóxicos). El cultivo de las especies de jatrofa como fuente de aceite para la producción de biodiesel, a su vez producen una serie de subproductos (Becker y Makkar, 2009). La utilización de los subproductos puede aumentar el valor de la cadena de producción de biodiesel de jatrofa. Sin embargo, la presencia de componentes tóxicos en *Jatropha* ha limitado su utilización para la elaboración de productos a base de esta. No obstante, existe escaso desarrollo tecnológico agroindustrial (manejo del cultivo, cosecha y post-cosecha, procesos industriales) y además la presencia compuestos tóxicos en su semilla hacen que ésta no pueda ser utilizadas con fines alimentarios (Achten y col., 2008).

Se prevé que para el 2017 la jatrofa se estará sembrando en alrededor de 32`720,000 Ha en todo el mundo con una producción de 160 millones de toneladas de semillas. Estas estimaciones permiten calcular que para entonces se estarán produciendo entre 15 y 21 millones de litros de aceite y entre 11 y17 millones de toneladas de torta como subproducto (Devappa y col., 2010).

La torta de jatrofa es un subproducto obtenido de la semilla una vez que se le extrajo el aceite, el cual tiene poco valor comercial debido principalmente a la presencia de compuestos tóxicos (ésteres de forbol y curcina) y a la presencia de compuestos antinutricionales (inhibidores de la tripsina, el ácido fítico y curcina). Sin embargo, se sabe que su contenido y calidad de proteínas es alto (Makkar y col., 1998). Se ha reportado que el contenido de aminoácidos esenciales (excepto lisina) es superior al requerimiento diario definido por la FAO (FAO/WHO, 1991). Ambos tipos de jatrofa, tóxica y no tóxica presentan los factores antinutricionales ya citados.

La toxicidad de los ésteres de forbol limita el uso de torta de jatrofa tóxica como alimento humano o animal ya que se ha reportado que causan la promoción tumoral, proliferación celular, activación de las plaquetas, mitogénesis de linfocitos, eritema de la piel, producción de prostaglandinas y estimulación de la degranulación de los neutrófilos. Por lo tanto, su uso como insumo para la formulación de las dietas en la alimentación está actualmente limitado. Se ha propuesto que si los ésteres de forbol se retiran de la torta de semilla de jatrofa está podría ser utilizada como un ingrediente rico en proteínas en los alimentos o dietas de alimentación. Recientemente se ha sugerido que el etanol e inclusive la exposición directa al sol son más eficaces para la detoxificación de la torta (Martínez y col., 2006).

Dada la importancia actual que ha adquirido el cultivo de la jatrofa para la producción de biocombustible es necesario realizar los análisis para la eliminación de los compuestos tóxicos, disminución de los antinutrientes así como probar en modelos animales para aprovechar de alguna manera la torta de jatrofa como una fuente proteica. Es por ello que en este trabajo se propusieron como objetivos el analizar químicamente las semillas de jatrofa de los dos ecotipos que se cultivan en México, evaluar dos métodos de detoxificación de la semilla tóxica y evaluar el efecto tóxico de la semilla de jatrofa en pollos de engorda incluyendo en su dieta 10% de semilla.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La producción de bioenergéticos a partir de la biomasa provenientes de materia orgánica de diferentes especies es una opción que está siendo explorada como fuente de energía renovable fundamental para el desarrollo y sustento de México. En general, la producción de bioenergéticos conlleva la generación de subproductos los cuales pueden llegar a convertirse en un problema de contaminación. Con el objetivo de evitar lo anterior y otros posibles peligros, en el apartado “Evaluación de los productos y coproductos de la biomasa” elaborado por el Sistema Nacional de Investigación y Transferencia Tecnológica para el desarrollo sustentable (SNITT), se establece que se debe “dar valor agregado a los cultivos y coproductos empleados en bioenergéticos, proponiendo dar un amplio aprovechamiento de coproductos y residuos destinados de la producción de biodiesel, etanol, biogás, alimentación animal y humana, entre otros usos, Incluyendo la detoxificación de estos.”

Con el fin de explorar la producción de bioenergéticos se ha identificado a la familia Euphorbiaceae la cual abarca cerca de 300 géneros y 7,950 especies distribuidas principalmente en las regiones tropicales y templadas (Perveen y Qaiser, 2005). Esta familia agrupa al menos cinco subfamilias: *Phyllanthoideae*, *Oldfieldioideae*, *Acalyphoideae*, *Crotonoideae* y *Euphorbioideae* (Webster 1987). De éstas, la subfamilia Crotonoideae consta de alrededor de 175 especies con ocho especies cultivadas, entre las cuales se encuentra *Jatrofa curcas* L. Algunos nombres comunes de jatrofa en México son "piñón", "piñoncillo", "Achsti", el aceite de piñón ", "piñón mexicano" o simplemente "jatrofa".

2.1 *Jatropha curcas* y su cultivo

Es un arbusto con más de 3500 especies agrupadas en 210 géneros. Originaria de Centroamérica (México), también se han localizado plantas nativas en Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú y Venezuela. Se cultiva en América Central, Sudamérica, Sureste de Asia, India

y África (Cultivos Energéticos, 2007). Es una planta de la familia Euphorbiaceae, crece desde el nivel del mar hasta los 1 000 metros de altitud. El piñón se adapta a sitios de baja fertilidad y suelos alcalinos, pero los mejores rendimientos se obtienen si son fertilizados con pequeñas cantidades de calcio, magnesio y azufre (Coello y Gnecco, 2000). Se caracteriza por ser un cultivo apto para ser implantado en suelos marginales, pobres en nutrientes, bajo condiciones áridas y semiáridas, con pH que oscila entre 6 y 8 (Kumar y Sharma 2008). Esta característica hace que las plantas de jatrofa sean una especie utilizada para recuperación de suelos, teniendo un impacto ambiental positivo desde este punto de vista. En la Figura 1 se muestra la planta de jatrofa, su proceso de floración, fruto y semillas contenidas en éste.

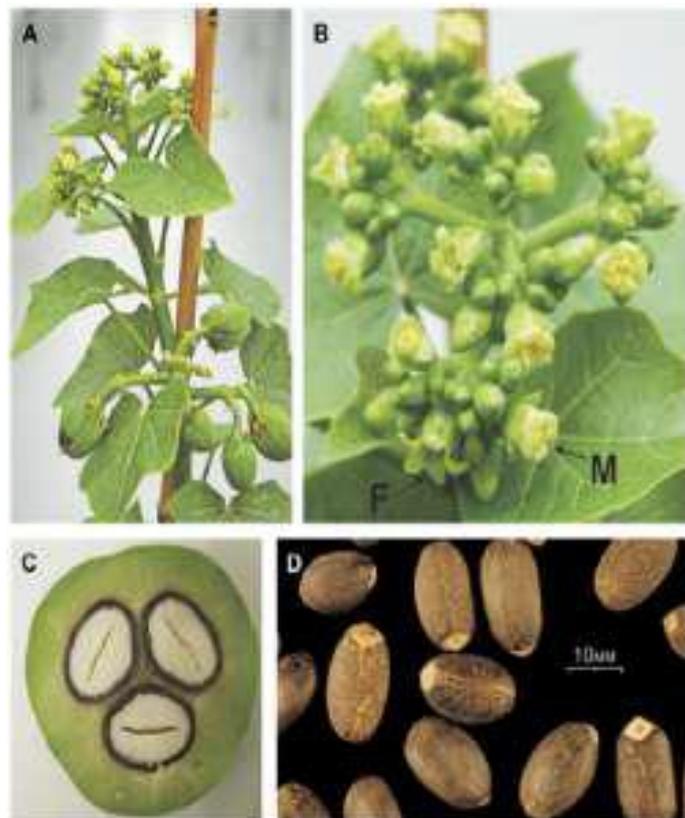


Figura 1. Planta de Jatrofa (King y col. 2009)

A) Planta integra, B) Floración y crecimiento de frutos, C) Fruto, D) Semillas

La tierra utilizada para la siembra de *Jatropha* ha sido la tierra que se encuentran temporalmente sin ningún tipo de uso agrícola o terrenos irregulares y en pendiente, porque las tierras de regadío se utilizan para la

siembra de cultivos básicos como maíz, frijol, caña de azúcar, sorgo y arroz. En algunos lugares de México, jatrofa se ha intercalado con frijol, maní, ají, café, plantas medicinales y aromáticas por los dos primeros años, dando resultados más productivos (Martínez y col. 2010).

Las plantas de jatrofa comienzan produciendo semilla desde el segundo año de plantación, pero en cantidades limitadas. Si se maneja correctamente, la producción es de 4 a 5 kg de semilla por árbol a partir del quinto año y el rendimiento de semilla puede mantenerse durante 40 a 50 años (Kumar y col., 2003). Cada fruto presenta con regularidad tres semillas. Este es triturado para poder extraer la semilla que representa el 63% del peso del mismo, cada semilla tiene una testa la cual es removida para la extracción de aceite y puede llegar a tener 2 cm de longitud (Figura 2).

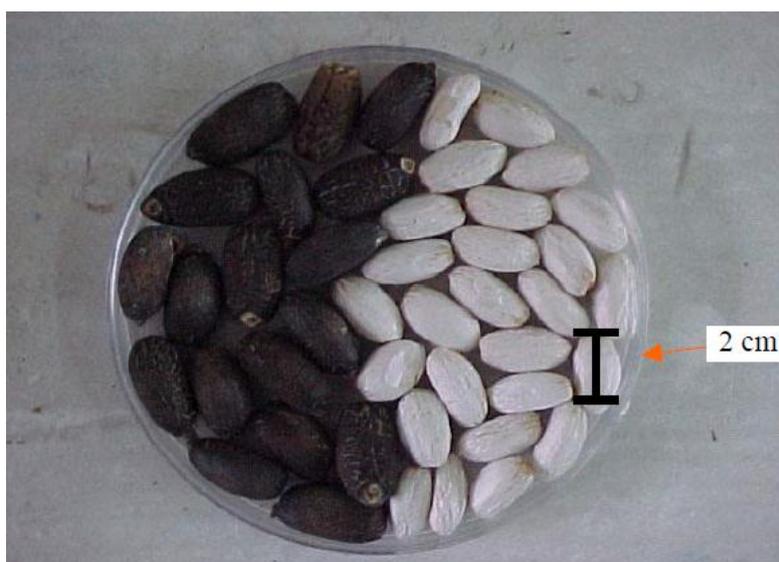


Figura 2. Semilla de jatrofa con y sin testa.

En un kilogramo se pueden encontrar cerca de 1400 unidades de semilla. Posee una testa que representa del 35-40 % del peso, la cual debe ser extraída para optimizar el proceso de extracción de aceite. Todo el contenido de lípidos se encuentra en la semilla, siendo el resto principalmente proteína y carbohidratos (Sirisomboon y col., 2007).

En México se ha encontrado que semillas de los estados de Veracruz, Puebla, Quintana Roo y Yucatán son consumidas después de ser tostadas para la elaboración de platillos tradicionales como pipián, tamales, salsas o consumo directo, por lo cual a este ecotipo se le denomina “no tóxico”. El contenido de proteína y grasa en jatrofa no tóxica es muy similar a las variedades tóxicas, pero posee menor o nula cantidad de ésteres de forbol (<0.11 mg/g) (Makkar y col., 1997) por ello, el estudio de semillas provenientes de estos estados resulta de importancia pues podría ser utilizada como una fuente alternativa de proteína y ácidos grasos para consumo humano y/o animal además del industrial.

Además, los frutos jatrofa se utilizan como abono o para generar biogás. Las semillas del genotipo no tóxicas tienen una ventaja adicional ya que la torta resultante del prensado podría utilizarse como alimento para animales o como alimento humano. Las semillas de jatrofa poseen compuestos tóxicos y antinutricionales. Estos son sintetizados y acumulados como mecanismo de defensa de la planta en forma de fitatos, lecitinas, taninos, inhibidores de tripsina, y ésteres de forbol. Makkar y Becker (1998) informaron que el principio tóxico fundamental en las semillas de *J. curcas*, el aceite y la torta es el diterpeno del esqueleto tigliane, clasificado como ésteres de forbol.

2.2 Antinutrientes

Los antinutrientes se definen como sustancias que, por sí mismas o sus productos metabólicos generados en los sistemas vivos, (1) interfieren con la utilización de los alimentos o piensos; (2) afecta a la salud y la reproducción de los animales y (3) producen la muerte en los niveles de alto consumo (Makkar, 1993). En el cuadro 1 se muestran algunos de los efectos que causan estos compuestos.

Cuadro 1. Principales factores antinutricionales y sus efectos en modelos animales

Factores Antinutricionales	Efecto (<i>in vivo</i>)
Inhibidores de proteasas	<ul style="list-style-type: none"> - Reducción de la actividad enzima digestiva (quimio tripsina) - Hipertrofia pancreática - Digestión disminuida
Acido fítico	<ul style="list-style-type: none"> - Forma complejos con minerales y proteínas - Depresión de la absorción de minerales
Curcina	<ul style="list-style-type: none"> - Daño en las paredes intestinales - Reacciones inmunológicas - Deterioro de la absorción de nutrientes - Incremento de la síntesis de proteína por mucosa - Metabolismo tóxico

Fuente: De Lange y col., 2000.

Un elevado contenido de antinutrientes están presentes en las semillas de *J. curcas*, las sustancias antinutricionales que se presentan a continuación han sido estudiadas en la harina de dichas semillas.

2.2.1 Ácido fítico

El ácido fítico (conocido como inositol hexakisfosfato [IP 6], cuando el fitato esta en forma de sal) por su parte, es la principal forma de almacenamiento de fósforo en las semillas de la mayoría de las plantas. El fósforo en forma de fitato es, en general, no biodisponible para los animales no rumiantes ya que estos carecen de la enzima digestiva fitasa que se requiere para separar el fósforo de la molécula de fitato. Cuando estas moléculas se consumen junto con su dieta, los fitatos se unen con cationes di y trivalentes tales como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{3+} y Fe^{3+} para formar complejos insolubles, estos compuestos reducen la biodisponibilidad de los minerales esenciales y

pueden aumentar la absorción de otros minerales tóxicos (Moll y Moll, 2006). Los fitatos además de acomplejar iones, interactúan de forma inespecífica con proteínas y carbohidratos como el almidón. Esta unión altera la solubilidad, funcionalidad, digestión y absorción de estos componentes de los alimentos; por otro lado, el ácido fítico puede interactuar con las enzimas digestivas, inhibiendo su función.

La semilla de *Jatropha curcas* de los dos genotipos (tóxicos y no tóxicos) contiene fitatos que van desde 7.2 hasta 10.1% (Makkar y col., 1997). Los efectos de fitato de *J. curcas* en animales no han sido todavía estudiados. Dado que los niveles de fitato en estas semillas son altos, la utilización eficiente para la alimentación de animales monogástricos, requiere de la adición de fitasa a piensos o en su defecto el tratamiento térmico necesario para su disminución. Algunos estudios mostraron contenidos altos de fitatos en la harina de *Jatropha* comparados con los de soya, indicando que es un constituyente antinutricional importante que puede disminuir biodisponibilidad de minerales, especialmente Ca^{+2} y Zn^{+2} sin embargo, los reportes de tratamientos térmicos muestran disminuciones satisfactorias de este compuesto. A los fitatos también se le atribuyen implicaciones en la disminución de la digestibilidad de la proteína al formar complejos e interactuar con las enzimas como la tripsina y pepsina (Makkar y col., 1998).

2.2.2 Inhibidores de tripsina

Los inhibidores de proteasas pueden producir ciertos efectos fisiológicos en animales; se especula aún sobre los efectos nutricionales y significancia fisiológica en humanos. La amplia distribución de los inhibidores de proteasa entre aquellas plantas que son una fuente importante de proteínas, ha estimulado la investigación sobre su posible implicación nutricional. Los inhibidores más estudiados han sido los de tripsina, ya que es una enzima digestiva de gran importancia en la digestión de los monogástricos como el ser humano. En relación a su efecto antinutriente, parecen causar retraso en el crecimiento y un bajo índice de la eficacia proteica. Estos inhibidores

enzimáticos, debido a su naturaleza proteica, se desnaturalizan térmicamente en la mayoría de los casos, perdiendo su efecto antinutriente (Morales y Troncoso, 2006).

Algunos estudios destinados a evaluar la actividad del inhibidor de tripsina de la harina de *Jatropha*, mostraron ser del mismo orden que en la harina de soya en bruto (sin tratamiento térmico), lo cual podría causar efectos fisiológicos negativos en monogástricos (Makkar y Becker, 1998). Los inhibidores de tripsina en harina de semilla de *J. curcas* de ambos genotipos (tóxico y no tóxico) son similares, desde 18.4 a 27.3 mg de tripsina inhibida / g (Makkar y col., 1997). Makkar y Becker (1999) encontraron que en carpas (*Cyprinus carpio*), alimentadas con dietas con harina de *J. curcas* del genotipo no tóxico (contenido de inhibidores de 24.8 mg/g) y con harina tratada térmicamente (45 min, 121 °C, 66% de humedad, con 1.3 mg tripsina inhibida/g) no se observó diferencias significativas en el crecimiento, lo que indica que los peces fueron capaces de tolerar altos niveles de IT. Sin embargo, la alimentación con harina *J. curcas* sin tratamiento térmico en animales monogástricos, como las aves de corral, cerdos, y peces puede producir efectos adversos.

2.2.3 Curcina

Las lectinas son un grupo de productos naturales, proteínas o glucoproteínas con la propiedad de estar ligadas a ciertos glúcidos y además de su capacidad para aglutinar los eritrocitos (Moll y Moll, 2006). Estos productos presentan, además, otras propiedades químicas y biológicas de interés como: capacidad para inducir mitosis, para aglutinar células tumorales o para interactuar con grupos sanguíneos específicos, así como su toxicidad en animales, todos estos efectos derivan de la unión de las lectinas a ciertos tipos de azúcares presentes en la superficie celular (López y col., 2006).

Afortunadamente la mayoría de las lectinas son termolábiles y su actividad puede disminuirse por tratamiento térmico (Aregheore y col., 1998) y

por su carácter proteico se desnaturalizan al aplicar calor húmedo (Morales y Troncoso, 2006). La curcina (albúmina tóxica termolábil) se considera una lectina y la hemaglutinación es similar de ecotipos tóxicos y no tóxicos, esto sugiere que la curcina no es la principal toxina presente en las semillas de *Jatropha* (Becker y Makkar 2009). En semillas crudas y tratadas se han reportado un contenido de curcina que van desde 13 a 102 UH/mg proteína (Makkar y col., 1998; Donlaporn y col., 2010).

2.3 Compuestos con actividad biológica

2.3.1 Fenoles totales

En este grupo se incluyen los monofenoles, polifenoles, flavonoides y taninos. Casi todas las frutas y vegetales frescos, así como los granos de cereales, contienen cantidades apreciables de fenoles naturales. Los tres grupos más importantes de fenólicos dietéticos son los flavonoides, ácidos fenólicos y los polifenoles. Entre los polifenoles existen: los difenoles, con dos grupos -OH en el anillo aromático de benceno, como la hidroquinona el fenol simple más ampliamente distribuido; y los trifenoles, con tres grupos -OH en el anillo aromático, siendo el ácido gálico un ejemplo de estos. Está presente en forma esterificada en las catequinas del Té, en forma soluble como ésteres del ácido quínico, o taninos hidrolizables (ácidos tánicos), o derivados del ácido elágico (Morales y Troncoso, 2006).

Los compuestos fenólicos se encuentran comúnmente en las plantas tanto comestibles como no comestibles y se ha reportado que tienen múltiples efectos biológicos, incluyendo la actividad antioxidante (Kahkonen y col. 1999). La presencia de compuestos fenólicos en las plantas pueden tener un efecto importante en la estabilidad oxidativa y microbianas de seguridad (Hollman y col., 1996).

2.3.2 Taninos

Los taninos son compuestos que engloban un grupo heterogéneo de polifenoles con alto peso molecular, que aparecen en las plantas y que

contienen suficientes grupos hidroxilo que permiten uniones estables con proteínas. El efecto antinutricional de los taninos está relacionado con su capacidad de formar complejos con las proteínas, disminuyendo la digestibilidad de las mismas y aumentando los niveles de nitrógeno fecal, así como complejos con iones de calcio, hierro y cobre. Estos compuestos también pueden inhibir las enzimas digestivas como amilasas y proteasas, y actuar como anti vitaminas. Sin embargo, también ejercen efectos beneficiosos sobre la salud: tienen actividad antioxidante, previenen y mejoran actividades cardiovasculares y ejercen actividad anticancerígena (Morales y Troncoso, 2006).

En harina de *Jatropha curcas* se han encontrado cantidades insignificantes de fenoles totales (0.2%) y taninos (0.04%). Por su parte los taninos no fueron detectaron en harinas de *Jatropha* (Makkar y col., 1998).

2.4 Compuestos tóxicos

2.4.1 Ésteres de forbol

Los ésteres de forbol (EF) son diterpenos que tiene estructura esquelética tigliane. Dichos compuestos son moléculas anfifílicas, y tienen tendencia a obligar a los receptores de membrana de fosfolípidos. Durante el proceso normal de transducción de señales el DAG (diacil-glicerol) activa la PKC (proteína quinasa C), que participa en varias vías de transducción de señales. Los ésteres de forbol pueden actuar como un análogo de DAG y son fuertes activadores de la PKC. Estos pueden desencadenar la proliferación celular, lo que amplifica la eficacia de los agentes carcinógenos. Los ésteres de forbol por sí mismos no inducen los tumores, sino que promueven el crecimiento del tumor tras la exposición de dosis de carcinógeno. Se han caracterizado seis ésteres de forbol en *Jatrofa* (Haas y col., 2002), los cuales se muestran en la Figura 3.

El forbol y sus diferentes derivados, según se ha reportado, son potentes promotores de tumores, además de este efecto, inducen a una notable

diversidad de otros efectos biológicos a concentraciones excepcionalmente bajas. Son responsables de efectos irritantes de piel, purgante y promoción tumoral, ya que estimulan la proteína quinasa C (PKC), que participa en la señal y la transducción de los procesos de desarrollo de la mayoría de las células y los tejidos, produciendo una variedad de efectos biológicos en una amplia gama de organismos (Goel y col., 2007). Las semillas de *Jatropha* contienen al menos cuatro esteres diferentes, sus estructuras aun no son totalmente claras (Hass y Mittelbach, 2000).

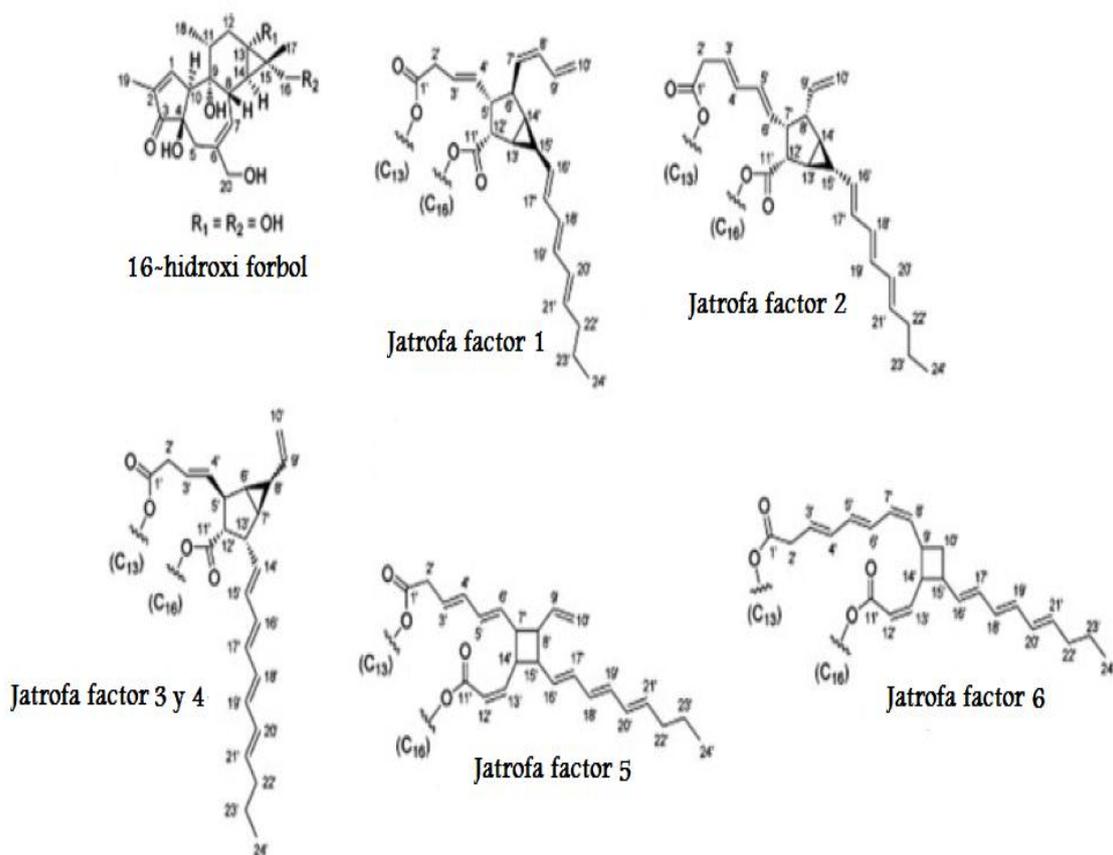


Figura 3. Estructura de ésteres de forbol presentes en *J. curcas* (Hass y col., 2002)

El efecto de los EF también se estudió en conejillos de indias *in vivo* por el que la aplicación tópica de EF induce la inflamación y la hiperproliferación epidérmica mediante la inducción de la síntesis de ADN a través de la activación de prostaglandinas y, especialmente, la prostaglandina E (Makkar y col., 1998).

El contenido de ésteres de forbol varía según la variedad y procedencia de la semilla; Por otro lado, mediciones en el contenido de este compuesto en el aceite y la semilla antes de la extracción del aceite demuestran que la torta conserva cantidades representativas de este compuesto, lo cual puede tener un efecto significativo en la no aceptación de una dieta para animales que contenga harina de *Jatropha* por su toxicidad (Makkar y Becker, 1998). Éstos son los componente con mayor efecto tóxico de la *Jatropha* y se encuentra presente en elevadas concentraciones en las semillas según su grado de desgrasado (Gandini y col., 2007).

Algunos estudios con las variedades tóxicas y no tóxicas (bajo o nulo contenido de ésteres de forbol) han revelado que la aceptación de la harina de estas semillas como alimento humano o animal se ve afectada por el contenido de este compuesto; cuanto más alto sea la cantidad, menor será la aceptación de la semilla de *Jatropha* (Makkar y Becker, 1998).

2.5 Métodos de detoxificación

El carácter tóxico de la semilla y el aceite de jatrofa, han llevado a la investigación e implementación de métodos para la eliminación o disminución de los compuestos tóxicos y antinutricionales que presenta la semilla tanto físicos como químicos.

Los métodos físicos incluyen un adecuado manejo, a través de operaciones de reducción de tamaño, tratamientos térmicos, adsorción, absorción, entre otros, los cuales han presentado éxito para el control de algunos agentes tóxicos según la especie y tipo de toxina (Anton y Lizaso, 2001). Los métodos físicos y electrónicos de separación y control de especies contaminantes a menudo han sido extremadamente usados por industrias alimentarias, sin embargo, requieren de procedimientos adicionales de detoxificación (Mallmann y col., 2006).

La detoxificación de productos contaminados por inactivación a través de reacciones químicas, alta presión o extracción, usando un solvente orgánico o una combinación de estos, ha sido utilizada para el control de toxinas desde 1960. La degradación de esta toxina puede ocurrir durante el procesamiento de alimentos y también por el uso de aditivos, los cuales son compuestos relativamente seguros cuando se manejan ciertos niveles en su empleo (Mallmann y col., 2006).

Es importante resaltar que las toxinas existen conjuntamente con otros compuestos que pueden interactuar entre sí en alimentos y raciones, influyendo en su toxicidad; El efecto negativo se ve favorecido por la combinación de diferentes compuestos tóxicos (Mallmann y col., 2006). Se ha reportado que luego de la extracción del aceite, el contenido de ésteres de forbol disminuye en un 45 % (Devappa y col. 2008), los estudios por métodos térmicos, se han enfocado principalmente en la eliminación e inactivación de antinutrientes termolábiles considerados nocivos en la semilla. Autores como Aregheore y col., (1997) y Trabi y col., (1997), han reportado disminuciones en actividad de antinutrientes por tratamientos secos y disminución en la actividad de lectina por tratamiento húmedo a partir de los 30 minutos de cocción.

La resistencias de los ésteres de forbol a las condiciones térmicas, han llevado a investigaciones para la detoxificación de estas semillas mediante la extracción con solventes orgánicos y tratamientos combinados (químico-térmico). Autores como: Trabi y col., (1997), Aregheore y col., (2003), Martínez y col., (2004) y Devappa y col. (2008) han empleado etanol, metanol, álcalis (NaOH y Ca (OH)₂), combinaciones alcohol-álcali, alcohol-NaHCO₃, reportando disminuciones por encima del 90% en el contenido de ésteres de forbol.

Recientemente, Devappa y col, (2009a) informó que los ésteres de forbol se podían extraer hasta un 80% y el residuo de aceite de jatrofa se puede transformar en biodiesel de alta calidad que cumple con los estándares de biodiesel de América y Europa. Los ésteres de forbol extraídos podrían ser utilizados como agentes de control biológico. La extracción de los ésteres de

forbol, a su vez reducen el riesgo para los seres humanos durante la producción de biodiesel. Devappa y col., (2009b) también encontró que los ésteres de forbol se degradan en el suelo, en 6-9 días, dependiendo de la humedad y la temperatura del suelo. Esto indica que la torta de *Jatropha* procedente de la extracción de aceite podría ser utilizada como fertilizante. Sin embargo, son necesarias nuevas investigaciones para aprovechar la planta de *jatrofa* y sus partes con posibles aplicaciones de agroindustriales.

2.6 Evaluación de efecto tóxico

2.6.1 Evaluación de semilla de *jatrofa* en modelos animales

La toxicidad de las semillas de *Jatropha* se ha estudiado extensamente en diferentes modelos animales como cabras, ovejas, ratones, ratas y peces siendo alimentados con semillas que contienen éster de forbol (Adam 1974; Adam y Magzoub 1975; Makkar y Becker, 1999). En la mayoría de los estudios, los animales fueron alimentados a la fuerza. Se observó en cabras una disminución en el nivel de glucosa, aumento de la concentración de arginasa, glutamato y oxalacetato transaminasas en el suero, falta de apetito, menor consumo de agua, diarrea, deshidratación y otros efectos hemorrágicos en diferentes órganos (Adam y Magzoub 1975).

Las ratas alimentadas con semillas crudas o cocidas murieron dentro de 2-3 días, mientras que la alimentación con aceite (crudo o cocido) y semillas tostadas produjo la muerte en 6-8 y 14-16 días, respectivamente (Liberalino y col., 1988). En otro estudio, la alimentación de las semillas de *jatrofa* (cortical y en polvo) a 40 y 50% en la dieta produce la mortalidad en los ratones y los síntomas de enfermedad clínica y patológica antes de la muerte. Los síntomas importantes que se incluyen apetito, discapacidad, diarrea, respiración acelerada, dificultad para mantener su posición normal y el pelo rizado. Hallazgos macroscópicos en el intestino mostró enteritis catarral aguda y la extravasación de sangre en el lumen, se observó hígado congestionado, los riñones, el corazón y edema de pulmón. La cantidad de semillas de *jatrofa* en la dieta influyó en el grado de alteraciones patológicas (Adam, 1974).

Por otro lado, harina de *J. curcas* que contenía una concentración de éster de forbol de 0.23 mg/g fue altamente tóxica en dieta a ratas Wistar macho de 28 días de edad, la mortalidad se produjo dentro de 8-10 d. Todas las ratas mostraron falta de apetito y la ingesta de una dieta baja, pérdida de peso, dificultad en las funciones motoras y diarrea severa antes de la muerte. El examen macroscópico de los órganos vitales indicó atrofia. Se observaron aumento de peso en los riñones, corazón, cerebro, pero la observación microscópica de hígado, riñón, músculo del corazón y el cerebro mostró estructura celular normal (Devappa y col., 2008).

En pollos, se han reportado estudios de toxicidad con semillas de *J. curcas*, se alimentaron a la fuerza pollos marrones Hisex durante 4 semanas con niveles desde 0.1 a 0.5% de la dieta mostrando disminución del crecimiento, daño hepático y hemorragias generalizada además de congestión. Los cambios bioquímicos incluyen aumento de la deshidrogenasa sérica, sorbitol, glutamato deshidrogenasa y actividad de oxalacetato transaminasa, aumento de las concentraciones de potasio y fósforo y la disminución de las proteínas totales y las concentraciones de calcio. Las concentraciones de lípidos totales hepática y cardíaca aumentaron significativamente. El hígado graso, la congestión del corazón y los intestinos, riñones agrandados y pálidos eran los síntomas descritos (El-Badawi y Adam, 1990, 1992).

En otro estudio con pollos marrones Hisex alimentados con dietas que contenían un 0,5% de semillas de *J. curcas* mostró una alta incidencia de mortalidad (El-Badawi y col., 1995). Estos resultados indican una mayor susceptibilidad de pollos Hisex a semillas de *J. curcas*. Lo anterior sugiere que los pollos pueden ser un modelo animal confiable para estudiar la toxicidad de jatrofa o para evaluar las estrategias de detoxificación que se están investigando para hacer las harinas de jatrofa o aislados proteicos no tóxicos para su incorporación en la dieta de pollos de engorda (Makkar y Becker, 2009).

2.6.2 Evaluación de efectos tóxicos en aves

En aves los efectos toxicológicos se caracterizan por decremento del consumo de alimento y en la ganancia de peso, elevada actividad enzimática en suero, incremento de peso del hígado y riñón, necrosis hepática y raquitismo (Weibking y col., 1993).

Las aminotransferasas en suero sanguíneo se alteran en caso de daño en las células hepáticas. Su elevación habitualmente indica muerte (necrosis o apoptosis) de los hepatocitos por inflamación hepática sin embargo, hay otros mecanismos que pueden producir el mismo efecto, como la isquemia hepática. Existen dos aminotransferasas que se utilizan en los exámenes habituales de evaluación del hígado: ALT (alanino aminotransferasa) y la AST (aspartato aminotransferasa), las cuales son utilizadas como indicadores de daño hepático (Landeros y col. 2008).

La actividad sérica de AST en aves es considerada un indicador sensible de daño o disfunción hepatocelular (Kubena y col., 1998), debido a que la necrosis u otra alteración que aumente la permeabilidad celular, podría causar liberación e incremento inmediato de esta enzima en el suero (Shukla y Pachauri 1995). Algunos autores reportan que en casos de daño hepático crónico pueden producirse daños o ruptura hepatocelulares sutiles, pudiendo resultar en valores normales en la actividad sérica de AST y en algunos casos disminución de los mismos (Fudge 2000). En estos casos es común encontrar en aves hallazgos de fibrosis hepática con valores normales de AST, disminución de albúmina y otras proteínas (Lumeij, 1997).

Otro de los puntos importantes en el análisis toxicológico que se realiza a pollos de engorda es el contenido de proteína en sangre. La determinación de proteínas totales se realiza para evaluar la posible presencia de enfermedades nutricionales, signo de mal nutrición, enfermedades del riñón o del hígado, o bien que el cuerpo no absorba bien suficientes proteínas. Las proteínas totales del suero se pueden separar en dos grandes grupos la albúmina y las globulinas. La albúmina es la proteína de más concentración en

la sangre. La albúmina transporta muchas moléculas pequeñas (bilirrubina, progesterona y medicamentos), y tiene también la función de mantener la presión sanguínea ya que favorece la presión osmótica coloidal para mantener líquidos en el torrente sanguíneo y que no pasen a los tejidos, manteniendo un equilibrio (Arrieta-Mendoza y col. 2007).

III. JUSTIFICACIÓN

El aumento de la utilización de semilla de jatrofa para la producción de biocombustible ha generado el incremento de subproductos como la torta resultante de la extracción de aceite de esta semilla, su uso ha sido limitado por la presencia de sustancias tóxicas (ésteres de forbol).

Se sabe que en México existen dos ecotipos de jatrofa considerados como tóxicos y no tóxicos (según su contenido de ésteres de forbol), pero se tiene muy poca información al respecto. La posibilidad de eliminar los ésteres de forbol o llevarlos a los niveles reportados para jatrofa no tóxica así como disminuir o eliminar los factores antinutricionales, hacen de la torta de jatrofa un ingrediente que puede convertirse en un alimento de calidad para los humanos y animales ya que su contenido de proteína y calidad de la misma es elevado. Se requiere que la detoxificación e inhibición de los factores antinutricionales deba realizarse con métodos rentables y no contaminantes.

Por lo tanto, hace indispensable su caracterización y eliminación de compuestos tóxicos (ésteres de forbol) que contiene mediante métodos de detoxificación efectivos. Así mismo, se requiere la evaluación del efecto tóxico que ambos ecotipos puedan presentar ante su consumo. Además, no hay información de la capacidad antioxidante, ni del perfil fenólico. De esta forma se podría dar un valor agregado a un subproducto que en la actualidad es considerado como un desecho y posible contaminante.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la composición química semilla de jatrofa tóxica, no tóxica y detoxificada y evaluar el efecto de su consumo sobre parámetros productivos, bioquímicos y tóxicos en pollos.

4.2 Objetivos Específicos

- Evaluar dos métodos de detoxificación de semillas de jatrofa tóxica, determinado mediante la cuantificación de ésteres de forbol.
- Determinar el análisis proximal y contenido de compuestos antinutricionales (ácido fítico, inhibidores de tripsina, curcuma y saponinas), la composición fenólica (taninos, fenoles totales y capacidad antioxidante) y el contenido de minerales de semillas de jatrofa tóxica, no tóxica y detoxificada.
- Probar el efecto del consumo de jatrofa tóxica, no tóxica y detoxificada sobre parámetros productivos (índice de conversión, índice de productividad y ganancia de peso diaria) en pollos de engorda.
- Estudiar el efecto del consumo de jatrofa tóxica, no tóxica y detoxificada sobre algunos parámetros bioquímicos (contenido de proteína total en suero sanguíneo, actividad enzimática de alanina amino transferasa y aspartato amino transferasa) y evaluaciones histopatológicas en tejido hepático y renal de los pollos.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Semilla de jatrofa

Se utilizaron dos ecotipos de jatrofa, una no tóxica proveniente del estado de Puebla y una tóxica de Chiapas. Las semillas se descascarillaron y se molieron.

5.2 Estrategia de detoxificación

Se utilizaron dos métodos reportados en la literatura con algunas modificaciones (Cuadro 2). En el método de Martínez-Herrera y col. (2006) se modificó el tiempo, la temperatura y la concentración de bicarbonato. Mientras con el método propuesto por Devappa y col. (2010) la semilla se expuso directamente al sol, sin mezclarse con suelo o silica gel como propusieron estos autores.

Cuadro 2. Métodos de detoxificación

Métodos Reportados	Variaciones
Etanol acuoso al 90% a 60°C por 120 min seguido de un tratamiento con bicarbonato de sodio (NaHCO ₃) al 0.07%. Martínez-Herrera 2006	A 60 y 70 °C Por 60, 90 y 120 min Bicarbonato de sodio al 0.0, 0.035, 0.07 y 0.14%.
Exposición al sol en suelo por 12 días Devappa y col., (2010)	Exponiendo la semilla directamente al sol por 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h luz.

Nota: Los métodos que utilizan metanol o hexano fueron descartados dado que estos reactivos son tóxicos por naturaleza y no se desea resolver un problema creando otro.

5.3. Métodos

5.3.2 Análisis proximal

5.3.2.1 Cenizas

El contenido de cenizas se determina de acuerdo con la AOAC (1990) (Martínez y col., 2010). La ceniza de un producto alimenticio es el residuo inorgánico que queda después de quemar la materia orgánica. La cantidad de cenizas representa el contenido total de minerales en los alimentos. La determinación se hace por medio de incineración de la muestra a una temperatura no mayor de 500 °C. Se tara un crisol de porcelana, se pesa aproximadamente 1g de muestra seca y molida, posteriormente se calcina en mechero, posteriormente se coloca el crisol en una mufla a una temperatura de 500 °C hasta que las cenizas tomen un color blanco uniforme. Después de dejar enfriar la muestra en un desecador se pesa el crisol. El porcentaje de cenizas del producto, es igual a:

$$\% \text{Cenizas} = [(m_2 - m_1) \times 100] / m_3$$

Donde:

m_1 : masa del crisol vacío (g)

m_2 : masa del crisol con muestra calcinada (g)

m_3 : masa de la muestra seca (g)

5.3.2.2 Fibra

Para la determinación del contenido de fibra se utiliza el método gravimétrico enzimático descrito por Prosky y col. (1988) con ligeras modificaciones. Las determinaciones se realizan por duplicado y cada uno con dos replicas.

Pesar aproximadamente 1g de muestra previamente desgrasada en dos vasos de precipitados de 250 mL (1 g en cada vaso). Se adicionan 50 mL de una solución reguladora de fosfatos 0.08 M y pH 6.0 y 0.1 mL de enzima α -

amilasa termoestable. Los vasos se agitan, cubiertos con papel aluminio y colocados en baño maría. Agitar en intervalos de 5 min, incubar por 15 min después de que la temperatura interna alcanzo 95 °C. Se dejan enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se ajusta el pH a 7.5 ± 0.2 adicionando 10 mL de NaOH 0.275N, medir el pH (si es necesario ajustar con NaOH o HCl al 5%). Posteriormente se adiciona 0.1mL de solución de proteasas (50 g/L) preparada al instante con la solución de fosfatos (cada vaso contendrá 5 mg de proteasas). Cubrir los vasos con papel aluminio y colocarlos en baño maría a 60 °C con agitación continua. Incubar por 30 min después de que la temperatura interna de los vasos alcanza 60 °C.

Nuevamente se dejan enfriar los vasos y se ajusta el pH entre 4.0 y 4.6 adicionando 10 mL de HCl 0.325 M, medir el pH (si es necesario ajustar con NaOH o HCl al 5%). Se adiciona 0.1 mL de amiloglucosidasa a cada vaso, se cubre con papel aluminio nuevo y se coloca nuevamente en baño maría a 60 °C y con agitación continua. Se incuba por 30 min después de que la temperatura interna alcanza los 60°C. Después de este proceso se adicionan 4 volúmenes de etanol al 95% a cada vaso, se cubren con papel aluminio y se deja reposar a temperatura ambiente hasta el día siguiente para completar la precipitación. Al día siguiente, se centrifuga en tubos previamente tarados (10min a 5000 rpm) el contenido de los vasos, el sobrenadante se desecha y los residuos secos son pesados y registrados.

El residuo uno se utiliza para determinarle el contenido de proteína y el residuo dos para determinarle en contenido de ceniza. El porcentaje de fibra dietaría total se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ Fibra Dietaría Total} = [(\text{promedio de los dos residuos en mg}) - \text{proteína (mg)} - \text{ceniza (mg)}] * 100$$

5.3.2.3 Proteína cruda

El contenido de proteína total se determina de acuerdo con Villegas y Mertz (1970), por el método de Micro-Kjeldahl. El método se basa en la

combustión en húmedo de la muestra por el calentamiento del ácido sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores metabólicos y de otro tipo para reducir el nitrógeno orgánico presente hasta amoniaco, el cual queda en solución en forma de sulfato de amonio. El digerido una vez alcalinizado, se destila en forma directa o por arrastre de vapor para desprender el amoniaco que es atrapado y posteriormente se titula con un álcali estándar para dar el contenido de nitrógeno orgánico. Se pesa 0.1 g de muestra seca molida y se adiciona en un tubo para digestión junto con 4 mL de mezcla de ácidos sulfúricos-salicílico (25 g de ácido salicílico en 1 L de ácido sulfúrico concentrado), se deja reposar la mezcla toda la noche tapando los tubos con parafilm.

Después del reposo se agrega 0.6 g de la mezcla catalítica de selenio (Merck Art. 8030) y perlas de vidrio. Se deja digerir calentando a una temperatura de 180 ° C durante una hora y después se aumento la temperatura y se continúo calentando hasta que muestra alcanzó una apariencia clara (color verde azulado). Terminada la digestión se deja enfriar la muestra para su posterior destilación.

Para la destilación se agregan 29 mL de agua destilada pero en pequeñas fracciones para enjuagar el tubo, evitando que queden residuos de muestra que pudiese causar pérdidas, todo esto se transfiere a un tubo del destilador. Por otro lado, se adicionaron 5 mL de solución indicadora de ácido bórico a un matraz Erlenmeyer de 125 mL y se colocó debajo del condensador del equipo de destilación (Rapidstill II, Labconco). Al tubo que contenía la muestra se le agregaron 20mL de NaOH 10N y se colocó en el destilador. Dicho proceso termina cuando el matraz receptor contiene 75 mL del destilado. Finalmente se titula la muestra con H₂SO₄ 0.01 N hasta que el color cambio de verde a rosa. Para el cálculo de proteína se utiliza la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ N} * 6.25$$

Donde:

$$\% \text{N} = (V - V_0) * N * \text{meq} * 100 / M$$

V = mL de H₂SO₄ empleados en la titulación de la muestra

V_0 =mL de H_2SO_4 en el blanco

N=Normalidad del H_2SO_4

meq = miliequivalentes del N_2 0.014g

M=muestras en gramos

Nota: 1mL de H_2SO_4 0.01N=0.14mg de N- NH_4

5.3.2.4 Extracto etéreo

El contenido de extracto etéreo se determina de acuerdo con la AOAC (1990). La grasa cruda está formada principalmente por lípidos y otras sustancias como clorofila, pigmentos (carotenoides y xantofilas), vitaminas liposolubles, compuestos orgánicos volátiles, etc. Todos estos tienen el carácter físico común de ser solubles en ciertos disolventes. La denominación extracto etéreo es debido a la utilización de hexano como disolvente. Se pesa el papel filtro seco aproximadamente de 2 g de muestra seca y molida anotando el peso exacto y destarando el papel (pi). Posteriormente se coloca la muestra en un cartucho para extractor Goldfish y se agregan 50 mL de hexano para cada muestra en el recipiente respectivo del equipo, el proceso dura aproximadamente 2 h. Al finalizar el proceso el cartucho se colocó en el desecador para enfriar y cuando fue apropiado se pesó destarando el papel y el cartucho (pf).

El contenido de extracto etéreo se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Extracto etéreo (\%)} = ((pi - pf) / pi) * 100$$

5.3.3 Minerales y calidad de proteína

5.3.3.1 Minerales

El contenido de Fe, Zn se determinó usando una digestión húmeda de acuerdo al método descrito por Jones y Case (1990). A 0.5 g de muestra seca y molida se le adicionan 4 mL de ácido nítrico y se cubrió con parafilm y se dejó reposar por 30 min. Se coloca en una placa de digestión y se calentó a 100 °C durante 1 h. Se retiró de la placa de digestión, se dejó enfriar a temperatura

ambiente y se adicionaron 2 mL de ácido perclórico, se colocó nuevamente en la placa de digestión a 150-170 °C. Se tomó como punto final de la digestión cuando aparezcan humos blancos y el digerido se encuentre totalmente transparente. La muestra digerida se dejó enfriar y se aforo a 50 mL con agua desionizada y se leyó directamente por absorción atómica. Los cálculos se realizaron en base a la siguiente formula.

$$\text{Mineral en ppm} = (\text{ABSm} - \text{ABSb}) (50 \text{ mL/g})$$

Donde:

ABSm= absorbancia de la muestra

ABSb= absorbancia del blanco

50 mL/g= factor de dilución

5.3.3.2 Digestibilidad de proteína

La digestibilidad de la proteína *in vitro* (IVPD) se determinó según técnica multienzimático (Satterlee, y col., 1979), la cual consiste en disolver una cantidad de muestra que contenga exactamente 63.8 mg de proteína en 10 mL de agua destilada. Se ajustó pH a 8 y se incubaron las muestras hasta que alcanzaron una temperatura de 37 °C.

A continuación se añadió 1mL de mezcla enzimática (1.58 mg de tripsina, 3.65 mg de quimiotripsina y 0.45 mg de peptidasa en 1 mL de agua destilada), si incubaron las muestras durante 10 min a una temperatura de 37 °C, después se agregó 1mL de proteasa (1.48 mg de proteasa bacteriana en 1 mL de agua destilada) y se agitaron durante 10 min a 55 °C. Cuando las muestras alcanzaron la temperatura ambiente se determinó el pH.

La digestibilidad de la proteína de la muestra se calculó utilizando la siguiente ecuación de regresión: $Y = 234.84 - 22.56 (X)$. Donde, Y =% digestibilidad de la proteína y X = pH de la suspensión.

5.3.4 Compuestos antinutricionales

5.3.4.1 Acido fítico

La valoración del ácido fítico se realizó por medio del método colorimétrico propuestos por Haug y Lantzsch (1983). Se realizó de la siguiente manera: se pesó 50 mg de muestra a la cual se agregaron 20 mL de HCl 0.2 N se expuso a agitación mecánica durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min. Se tomó una alícuota de 0.5 mL a la que se le agrega 1 mL de solución férrica (0.2g de sulfato férrico de amonio $12 \text{ H}_2\text{O}$ disueltos en 100 mL de HCl 0.2 N y aforado a 1 L). Se tapa el tubo con una canica y se coloca en baño de agua en ebullición por 30 min. Posteriormente se agregaron 2 mL de solución de 2,2-bipiridina (1 g más 1 mL de ácido tioglicólico y aforado con agua a 100 mL), se mezcla el contenido y se lee la absorbancia a 519 nm, 30 seg después de haber agregado el último reactivo. Los resultados se expresan en g 100 g^{-1} de ácido fítico mediante el uso de ácido fítico (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) como un estándar.

5.3.4.2 Inhibidores de tripsina

Se pesó 500 mg de la muestra, la extracción se llevó a cabo con 50 mL de agua destilada con agitación mecánica a una velocidad de 200 rpm durante 30 min. 10 mL de la suspensión de la muestra fue desestabilizado después por la adición de un volumen igual de tampón de ensayo y se sacudió vigorosamente por 2-3 minutos antes de filtrar a través de un Whatman N° 2 de papel. En tubos de ensayo se adicionaron 1 mL de extracto, 2.0 mL de solución BAPNA y posteriormente 0.5 mL de sol enzimática (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tripsina porcina). La reacción se efectuó en baño a 37 ° C. Exactamente 10 min después de la adición de la solución de tripsina, la reacción se detuvo mediante la adición de 0.5 mL de solución de ácido acético al 30%. Se leyó la absorbancia a 410 nm (lectura de la muestra), la reacción se efectuó también en la ausencia de inhibidores mediante la sustitución de la muestra con 1 mL de agua (lectura de referencia).

Se utilizó agua destilada como blanco. Designando una unidad de tripsina como incremento de absorbancia de 0.01 a 410 nm en las condiciones del ensayo, la actividad inhibitoria de tripsina se expresa en unidades de tripsina inhibidas (TUI) por miligramo de muestra seca y se calcula de la siguiente manera:

$$\text{TUI / mg muestra} = \{[(Ar410 - As410) * 100] / \text{mL de extracto diluido}\} / (\text{mg muestra} / \text{mL de extracto diluido})$$

Reactivos Utilizados: El tampón de ensayo fue de 50 mM Tris, pH 8,2, que contiene 10 mM de CaCl₂. Se prepara solución de tripsina madre disolviendo 10 mg de tripsina cristalina porcina (tipo IX Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) en 50 mL de solución de HCl 1 mM, pH 2.5, que contenía 2.5 mM de CaCl₂. La solución se mantuvo a 5 °C.

Para preparar una solución de tripsina de trabajo, 2 mL de la solución se diluye hasta un volumen total de 25 mL, con la solución de HCl anterior. Se prepara una solución BAPA madre disolviendo 400 mg de BAPNA (Sigma) en 10 mL de dimetilsulfóxido. La solución es muy estable, incluso a temperatura ambiente. Se prepara una solución de trabajo BAPNA diluyendo 0.25 mL de solución madre BAPA a un volumen total de 25 mL, con el tampón de ensayo precalentado a 37 °C. Se prepara nueva solución BAPNA de trabajo para cada ensayo.

5.3.4.3 Curcina

El análisis del contenido de lectinas (curcina) se realizó mediante el ensayo de hemaglutinación (Makkar y col. 1997), se utilizaron placas de microtitulación. Antes de realizar la extracción la muestra debe ser desgrasada, lo cual se realizó en frío con solución de cloroformo: metanol (2:1), se agregaron 4 mL de solución por gramo de muestra, se agitó por 30 min y se filtró, esta operación se repitió 3 veces, una vez que se concluyeron los lavados

la muestra se dejó secar a temperatura ambiente para su posterior utilización. Los extractos se realizaron con Tris-HCl 50mM pH 8.0 en proporción 1:5 (gramos de muestra desgrasada / mL de sol. Tris-HCl), agitando por 12 h a 4°C seguido de un filtrado.

En la placa de microtitulación en el carril 1 se adicionaron 100µL de extracto (teniendo una réplica por repetición) y del carril 2 al 12 se agregaron 50µL de PBS 1X; se realizaron diluciones consecutivas de la muestra transfiriendo 50 µL del carril 1 al 2 y así sucesivamente. Una vez que se tuvieron las diluciones se agregaron por pozo 50 µL de solución de eritrocitos en tampón fosfato salino (PBS 1X, pH 7.0) al 0.05%. Se incubaron las placas por 2 h a 37 °C y se observó al microscopio para determinar en qué pozo desaparece la aglutinación de los eritrocitos. El contenido de curcina se determinó indirectamente al medir actividad hemaglutinante expresada como la cantidad mínima del material del estudio (en mg/mL del medio de ensayo), que producen aglutinación. Se utilizó la siguiente fórmula para determinar el contenido de curcina:

$$\text{Actividad Hemaglutinante} = 2^n / \text{mg de proteína en la muestra}$$

Donde: n es número del pozo en el cual no se presentó la aglutinación

5.3.5 Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante

5.3.5.1 Fenoles totales

El método empleado fue el de Folin Ciocalteu, descrito por Singleton y col. (1999), el cual, está basado en la reducción de ácido gálico por compuestos fenólicos en presencia de un álcali (carbonato de sodio).

Se pesó 1 g de muestras en un tubo falcón y se añadió 10 mL de metanol al 30 % y se agitó en un vortex a 8000 rpm durante 10 min, se centrifugó y se filtró con papel Whatman hasta obtener todo el líquido. Se toma una alícuota de 125 µL de extracto y se coloca en un tubo de ensayo. Se le adiciona 500 µL de agua desionizada y se agita brevemente a 3000 rpm.

Después se le agregan 125 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu y se agita brevemente a 3000 rpm. Se deja reposar por 6 min en oscuridad.

Posteriormente al tubo se le adicionan 1.25 mL de Na_2CO_3 al 7 % y 1 mL de agua desionizada y se agita brevemente a 3000 rpm. Se deja reposar 1.5 h en la oscuridad a temperatura ambiente. Después del reposo se lee a una absorbancia de 750 nm en el espectrofotómetro (6405 UV/Vis, JENWAY). En otro tubo se preparo el factor de corrección en 125 μL del extracto de la muestra y todos los reactivos bajo las mismas condiciones a excepción del reactivo Folin-Ciocalteu. Por otro lado se prepararan 2 blancos de calibración. Para el blanco de calibración de utiliza metanol al 30% y con todos los reactivos bajo las mismas condiciones. Para el blanco de calibración del factor de corrección se usa metanol al 30% y todos los reactivos bajo las mismas condiciones a excepción del Folin. La concentración final se expresa como mg equivalentes de ácido gálico/ 100g de muestra (mg EAG/100g).

Para la determinación de fenoles totales se elabora una curva estándar de calibración, en la cual se toma 10mg de ácido gálico y se disuelve en 50 mL de metanol al 30%; la concentración final es de 0.2 mg/mL. De esta solución se toman 25 mL de alícuota y se lleva a 50 mL con metanol al 30%, y así sucesivamente hasta obtener una serie de concentraciones de 0.2 hasta 0.00625 mg/mL. De cada una de las soluciones se tomo una alícuota de 125 μL y se siguió la técnica de fenoles totales. La ecuación obtenida fue la aplicada en la determinación de fenoles totales. La concentración final se expresa como mg equivalentes de ácido gálico/100g de muestra (mg EAG/100g).

5.3.5.2 Taninos

Se cuantificaron los taninos condensados expresados como mg equivalentes de (+)-catequina/g de muestra (mg eq (+) C/g muestra), de acuerdo al ensayo de la vainillina de Deshpande y Cheryan (1985). El ensayo se basa en la condensación de la vainillina con proantocianinas en soluciones ácidas, la vainillina protonada es un radical electrofílico débil que reacciona con

el anillo flavonoide en la posición 6 u 8. El producto intermediario de esta reacción se deshidrata rápidamente para dar un producto coloreado. La reacción que se verifica entre la vainillina y los flavonoides como (+) catequina.

Se pesan 2 g de muestra y se adicionan 10mL de metanol, se agita en vortex durante 20 min a 8000 rpm, se centrifuga a 5000 mg por 5 min. Se toma una alícuota de 1 mL de esta solución y se le adicionan 5 mL de reactivo de vainillina recién preparado (vainillina 1% en metanol y HCl 8% en metanol en proporción 1:1). Se prepara un blanco de corrección con 1 mL de solución y 5 mL de HCl al 4% en metanol. La reacción se lleva a cabo a una temperatura de 30 °C durante 25 min, después de este periodo se lee la absorbencia a 500 nm. La concentración de taninos condensados se calculo en base a una curva de calibración de (+)-catequina.

5.3.5.3 Compuestos fenólicos simples por HPLC

El análisis de compuestos fenólicos por HPLC se hizo en base a la metodología desarrollada por García-Falcón y col (2007) con algunas modificaciones. Se pesaron 100 mg de muestra liofilizada y molida, los cuales fueron colocados en un tubo falcón al que se le adiciona 10 mL de metanol al 30% la mezcla se agito por 10 min en vortex, 10 min en sonicador y nuevamente 10 min en vortex. Posteriormente se centrifuga 5 min a 5000 rpm. El sobrenadante es recuperado, tomando una alícuota la cual se filtra a través de una membrana de 0.45 µm, el filtrado es colocado en el vial y se inyecta inmediatamente al HPLC.

El análisis de HPLC de los compuestos fenólicos se efectuó con una separación en fase reversa utilizando una columna Zorbax (ODS) – C18 (5 mm tamaño de partícula, 15 cm x 4.6 mm i.d.). Se uso también una precolumna Zorbax ODS – C18. La fase móvil corrió a 1.0 mL/min y consistió en solvente A (1% de ácido fórmico en agua) y solvente B (1% ácido fórmico en metanol), Durante el análisis, el gradiente del solvente se programó de 10 a 100% de B en A en 30 min y el volumen de inyección fue de 20 µL. La temperatura de la

columna se mantuvo a 25 °C. Se realizó un barrido del espectro de absorción de 200-500 nm.

La detección de los ácidos fenólicos se hizo a 280 y 320 nm, mientras que para las catequina y flavonoles a 280 y 360 nm, respectivamente. Todos los solventes utilizados se filtraron a través de membranas de 0.45 µm. La identificación de ácidos fenólicos se realizó mediante comparación con el tiempo de retención y espectros de absorción de estándares de compuestos fenólicos comerciales y la concentración de los compuestos fenólicos analizados se determinó mediante la realización de las correspondientes curvas para cada compuesto y los resultados se expresaron en mg/100g de muestra.

5.3.5.4 Capacidad antioxidante *in vitro* por el método TEAC.

El ensayo de la capacidad antioxidante expresada como equivalentes de Trolox fue desarrollado inicialmente por Miller *et al* (1993) y posteriormente mejorado por Van den Berg *et al* (1999). El cual está basado en atrapar aniones de larga vida como el 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato-HCl (ABTS). En este análisis el ABTS es oxidado por el oxidante (metamioglobina y por el peróxido de hidrogeno, dióxido de manganeso, persulfato de potasio, además de reacciones enzimáticas). La reacción presenta una coloración intensa y puede detectarse espectrofotométricamente a 734 nm. La actividad antioxidante es medida por la habilidad que tiene la muestra de disminuir el color, reaccionando directamente con el radical ABTS (Prior y col., 2005).

El radical ABTS se obtiene disolviendo 0.0038g de ABTS (7 mM) en 1 mL de persulfato de potasio 2.45 mM. La solución concentrada de ABTS es diluida con buffer de fosfato salino (4 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na₂HPO₄ y 0.24 g de KH₂PO₄ disueltos en un 1 L de agua y ajustar el pH 7.4), 0.2 mL en 14 mL de buffer aproximadamente para obtener una absorbancia final en la dilución de 0.7 ± 0.2 a una longitud de onda de 734 nm. En un tubo eppendorf colocar 0.99 mL de buffer diluido y medir absorbancia nuevamente

(Abs al t=0min) e inmediatamente se adicionan 0.01 mL de muestra al tubo, se agita y transcurridos 6 min se mide nuevamente la absorbancia (Abs al t=6min). En este caso el blanco consiste en el solvente de extracción de la muestra y para el caso de la curva Trolox metanol.

Para cuantificar la actividad antioxidante se realiza una curva estándar de Trolox y utilizando la absorbancia neta (AN) y es expresada como μmol equivalentes de Trolox por gramo de muestra ($\mu\text{mol ET/g}$). Se calcula de la siguiente manera: $AN = (A_{t=0 \text{ muestra}} - A_{t=6 \text{ muestra}}) - (A_{t=0 \text{ solvente}} - A_{t=6 \text{ solvente}})$, donde A= Absorbancia

5.3.6 Compuestos tóxicos

5.3.6.1 Ésteres de forbol

La cuantificación de los ésteres de forbol se determinó a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) según el método descrito por Martínez Herrera y col., (2006), se pesa 2.5 g de semilla molida la extracción se realizo adicionando 10 mL metanol, agitando en vortex por 20 min a 5000 rpm y posteriormente se filtra al vacio. Se toma una alícuota la cual se filtra a través de una membrana de 0.20 μm , el filtrado es colocado en el vial y se inyecta inmediatamente al HPLC. La columna de analítica es en fase invertida C18 (LiChrospher 100, end capped 5 micras) 250 x 4 mm de diámetro. Como fase móvil se utilizó acetonitrilo: agua en proporción 80:20. La Separación se lleva a cabo a temperatura ambiente (25 °C) y con un flujo de 1 mL/min. Los picos de esterres de forbol aparecen entre los 8 min y 13 identificados a 254.4 nm. Los resultados se expresan en equivalentes del estándar, forbol miristato-12-13-acetato, mismo que se detecta entre los 21 y 23 min.

5.3.7 Evaluación toxicológica en pollos

El propósito de este experimento fue evaluar el efecto nutricional y tóxico de Jatrofa en pollos de engorda. El presente estudio se llevó a cabo en las instalaciones de la Posta Zootécnica del Centro de Ciencias Agropecuarias de

la Universidad Autónoma de Aguascalientes ubicada en el municipio de Jesús María, Aguascalientes.

5.3.7.1 Pruebas bioquímicas

Las determinaciones bioquímicas, proteína total, albumina y actividad enzimática de ALT (alanina amino transferasa) y AST (aspartato amino transferasa) en suero sanguíneo se realizó por un método espectrofotométrico (Gornall y col., 1949). Se colecta una muestra sanguínea mediante la punción de vena yugular con jeringa, agregando a tubos que contienen anticoagulante (0.1 mL de EDTA 1%) y se mantiene en refrigeración para su posterior análisis en laboratorio. Las muestras son centrifugadas a 3000 rpm durante 5 min, para obtener el suero sanguíneo, para la determinación de proteína total, albumina, AST y ALT en el equipo RA-5O de Bayer®.

Para la lectura de proteína total se requiere el reactivo Biosystems PROTEIN (TOTAL) ® el cual contiene un reactivo A ya listo para su uso. La primer lectura es la del Blanco, que contiene 500 µL del reactivo, 10 µL de solución salina. Posteriormente se añaden 500 µL de reactivo en un tubo de ensayo, 10 µL de muestra, se mezcla durante 2 a 5 seg, después se vacía en una celdilla y se analiza en el equipo RA-5O de Bayer®, lectura inmediata. Valor obtenido en g/dL.

Para el contenido de Albumina se requiere el reactivo Biosystems Albumin® el cual contiene un reactivo A ya listo para su uso. La primera lectura es la del blanco, que contiene solo 500 µL del reactivo. Posteriormente se añaden 500 µL de reactivo en un tubo de ensayo, 5 µL de muestra, se mezcla durante 2 a 5 seg, después se vacía en una celdilla y se analiza en el equipo RA-5O de Bayer®, lectura inmediata. Valor obtenido en g/dL.

Para el análisis de actividad de AST y ALT se requiere el reactivo Biosystems AST/GOT® y ALT/GPT® respectivamente, los cuales contienen un reactivo A y un reactivo B, a partir de estos se prepara un volumen 8:2 que es

mezclado en un Vortex, de 15 a 20 segundos. Posteriormente a los 500 µL se le agregan 50 µL de muestra (suero), se mezcla de 2 a 5 seg, después se vacía en una celdilla para espectrofotómetro y se analiza en el equipo RA-50 de Bayer® durante 2 minutos 35 seg y 1 min 50 seg respectivamente, a 37 °C. Finalmente se captura el valor obtenido en U/L. Ambas pruebas se realizan por separado puesto que requieren reactivos y programación del equipo específicas.

5.3.7.2 Parámetros productivos

Los Parámetros productivos evaluados según Quintana (2003), semanalmente se registraron los pesos promedio de las aves (PP), el índice de conversión (IC), la ganancia diaria de peso (GDP) y el índice de productividad (IP). El PP fue obtenido dividiendo el peso total de los animales expresados en kg, entre el número de las aves pesadas.

El IC fue obtenido mediante la siguiente relación:

$$\frac{\text{Consumo Alimento}}{\text{Ganancia de Peso}}$$

La GDP (g/día), se calculó restando el peso final del peso inicial y dividido entre el número de días. Para el cálculo de IP se aplicó la siguiente fórmula:

$$IP = GDP * viab / IC * 10 \text{ donde:}$$

GDP= a la ganancia diaria de peso expresado en g/día

Viab= se le resta a las aves iniciadas la mortalidad y lo que resta es la viabilidad.

IC= es la cantidad de alimento consumido entre la cantidad de carne producido.

10= factor

5.3.7.3 Análisis histopatológico

La evaluación histopatológica de tejidos hepáticos y renales se realizó por el método descrito por Prophet y col. (1994). Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. El hígado y los riñones se extrajeron. Para la evaluación histopatológica, se tomaron muestras del lóbulo hepático derecho y el riñón derecho que; se conservaron en una solución fijadora (100 mL de formaldehído al 37%, 900 mL de agua destilada, 4.0 g/L de NaH_2PO_4 , 6.5 g/L de Na_2HPO_4 , pH 7.4) hasta su análisis histopatológico.

Se tomaron muestras de hígado y riñón (1 cm^3), previamente fijadas en formalina, para lavarlas (agua destilada), deshidratarlas (alcohol al 80, 96 y 100%), aclararlas (xilol) e infiltrarlas con parafina líquida en un procesador automático de tejidos (Histoquinet, Leica TP 1020). Se utilizaron un total de 12 soluciones en las cuales las muestras permanecieron una hora en cada una de ellas (Figura 4).

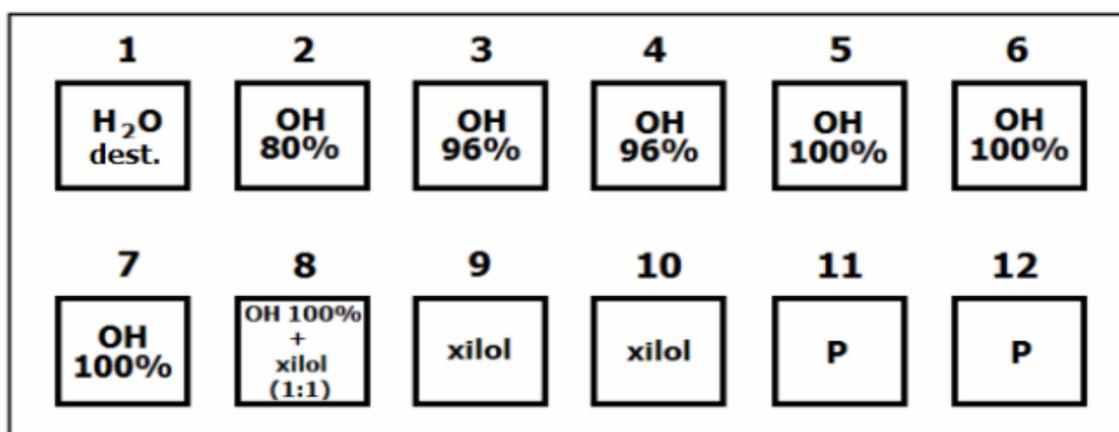


Figura 4. Soluciones utilizadas en el procesador automático de tejidos.

H₂O dest.: agua destilada, OH: alcohol, P: parafina líquida, punto de fusión de 56 °C

Terminado el proceso anterior, se elaboraron los bloques de parafina con la muestra incluida en ellos, para lo cual se utilizó un centro embebido de parafina y un enfriador. A partir de los bloques de parafina se realizaron los cortes histológicos de 5.0 μm de grosor usando un micrótopo de rotación, los cortes fueron extendidos en un baño de agua caliente ($50 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$) cubiertos

portaobjetos y se dejaron secar en la estufa por 24 h a una temperatura de 60 °C. Una vez secos estos fueron teñidos con hematoxilina/eosina (HE) para lo cual se utilizó un teñidor semiautomático, en el cual se utilizan 27 soluciones en las cuales los cortes permanecen un minuto en cada una de ellas (Figura 5).

Terminada la tinción se procedió a revisar cada una de ellas en un microscopio compuesto con objetivos de 10x y 40 x

1	2	3	4	5	6	7	8	9
xilol	xilol	xilol	xilol	OH 100%	OH 100%	OH 96%	OH 96%	OH 80%
10	11	12	13	14	15	16	17	18
H ₂ O	H	H	H ₂ O	H ₂ O	Li ₂ CO ₃	H ₂ O	OH 96%	E
19	20	21	22	23	24	25	26	27
E	OH 96%	OH 96%	OH 100%	OH 100%	OH 100%	xilol	xilol	xilol

Figura 5. Soluciones utilizadas en la tinción de cortes para histología
OH: alcohol, H₂O: agua, H: hematoxilina, Li₂CO₃: Solucion saturada de carbonato de litio, E: eosina.

5.4 Diseño experimental y análisis estadístico

5.4.1 Estrategia general

La estrategia general del trabajo consistió primeramente en evaluar los métodos de detoxificación en la semilla tóxica una vez que se hicieron las pruebas con los diferentes variantes propuestas en cada método se procedió al análisis del contenido de componentes tóxicos (ésteres de forbol), tanto en semilla detoxificada como en las semillas sin tratar. Con un diseño trifactorial con dos replicas de tres repeticiones cada una. Para la cuantificación de ésteres de forbol se utilizaron dos replicas de tres repeticiones cada una.

Una vez que se seleccionó el método en base a la eficiencia de eliminación de ésteres de forbol, se procedió a detoxificar la semilla que se

analizaría y probaría posteriormente en pollos. Se tomaron tres muestras aleatoriamente de semilla tóxica, no tóxica y detoxificada las cuales fueron caracterizadas (análisis proximal, contenido de compuestos fenólicos y antinutrientes), realizando dos replicas de cada una. Al concluir su caracterización química se procedió a la prueba con pollos de engorda para evaluar el efecto nutrimental y tóxico de las semillas (Figura 6).

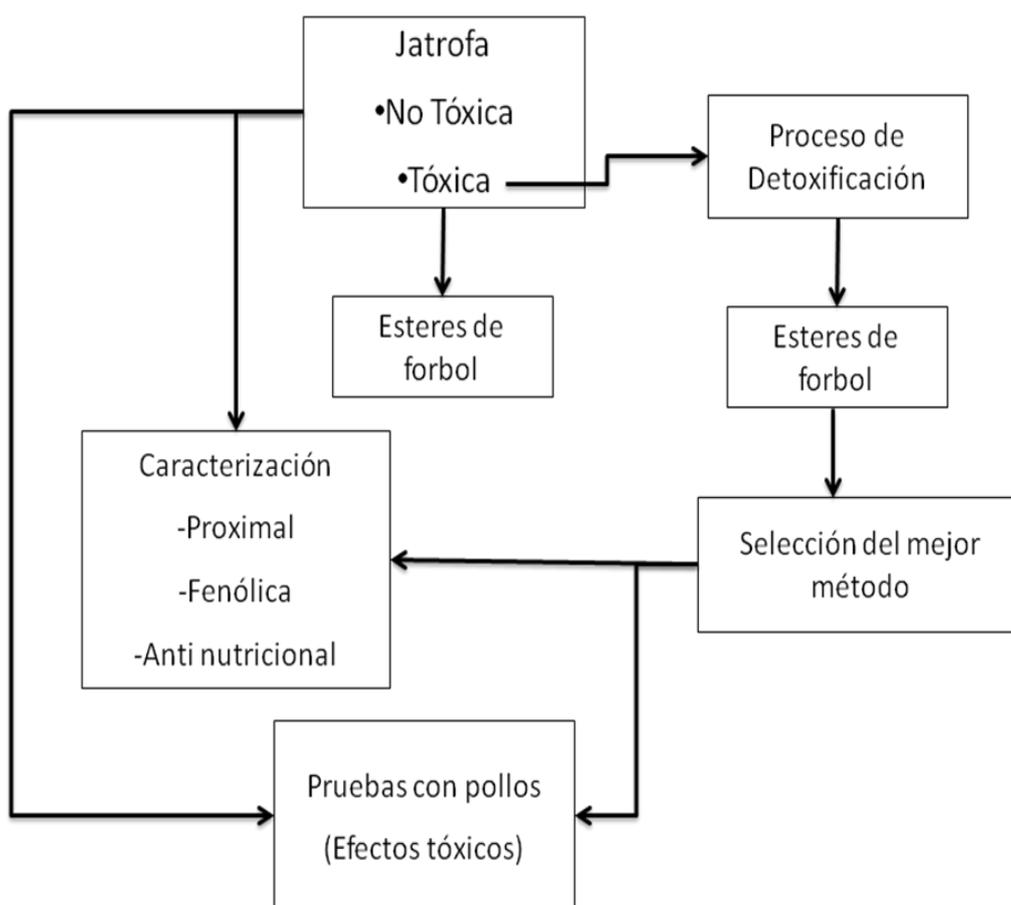


Figura 6. Estrategia general de trabajo

5.4.2 Diseño de experimento del análisis con pollos

Se utilizaron 180 pollos de engorde raza ROSS-308 de un día de edad, procedente de la incubadora Pollitos de Aguascalientes, con un peso promedio de 38.0 ± 3 g. Se administró el agua y alimento *at libitum*, se distribuyeron aleatoriamente en jaulas de 15 pollos cada una, se manejaron dos fases de

alimentación: iniciador del día 1 al 28 de edad y finalizador de 28 a 42 días, las dietas fueron isoproteicas e isoenergéticas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Características nutricionales del alimento comercial

Tipo de alimento/etapa	P.C (%)	E.M (Kcal/Kg)
INICIADOR 0 a 28 días	22.0	3,200
FINALIZADOR 28 a 42 días	18.0	3,200

PC= proteína cruda, EM= energía metabolizable. (NRC, 1994)

Los pollos fueron pesados al inicio del experimento, una hora después de su llegada a la caseta, se les suministró agua con azúcar más aminoácidos para contrarrestar el estrés del transporte.

El diseño experimental utilizado para esta investigación, fue un diseño completamente aleatorizado (DCA). Designando los tratamientos de la siguiente manera:

TRATAMIENTO	Repetición (1)	Repetición (2)	Repetición (3)	TOTAL
T ₁	15	15	15	45
T ₂	15	15	15	45
T ₃	15	15	15	45
T ₄	15	15	15	45
	60	60	60	180

Tratamiento 1: Dieta alimento comercial (control).

Tratamiento 2: Alimento comercial con harina de Jatrofa tóxica (10%).

Tratamiento 3: Alimento comercial con harina de Jatrofa no tóxica (10%).

Tratamiento 4: Alimento comercial con harina de Jatrofa detoxificada (10%).

Los pollos fueron distribuidos en grupos de 15 unidades experimentales (pollos) en 3 jaulas con 5 divisiones cada una, los tratamientos se distribuyeron al azar. Se monitoreo la temperatura de la caseta manteniéndola a 37°C durante la primera semana, posteriormente disminuyendo 2°C por semana. Los pollos fueron alimentados diariamente con el alimento correspondiente a cada tratamiento. Al día 28 se cambiaron a jaulas de mayor tamaño.

5.4.3 Diseño Estadístico

Se realizó un diseño multifactorial, en los experimentos de detoxificación de la semilla se utilizó para el primer método una diseño trifactorial (tiempo de exposición, temperatura y concentración de NaCO₃) y para el segundo método fue un factorial (horas de exposición solar), los datos obtenidos de este experimento se analizaron por medio del método de Hsu considerando el mejor tratamiento aquel donde se obtuvo una mayor eliminación de ésteres de forbol (como variable respuesta el contenido residual de ésteres de forbol). Los datos del experimento en pollos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) por el método de Dunnett con $P < 0.05$ comparando tratamientos con inclusión de jatrofa respecto al tratamiento control, de acuerdo a lo señalado por Snedecor y Cochran (1967), Se tuvieron como variables respuesta la ganancia de peso promedio diario, índice de conversión (relación entre consumo de alimento y ganancia de peso), contenido de proteína total y albumina, así como la actividad enzimática de ALT y AST (alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa respectivamente) en suero sanguíneo. Para el análisis estadístico fue utilizando el software JMP 5.0.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Detoxificación

Los resultados obtenidos de la aplicación del proceso de detoxificación combinado (tratamiento térmico- químico) se presentan en el Cuadro 4. Al aumentar la concentración de NaCO_3 de 0 a 0.07% se observó una mayor eliminación de ésteres de forbol. Cuando se aplicó la concentración de 0.14 % esta eliminación fue menor respecto a la concentraciones utilizada anteriormente, esto en cuanto a la temperatura de 60 °C a los dos tiempos que se probaron (60 y 120 min). Por su parte a la temperatura de 70 °C las muestras tratadas por 60 min también presentaron la misma tendencia anterior, no así los que fueron expuestos por 120 min, ya que al aplicar estas variables se pudo observar que conforme se aumentó el carbonato la eliminación de los ésteres de forbol fue mayor. Sin embargo, el tratamiento que estadísticamente fue más efectivo en la eliminación de dichos compuestos y que fue el elegido para tratar la semilla que posteriormente se utilizó para caracterizar y evaluar su efecto tóxico residual fue el que correspondía a 60 min, 60 °C y 0.07 % de NaCO_3 con un porcentaje de eliminación de 91%. Este tratamiento fue el propuesto por Martínez Herrera y col. (2006) con algunas modificaciones, estos autores reportaron una eliminación de 95.8% exponiendo la semilla a 121 °C por 25 min y utilizando una concentración de 0.07% de NaCO_3 en etanol acuoso al 90%.

Martínez Herrera y col., (2006), Donlaporn y Worapot (2009), Devappa y col., (2010), reportaron eliminación de ésteres de forbol de 70 al 100 % aunque estos autores utilizaron acetona, metanol, hidróxido de sodio y silica gel como medio para su eliminación. Estos métodos presentan algunos inconvenientes ya que los solventes o compuestos químicos utilizados en estos procesos de detoxificación son de alto riesgo e inadecuados para semillas que se pretendan usar como alimento animal o humano.

Cuadro 4. Contenido de ésteres de forbol en semilla de jatrofa tóxica después de la aplicación del método combinado

Concentración NaCO ₃ (%)	Ésteres de forbol			
	60°C		70 °C	
	60 min	120 min	60 min	120 min
0	0.32 ± 0.01 ^b	0.20 ± 0.01 ^g	0.31 ± 0.02 ^{bc}	0.31 ± 0.02 ^{bc}
0.035	0.28 ± 0.007 ^{de}	0.22 ± 0.007 ^{efg}	0.29 ± 0.01 ^{bcd}	0.28 ± 0.007 ^{de}
0.07	0.14 ± 0.007 ⁱ	0.16 ± 0.001 ^h	0.27 ± 0.007 ^{cde}	0.26 ± 0.007 ^{cd}
0.14	0.29 ± 0.007 ^{bcd}	0.25 ± 0.01 ^{def}	0.41 ± 0.03 ^a	0.23 ± 0.007 ^{efg}

Los valores con letra diferente en presentan diferencia estadística significativa (Hsu, P<0.05)

El segundo método de detoxificación que se probó, mostró un comportamiento definido. Al aumentar la exposición de las semillas a la luz solar, el contenido de ésteres de forbol disminuyó en un 90.6% a las 72 hrs de exposición (Cuadro 5). Si bien esta podría ser una buena alternativa para la detoxificación de semillas de jatrofa tiene algunos inconvenientes. El primero observado fue su carácter organoléptico dado que las semillas que se expusieron a más de 36 h de luz presentaron olores desagradables mismos que podrían relacionarse con la rancidez del aceite que contienen. Sería deseable realizar un análisis nutrimental para saber el efecto de la exposición a la luz.

También sería prudente realizar más pruebas para evaluar si exponer esta semillas a mas de 72 hrs pudiera dar como resultado la eliminación del 100% de los esteres de forbol.

Otra alternativa sería exponer al sol la pasta desengrasada, proveniente de la producción de biodiesel con el fin de observar si el olor desarrollado efectivamente se debe a la presencia del aceite. Según Devappa y col. (2010), la torta residual de la extracción de aceite mezclada con suelo o silica gel y expuesta al sol por 23 y 17 días perdió todo contenido de ésteres de forbol.

Estos autores no indican que la pasta expuesta al sol haya desarrollado

alguna característica indeseable desde el punto de vista sensorial. Por lo anterior es posible pensar que efectivamente, la pasta desengrasada es susceptible a un tratamiento con luz solar para eliminar su efecto tóxico.

Cuadro 5. Contenido de ésteres de forbol en semilla de jatrofa tóxica después de su exposición directa al sol

Tratamiento (h de luz)	Ésteres de forbol (mg/g)	Nivel de detoxificación (%)
12	0.80 ± 0.1 ^a	53.7
24	0.37 ± 0.013 ^b	78.9
36	0.28 ± 0.003 ^{bc}	84.0
48	0.24 ± 0.006 ^{bc}	85.9
60	0.21 ± 0.002 ^{bc}	87.7
72	0.16 ± 0.002 ^c	90.6

Los valores con letra diferente presentan diferencia estadística significativa (Hsu, P<0.05)

6.2 Composición proximal

Como se muestra en el cuadro 6 se encontraron diferencias en el contenido de aceite entre las semillas tóxica y no tóxica (62 y 56.5 % respectivamente) esto concuerda con los rangos reportados por diversos autores como Martínez Herrera y col. (2006), Makkar y col. (1998) y Makkar y col. (1997) quienes al caracterizar semillas procedentes de diversas localidades y países encontraron contenidos de aceite de 55.3 a 57.7%.

Si bien el menor contenido de aceite en la semilla no tóxica, podría en cierto modo, influir en su aceptación para la producción de biocombustible el hecho de no presentar o contener muy bajos niveles de ésteres de forbol hace de ésta una semilla muy atractiva desde el punto de vista de la utilización de los subproductos de la extracción de aceite como buena fuente de proteína para consumo animal o en su caso llegar a ser consumido por humanos (después de pruebas de evaluación toxicológicas). La semilla detoxificada presentó el menor contenido de aceite, debido probablemente a que en el proceso de detoxificación se utilizó un solvente (etanol) que junto con la

aplicación de calor pudo favorecer la eliminación parcial del contenido de aceite presente en la semilla cruda, estas semillas tuvieron una concentración menor en un 16%.

No se encontraron diferencias en el contenido de cenizas entre las tres semillas analizadas, con valores en un rango que va de 4.4 a 4.8 %. Estos datos son similares a los reportados por Martínez Herrera y col. (2006) y Makkar y col. (1998); pero diferentes a lo obtenido por Donlaporn y col. (2011), Donlaporn y Worapot (2010), Donlaporn y Worapot (2009) quienes trabajaron con la torta de jatrofa resultante de la extracción de aceite, dichos autores obtuvieron un mayor porcentaje alrededor de 8% de cenizas.

Cuadro 6. Composición proximal de semilla de jatrofa.

	Tóxica	No Tóxica	Detoxificada
Grasa (%)	62.30 ± 0.18	56.52 ± 0.47	46.03 ± 0.15
Cenizas (%)	4.72 ± 0.35	4.4 ± 0.23	4.75 ± 0.17
Fibra (%)	2.31 ± 0.27	2.16 ± 0.15	2.73 ± 0.04
Proteína (%)	23 ± 0.33	25.38 ± 0.90	36.7 ± 0.62
Carbohidratos (%)	4.03 ± 0.18	6.16 ± 0.14	1.71 ± 0.18

Tampoco se encontraron diferencias en cuanto al contenido de fibra total entre la semilla tóxica y no tóxica, presentando aproximadamente 2.15% en ambas semillas, mientras que la semilla detoxificada presentó mayor contenido de fibra con un 2.7%, estos resultados son similares a lo reportado por Martínez Herrera y col. (2006) y Makkar y col. (1999).

Contrario a lo observado en el contenido de aceite, la semilla no tóxica presentó mayor contenido de proteína (25.3%), respecto a la semilla tóxica que presentó un 23% de proteína mientras que la semilla detoxificada presentó un mayor contenido con 36.7%. El contenido de proteína coincide con lo reportado por Donlaporn y col. (2011), Donlaporn y Worapot (2010), Martínez Herrera y

col. (2010), Donlaporn y Worapot (2009), Devappa y col. (2008), Makkar y col. (1997) quienes obtuvieron de 19 a 27 % de proteína. Se sabe que los factores agronómicos como son el clima, altitud, condiciones del suelo, entre otros contribuyen a la composición química de todas las especies vegetales, en este caso se tienen dos semillas con diferente origen y con condiciones agronómicas completamente diferente, por lo tanto, podría atribuirse a estos las variaciones entre ambas semillas.

6.3 Contenido de minerales y digestibilidad de proteína

En el análisis de minerales se presentó un dato curioso, esto ya que al detoxificar la semilla (tóxica) mejoró su contenido de zinc con 9 ppm, siendo esta semilla la que presentó el mayor contenido de este mineral, mientras que entre la semilla tóxica y no tóxica, la segunda fue mayor a la primera siendo la no tóxica más rica en zinc. Por su parte en el contenido de hierro no se encontraron diferencias entre las tres semillas analizadas, teniendo entre 56 y 62 ppm de este mineral (Cuadro 7).

Cuadro 7. Contenido de hierro, zinc y digestibilidad de proteína en semillas de jatrofa

	Tóxica	No Tóxica	Detoxificada
Hierro (ppm)	57.15 ± 0.78	56.35 ± 1.9	62.05 ± 3.75
Zinc (ppm)	35.45 ± 0.21	39.6 ± 0.28	44.85 ± 0.78
Digestibilidad de proteína <i>in vitro</i> (%)	76.61 ± 1.29	71.94 ± 0.34	78.65 ± 0.57

La digestibilidad de proteína *in vitro* fue menor para la semilla no tóxica (71.94%), respecto a la semilla tóxica que presentó una digestibilidad de 76.6%. La semilla detoxificada presentó un ligero aumento en su digestibilidad teniendo 78.65%, lo que se pudiera atribuir al proceso de detoxificación en el cual se aplicó un calentamiento el cual favorece el desdoblamiento de las estructuras proteicas, si bien aumentó no fue significativamente diferente a la

presentada por su fuente (jatrofa tóxica). Los resultados obtenidos en la prueba de digestibilidad proteica coincidieron con lo obtenido por Martínez Herrera y col., (2006) quienes reportaron una digestibilidad de 78.6-80.6 % en semilla previamente desgrasada.

6.4 Contenido de antinutrientes

No se encontraron diferencias en el contenido de ácido fítico entre las semillas tóxica y no tóxica pero si en comparación con la semilla detoxificada la cual presentó un menor contenido (Cuadro 8). Los niveles de ácido fítico en semilla sin procesar coinciden con los reportados por Makkar y col., (1998), quienes reportaron entre 8.4 y 10.7% para jatrofa, pero se observaron valores menores a los reportados por Azzaz y col. (2011) quienes reportaron contenidos de ácido fítico superiores al 15% para esta semilla. De cualquier forma se considera que el contenido de este compuesto es muy elevado puesto que en otras semillas como es el caso de la soya se tienen niveles de 1.5% aún cuando es considerada como la oleaginosa comestible con mayor contenido de ácido fítico.

Cuadro 8. Contenido de factores antinutricionales en semillas de jatrofa

	Tóxica	No Tóxica	Detoxificada
Acido Fítico (mg/g)	10.23 ± 1.43	11.2 ± 0.32	5.66 ± 0.32
Curcina (mg/g)	3.92 ± 0.01	3.06 ± 0.30	1.76 ± 0.23
Inhibidores de Tripsina (UTI/g)	25.12 ± 0.6	21.32 ± 0.42	3.01 ± 0.27

La semilla tóxica presentó el mayor contenido de inhibidores de proteasa y curcina con 25.12 UTI/g y 3.92 mg/g, respectivamente. Por su parte en semilla detoxificada se observó que el tratamiento térmico contribuyó a la disminución significativa de curcina e inhibidores de tripsina, siendo más notorio el decremento del contenido de inhibidores, los cuales fueron eliminados alrededor del 86%. Sin embargo, el nivel de curcina e inhibidores de tripsina reportados por otros autores fueron de 0.8 y 1.33 UTI/g,

respectivamente, para jatrofa detoxificada, utilizando tratamientos de detoxificación similar al utilizado en este trabajo Abou-Arab y Abu-Salem (2010) y Azzaz y col., (2011).

6.5 Composición Fenólica y capacidad antioxidante

El contenido de taninos y fenoles totales no presentaron diferencias entre la semilla tóxica y la no tóxica (Cuadro 9). Con respecto a la semilla detoxificada, el contenido de fenoles se vio afectado por la aplicación de tratamiento térmico. Por otro lado, la capacidad antioxidante se vio afectada en menor grado entre las muestras. Según los reportes que se tienen del contenido de fenoles totales y taninos los resultados obtenidos no concuerdan con estos, Makkar y col., (1998) reportaron 20 mg/100g de fenoles y 40 mg/100g de taninos; En este estudio se encontró un mayor contenido de fenoles pero un menor contenido de taninos. No se tienen reportes de la capacidad antioxidante que presentan las semillas de jatrofa, en este estudio se observaron 10.46, 9.17 y 9.1 mg ET/100g en semilla tóxica, no tóxica y detoxificada respectivamente.

Cuadro 9. Composición fenólica y capacidad antioxidante en semilla de jatrofa

	Tóxica	No Tóxica	Detoxificada
Fenoles Totales (mg EAG/100g)	22.8 ± 0.11	23.8 ± 0.21	6.9 ± 0.71
Taninos (mg EQ/100g)	31.1 ± 2.41	35.3 ± 2.41	28.2 ± 2.79
Capacidad antioxidante (mg ET/100g)	10.5 ± 0.32	9.2 ± 0.27	9.1 ± 0.24

Los compuestos fenólicos son los antioxidantes más abundantes en nuestra dieta (Manach y col., 2004). Además estas propiedades, pueden tener otras actividades biológicas específicas que afectan o facilitan la expresión de genes (Yuan y col., 2005), señalización celular (Wheeler y col., 2004) y la adhesión celular, presentando además un importante efecto quimioprotector (Williams y col., 2004). No se tienen reportes del contenido de ácidos fenólicos en semillas de jatrofa. Se detectaron seis ácidos fenólicos: protocatecuico,

benzoico, sinápico, siríngico vanílico y cumárico. También se detecto la vainillina y la epicatequina. Sin embargo, la detección se dio en forma diferencial. Por ejemplo, en la semilla de jatropa tóxica solo se detectaron los ácidos protocatecuico, benzoico y sinápico y la epicatequina (Cuadro 10). Mientras que en la jatropa no tóxica se detectaron todos los compuestos fenólicos simples con excepción del ácido vanílico.

En la muestra detoxificada se detectaron cuatro de los ocho identificados (Cuadro 10). Con respecto al nivel presente, la epicatequina fue el compuesto fenólico simple mayoritario seguido por el ácido vanílico. El ácido siríngico se encontró en concentraciones importantes en la semilla no tóxica y detoxificada. El contenido de ácido benzoico en todas las semillas analizadas fue igual, por otro lado no se encontró epicatequina ni ácido sinápico en semilla detoxificada. En cuanto al ácido sinápico se observó que la semilla tóxica presento el doble del contenido comparado con la semilla no tóxica. No se detecto ácido siríngico en la semilla tóxica.

Cuadro 10. Contenido de compuestos fenólicos simples (mg/100g) en semilla de jatropa

	Tóxica	No Tóxica	Detoxificada
Protocatecuico	22 ± 0.05	18 ± 0.6	3.5 ± 0.03
Benzoico	92 ± 10	69 ± 18	80 ± 20
Sinápico	10 ± 1	5 ± 1	Nd
Siríngico	Nd	67 ± 5	30 ± 3
Vanílico	Nd	Nd	8.3 ± 0.9
Cumárico	Nd	8.9 ± 0.9	Nd
Epicatequina	130 ± 19	157 ± 7	Nd
Vainillina	Nd	1.4 ± 0.1	Nd

Nd = no detectado

6.6 Compuestos Tóxicos

En el análisis de compuestos tóxicos presentes en semilla de jatrofa considerada como ecotipo tóxico fue similar a lo reportado por Devappa y col., (2010), Martínez Herrera y col., (2006) y Makkar y col., (1998). Para el ecotipo no tóxico el contenido de forboles fue de 0.11 mg/g coincidiendo con Makkar y col., (1998), aunque difiere de lo reportado por Martínez Herrera y col., (2010) y Martínez y col., (2006) quienes no detectaron la presencia de ésteres de forbol en varias semillas de jatrofa provenientes de diversas comunidades los estados de Puebla y Veracruz. Por otro lado, para la semilla detoxificada se observó que estos compuestos disminuyeron un 90.6%.

Cuadro 11. Contenido de ésteres de forbol en semilla de jatrofa

	Tóxica	No Tóxica	Detoxificada
Ésteres de Forbol (μ g)	1.74 \pm 0.17	0.11 \pm 0.008	0.16 \pm 0.01

f- mg equivalentes de forbol 12-miristato-13 acetato

Algo muy importante en el análisis del contenido de esterés de forbol fue que se observó diferencias importantes entre la semilla tóxica, no tóxica y detoxificada ya que en la primera se detectaron cinco picos entre los 8 y 13 minutos, la no tóxica solo un pico alrededor del minuto 8.8 y la detoxificada dos picos uno al minuto 9.5 y el otro al 12.2 (Figura 7).

Aunque sería necesario realizar análisis posteriores el hecho de que la semilla no tóxica solo presente un pico y que sea diferente a los de la semilla detoxificada podría sugiere que él o los ésteres que se detectan al minuto 8.8 tienen baja o nula toxicidad.

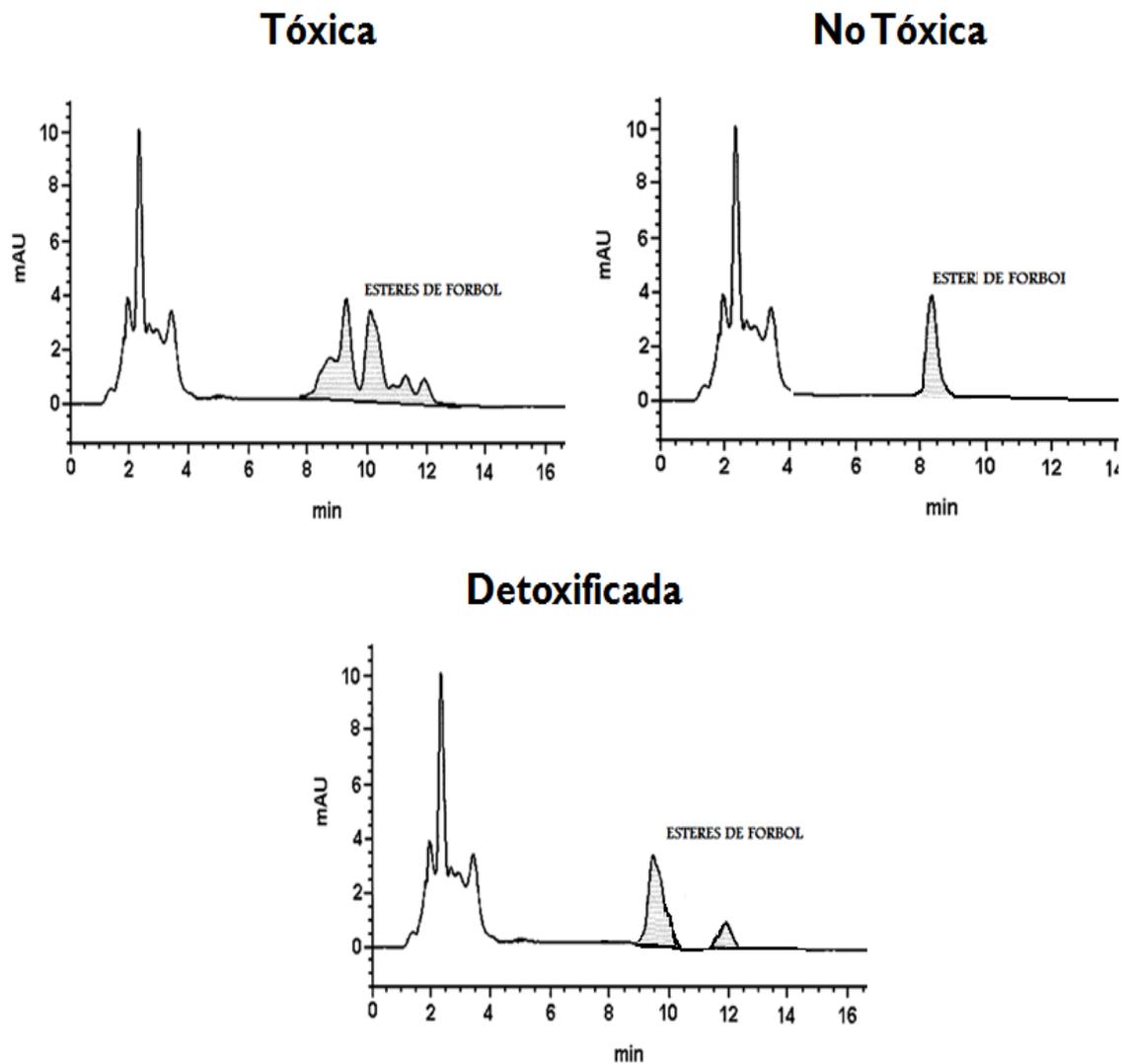


Figura 7. Cromatogramas HPLC de ésteres de forbol en semillas de Jatrofa.

6.7 Evaluación nutricional y toxica de la semilla de jatrofa en pollos de engorda

Para la prueba del efecto residual en pollos de engorda se utilizaron semillas tóxica, no tóxicas y detoxificada con un contenido de ésteres de forbol de 1.74, 0.11 y 0.164 mg/g de semilla, respectivamente. Estas semillas se mezclaron con alimento comercial (en relación 1:9) y se utilizó como testigo un alimento comercial sin adición de semilla. Los resultados de esta prueba demuestra la alta toxicidad de las semillas de jatrofa (ecotipo tóxico), ya que los tratamientos a los que se administro la semilla tóxica y detoxificada presentaron

un alto porcentaje de mortalidad en las primeras semanas, para la semana dos se eliminaron el 100% de las aves expuestas al tratamiento tóxico y para la cuarta se sacrificaron las últimas aves que correspondían al tratamiento con jatrofa detoxificada. Si bien los síntomas que presentaron las aves alimentadas con jatrofa detoxificada fueron mucho menos severos que las de jatrofa tóxica los efectos fueron muy similares, mientras que en el tratamiento con semilla no tóxica no se presentaron signos de intoxicación.

6.7.1 Hallazgos clínicos

Los principales síntomas de intoxicación que se presentaron fueron somnolencia, letargo, ataxia, polipnea, diarrea constante, fiebre (plumas erizadas), pérdida de apetito, postración, baja coloración y resequead en patas y daño neurológico (mostrando algunos ataques). En la Figura 8 se observan algunos de estos síntomas, en a) se puede ver la somnolencia y letargo, en b) se observa claramente las plumas desmedradas, además de que se muestra la postración decúbito lateral que presentaban los animales en sus ataques de convulsiones que se llegaron a mostrar en este grupo de animales intoxicados de una manera constante y en c) se observa además del estado de somnolencia de los pollos un emplastamiento del excremento como producto de la diarrea que presentaron las aves intoxicadas en la región de la cloaca. Estos signos se presentaron solo en los tratamientos con jatrofa tóxica y detoxificada, con mayor énfasis en el tratamiento T₂ (con jatrofa tóxica).



Figura 8. Representación de síntomas presentados por tratamiento con jatrofa tóxica y detoxificada

6.7.2 Parámetros Bioquímicos

6.7.2.1 Proteína total y albúmina

Los parámetros bioquímicos examinados en suero sanguíneo, son muy importantes ya que al presentar diferencias de estos con respecto al tratamiento control, se toma como una anormalidad principalmente relacionada con el mal funcionamiento de dos órganos de vital importancia como lo son el hígado y riñón. En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas del contenido de proteínas totales en los tratamientos estudiados respecto al control en la segunda semana (día 14) (Cuadro 12), pero si se observaron diferencias en el nivel de albumina por parte de los tratamientos T₂ (con jatrofa tóxica) y T₄ (con jatrofa detoxificada), los cuales presentaron un menor contenido de ésta, lo que podría tomarse como indicativo principalmente de mal nutrición en las unidades experimentales que comprenden ambos grupos así como un mal funcionamiento hepático en los mismos.

Cuadro 12. Contenido de proteína total y albúmina en suero sanguíneo de pollos sacrificados después de dos semanas de tratamiento

Tratamiento	Proteína Total (g/dL)	Albumina (g/dL)
T ₁	3.7 ± 0.4 ^a	1.34 ± 0.01 ^a
T ₂	4.8 ± 0.4 ^a	0.74 ± 0.15 ^b
T ₃	3.7 ± 0.1 ^a	1.30 ± 0.16 ^a
T ₄	4.0 ± 0.8 ^a	0.70 ± 0.21 ^b

Los valores con letra diferente entre renglones presentan diferencia estadística significativa (Dunnett, P<0.05)

Como se puede observar en el Cuadro 13 tanto en la semana cuatro (28 días) como al final del experimento (semana 6) no se encontraron diferencias en el contenido de proteína total y albumina entre los tratamientos analizados a su respectivo tiempo. Si bien se esperaba que a la cuarta semana el tratamiento con jatrofa detoxificada (T₄) presentara alguna anormalidad dado que en su deterioro y mortalidad fue muy elevada no fue así ya que las aves

que se sacrificaron en esta semana no presentaron variaciones en el contenido de proteínas.

Cuadro 13. Contenido de proteína total y albumina en suero sanguíneo de pollos sacrificados después de cuatro y seis semanas de tratamiento

Tratamiento	Semana cuatro (28 días)		Semana seis (42 días)	
	Proteína (g/dL)	Total Albumina (g/dL)	Proteína (g/dL)	Total Albumina (g/dL)
T ₁	5.3 ± 1.2 ^a	1.4 ± 0.14 ^a	5.7 ± 0.1 ^a	1.53 ± 0.1 ^a
T ₃	5.4 ± 0.2 ^a	1.3 ± 0.18 ^a	5.1 ± 0.6 ^a	1.47 ± 0.1 ^a
T ₄	5.7 ± 0.4 ^a	1.1 ± 0.23 ^a	-----	-----

Los valores con letra diferente entre renglones presentan diferencia estadística significativa (Dunnett, P<0.05)

6.7.2.2 Actividad de enzimas ALT y AST

En pollos de engorda se han reportado niveles anormales de ALT (alanina amino transferasa) y AST (aspartato amino transferasa) los cuales han sido considerados indicadores de daño o disfunción hepatocelular (Kubena y col., 1998). Si bien no existen reportes del efecto de ésteres de forbol sobre la actividad de estas dos enzimas, si pueden relacionarse con lo publicado por El-Badawi y col., (1992) quien reportó un daño severo en hígado al evaluar el efecto de la administración de semilla de jatrofa con sonda gástrica en pollos marrones.

En este trabajo se observó que la actividad de la ALT no presentó diferencias estadísticas entre los tratamientos T₃ y T₄ respecto al control (T₁), mientras que el tratamiento tóxico (T₂) fue estadísticamente diferente presentando una actividad mayor. Estos datos coinciden con lo reportado por Landeros y col (2008), pero son diferentes a los obtenidos por Arrieta-Mendoza y col. (2007) quienes encontraron 4.97 u/L, cabe resaltar que estos datos son de experimentos con algunas otras toxinas y no con ésteres de forbol

lo que podría ser la razón de dichas diferencias, ya que hasta el momento no se tienen reportes de estos parámetros en experimentos con pollos.

Por su parte la actividad de AST tampoco mostró diferencias entre los tratamientos T₃ y T₄ pero si fue diferente el tratamiento T₂, el cual presentó valores mayores comparados con el control (T₁) con una concentración de 181 u/L. Los valores de AST también fueron similares a los encontrados por Landeros y col (2008). Según la alta actividad de las enzimas hepáticas (ALT y AST) encontrada en el tratamiento tóxico, sugiere que los ésteres de forbol presentes en semillas de jatrofa del ecotipo tóxico tuvieron un efecto tóxico sobre la función hepática en pollos de engorda, pudiendo ser esta la principal razón por la cual las unidades experimentales de este grupo solo sobrevivieron hasta la segunda semana del experimento, esto fue comprobado con las necropsias realizadas a estas aves ya que presentaron daño hepático visible.

Cuadro 14. Actividad enzimática de ALT y AST en suero sanguíneo de pollos sacrificados después de dos semanas de tratamiento

Tratamiento	ALT (u/L)	AST (u/L)
T ₁	17 ± 2 ^b	121.3 ± 13.5 ^b
T ₂	35 ± 13.1 ^a	181 ± 1 ^a
T ₃	15 ± 1.7 ^b	117.7 ± 15.8 ^b
T ₄	17 ± 3 ^b	118 ± 26.7 ^b

Los valores con letra diferente entre renglones presentan diferencia estadística significativa (Dunnett, P<0.05)

En el Cuadro 15 se muestran los resultados bioquímicos a la semana cuatro (28 días) en los cuales no se encontraron diferencias significativas en ningunos de los parámetros bioquímicos analizados en suero sanguíneo entre los tratamientos control, no tóxico y detoxificado (T₁, T₃ y T₄ respectivamente). Teniendo valores muy similares a los reportados por Landeros y col., (2008) al mismo tiempo de experimentación. Si bien se esperaba que los pollos pertenecientes al tratamiento con jatrofa detoxificada presentaran anomalías esto no observó, aunque si se pudieron observar diferencias

muy marcadas en los parámetros productivos así como en los resultados de las necropsias correspondientes.

Cuadro 15. Actividad enzimática de ALT y AST en suero sanguíneo de pollos sacrificados después de cuatro semanas de tratamiento

Tratamiento	ALT (u/L)	AST (u/L)
T ₁	12.7 ± 3.5 ^a	131.6 ± 9.7 ^a
T ₃	12.7 ± 2.1 ^a	130.8 ± 4.2 ^a
T ₄	15.0 ± 2.6 ^a	121.2 ± 22.2 ^a

Los valores con letra diferente entre renglones presentan diferencia estadística significativa (Dunnett, P<0.05)

Como se observa en el Cuadro 16 la actividad de ALT no fue diferente entre los dos tratamientos que pudieron ser evaluados, sin embargo, en la actividad de la enzima AST, la cual fue mayor para el tratamiento T₃ correspondiente al suplementado con jatrofa no tóxica, esto podría sugerir un daño hepático. En los resultados del análisis histopatológico se comprobó que no se tenía dicha alteración.

Cuadro 16. Actividad enzimática de ALT y AST en suero sanguíneo de pollos sacrificados después de seis semanas de tratamiento

Tratamiento	ALT (u/L)	AST (u/L)
T ₁	12.7 ± 1.5 ^a	149 ± 7 ^b
T ₃	13.7 ± 5.1 ^a	177 ± 7 ^a

Los valores con letra diferente entre renglones presentan diferencia estadística significativa (Dunnett, P<0.05)

6.7.3 Parámetros productivos

6.7.3.1 Peso promedio

En el peso promedio que presentaron los pollos de engorda se observaron dos comportamientos (Figura 8), uno el mostrado por los tratamientos control y no tóxico (T₁ y T₃) el cual pudo ser monitoreado a lo largo

de las seis semanas de estudio y uno más el cual estuvo compuesto por los tratamientos T₂ y T₄ (tóxico y detoxificado) mismos que solo se pudieron cuantificarse a lo largo de 2 semanas para el tratamiento tóxico y 4 semanas para el suplementado con jatrofa detoxificada. Se pudo observar que la jatrofa considerada como no tóxica mostró buenos resultados al no tener diferencia estadística con el grupo control referente a su peso. Por su parte los tratamientos tóxico y detoxificado no mostraron un crecimiento normal debido a que su consumo de alimento fue mínimo, si bien los expuestos a jatrofa detoxificada tuvieron una mayor resistencia al efecto tóxico severo que los ésteres de forbol produjeron en los pollos, no aumentaron de peso, como se observa los pollos del tratamiento con jatrofa detoxificada tuvieron un peso promedio de 340 g para la semana cuatro lo que equivale una tercera parte del peso promedio presentado por el tratamiento control.

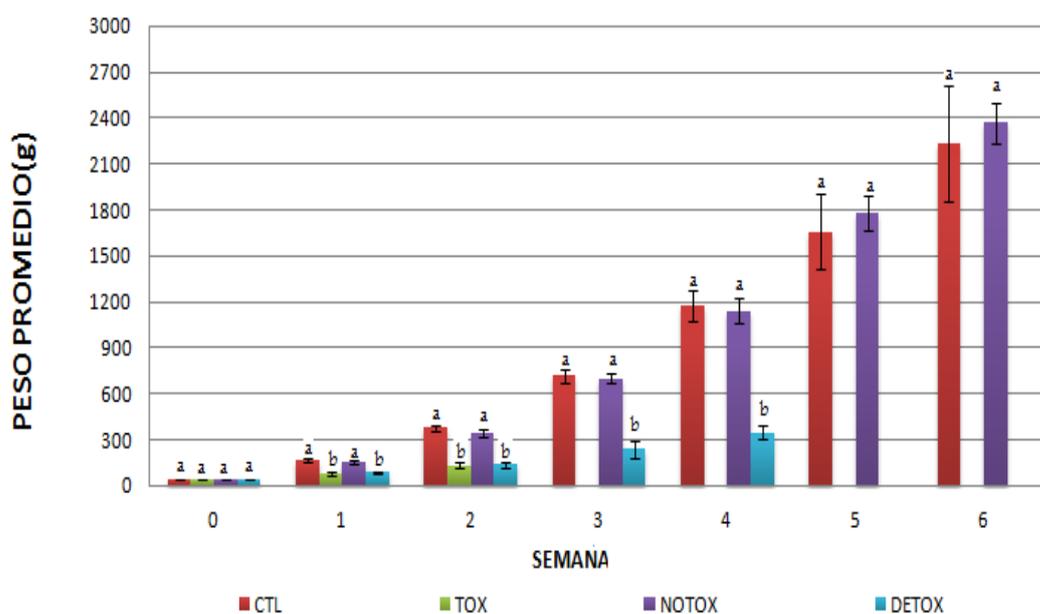


Figura 9. Peso promedio de pollos de engorda durante las seis semanas de tratamiento

(Los valores con letra diferente presentan diferencia estadística significativa (Dunnett, P<0.05))

6.7.3.2 Conversión, ganancia diaria de peso y eficiencia alimentaria

Se observaron a lo largo del experimento dos tendencias sobre los parámetros productivos (ganancia de peso, índice de conversión e índice

productivo) presentados por los tratamiento se dividió en dos partes separando así ambas tendencias. Con respecto a los tratamientos control y no tóxico no se encontraron diferencias significativas entre ellos, aunque en general se pudo observar una menor variación en el tratamiento con jatropa no tóxica (T₃).

Cuadro 17. Parámetros productivos presentados por pollos de engorda alimentados con los tratamientos control y no tóxico durante el tratamiento

Tratamiento	Ganancia Peso Diario (g)	Índice Conversión	Índice Productivo
T ₁	48.9 ± 11.98 ^a	1.30 ± 0.29 ^a	347.80 ± 164.92 ^a
T ₃	48.7 ± 0.99 ^a	1.43 ± 0.02 ^a	317.63 ± 24.46 ^a

Los valores con letra diferente entre renglones presentan diferencia estadística significativa (Dunnnett, P<0.05)

Entre los tratamientos tóxico y detoxificada (T₂ y T₄ respectivamente) en los cuales solo pudieron ser cuantificados dos de los tres parámetros productivos (ganancia de peso diario e índice productivo) se pudo observar que el consumo de alimento por parte de las unidades experimentales fue mínimo y en el caso de los expuestos a jatropa tóxica prácticamente nulo lo que comprueba claramente que uno de los efectos de los ésteres de forbol presentes en esta semilla es la inhibición del apetito así como la disminución del consumo de agua. Lo anterior fue reportado también para cabras por Adam (1974) y por El-Badawi y col., (1992) quien administro a la fuerza semilla de jatropa en pollos marrones.

Aunque en este experimento solo pudieron ser cuantificados a la semana dos en el caso de T₂ (jatropa tóxica) y a las cuatro semanas para T₄ (detoxificada). Se observaron diferencias significativas en estos parámetros, el consumo de alimento por parte de los pollos pertenecientes al tratamiento con jatropa tratada fue mayor que el de jatropa sin tratar.

Cuadro 18. Parámetros productivos presentados por pollos de engorda alimentados con el tratamiento tóxico y detoxificado durante dos y cuatro semanas de tratamiento respectivamente

Tratamiento	Ganancia Peso Diario (g)	Índice Productivo
T ₂	0.92 ± 0.65 ^b	0.49 ± 0.11 ^b
T ₄	3.21 ± 0.27 ^a	5.78 ± 2.4 ^a

Los valores con letra diferente entre renglones presentan diferencia estadística significativa (Dunnett, P<0.05)

6.7.4 Hallazgos a la necropsia

Como resultado de las necropsias practicadas durante el experimento a las aves tanto sacrificadas como a aquellas que murieron por efecto del tratamiento, se pudieron encontrar diversos daños visibles tanto en las unidades pertenecientes al tratamiento T₂ (tóxico) como al T₄ (detoxificada), siendo mucho más evidente en el tóxico.

Desde la primera semana de experimento a las aves que murieron a causa del tratamiento T₂ se les realizó necropsia encontrando principalmente lesión hepática e infección del saco vitelino. Al sacrificar a los 15 días el restante de aves expuestas a jatrofa tóxica se observaron diversos hallazgos entre los más comunes fueron peritonitis, pericarditis y perihepatitis fibrinopurulenta, deshidratación, diarreas, nefromegalia, uratosis, degeneración grasa del parénquima hepático y edema pulmonar. En el primer sacrificio (15 días de vida) no se observaron lesiones en las aves del tratamiento con jatrofa detoxificada (T₄). A los 21 días se encontraron lesiones hepáticas moderadas y ascitis, edema pulmonar, pericarditis fibrinopurulenta, pericarditis fibrinopurulenta, aerosaculitis e infección del saco vitelino, nefromegalia, uratosis y degeneración grasa del parénquima hepático.

Como se muestra en las Figura 10 se encontraron manchas amarillas en hígado lo que indica un daño a nivel celular, coloración anormal en patas,

ulceraciones en molleja y hemorragia en diversos órganos entre otras. Algunos de estos signos concuerdan con lo reportado con Badawi y col., (1992) quienes administraron con sonda gástrica semilla de jatrofa a pollos marrones.



Figura 10. Anormalidades presentadas por los tratamientos T₂ y T₄. (Con jatrofa tóxica y detoxificada respectivamente)

- a) Hemorragias internas, b) Daño hepático, c) Ulceración en molleja, d) Cambio de coloración en patas.

6.7.5 Hallazgos de la histopatología

En la histopatología realizada no se encontraron diferencias entre los cortes que se realizaron a órganos de pollos pertenecientes a los tratamientos control y con jatrofa no tóxica y lo mismo ocurrió entre los tratamientos con jatrofa tóxica y detoxificada. Es por ello que solo se presentan los pertenecientes a los tratamientos control y jatrofa tóxica, que fue donde se observaron claramente anormalidades. En la Figura 11 se puede observar un corte de hígado de un ave del tratamiento control (a) en la cual se observa la vena central localizando en el centro cada lobulillo. En la b) se tiene un corte de Hígado de T₂ en él se encontró un foco con necrosis coagulativa, es posible distinguir el contorno de las células, se conserva la arquitectura tisular, por lo que se reconoce el órgano, pero se pierde el detalle celular. Por su parte en la imagen (c) se observa con mayor claridad que los núcleos presentan cambios (picnosis, cariorrexis o cariólisis) y el citoplasma es intensamente eosinofílico.

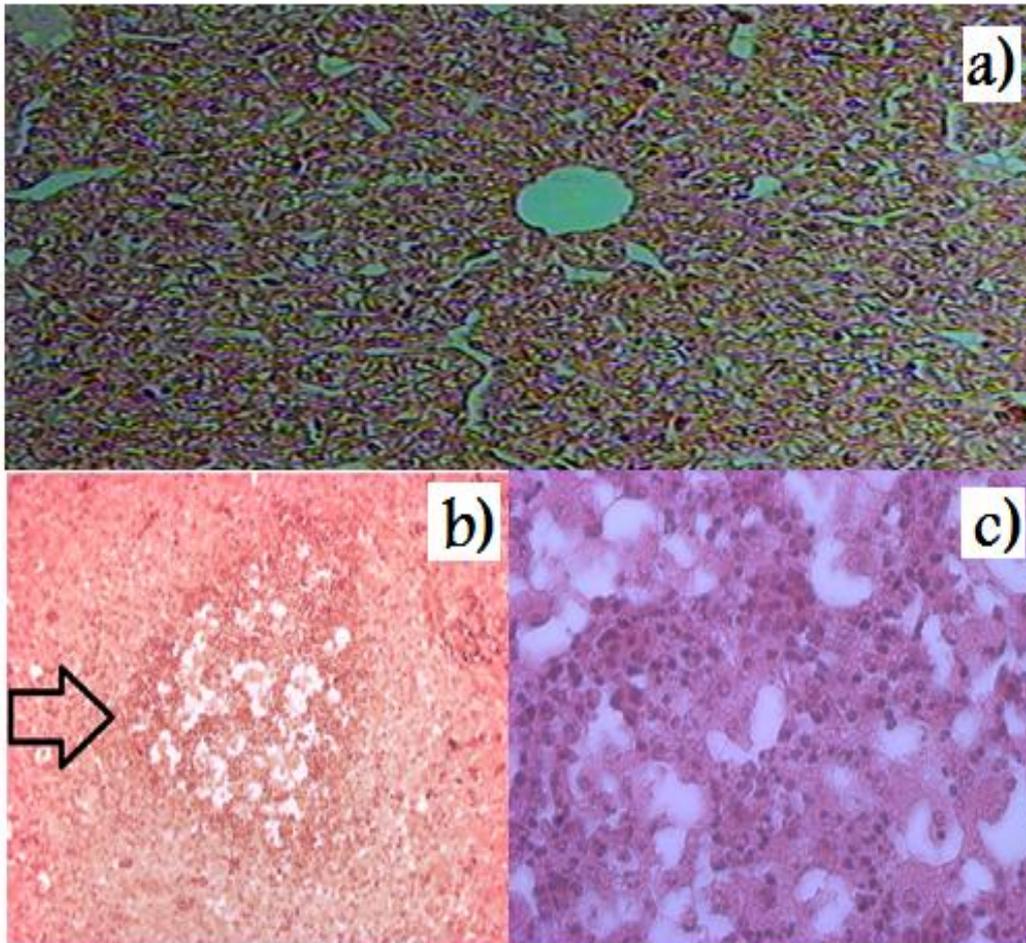


Figura 11. Cortes de Hígado de pollos de tratamiento control y tóxico
 a) Hígado de aves del grupo control (T_1), b) Foco necrótico en un ave de T_2
 (10x), c) Foco necrótico en un ave de T_2 (40 x)

En la figura 12 se muestran cortes de riñón, en la toma a) se observan íntegros los túbulos contorneados distales, estructura típica de un riñón sano. En la b) el epitelio tubular se impregna de sales de calcio, la albúmina se condensa en cilindros y se carga de calcio excretado. Se observa material de coloración basófila. Por su parte en la c) nótese en las flechas la disminución del calibre del lumen de los túbulos, las células aparecen tumefactas y con aspecto granular del citoplasma.

Por su parte la toma d) nos muestra las células tubulares con degeneración la cual fue marcada con la letra (a) y se presenta infiltración intersticial por mocitos, células plasmáticas y linfocitos marcadas con la letra

(b). Al ampliar el campo de visión se pudo observar la infiltración de monocitos, células plasmáticas y linfocitos la cual está señalada por la flecha en la toma e). Mientras que en la toma F) se observa la hiperplasia de células caliciformes que lleva a un exceso de producción de moco por las células renales.

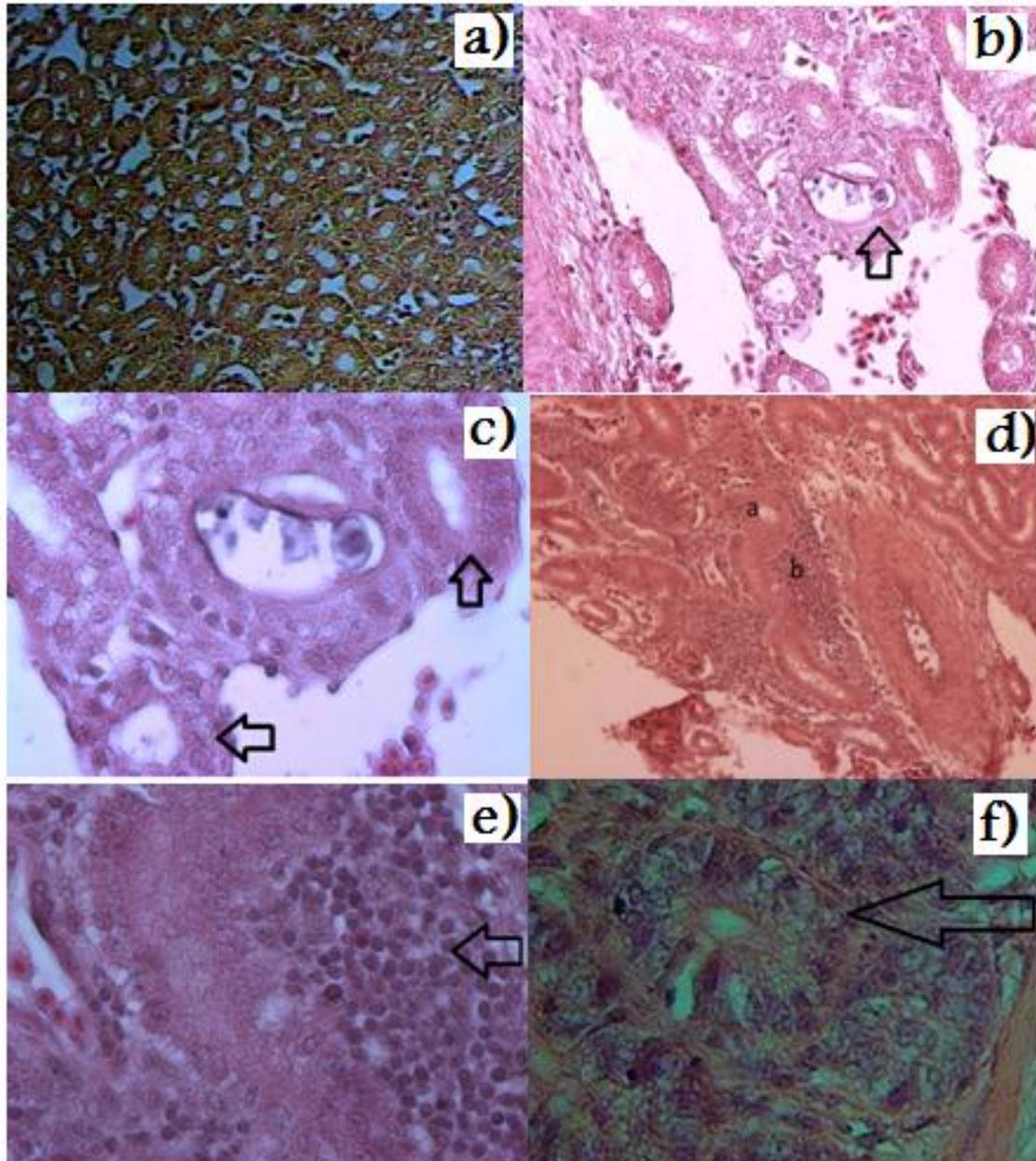


Figura 12. Cortes de Riñón de Pollos de tratamiento control y Tóxico
a) Riñón grupo control. b) Nefrocalcinosis en un ave de T₂. c) Tubulonefrosis en un ave de T₂. d) Nefritis intersticial no supurativa en un ave de T₂ e) Nefritis intersticial no supurativa en un ave de T₂ f) Hiperplasia de células caliciformes en aves de T₂.

VII. CONCLUSIONES

- Los métodos de detoxificación resultaron poco eficientes, ya que no se logro eliminar en su totalidad el contenido de ésteres de forbol en jatrofa tóxica. Se eliminó 91% del contenido de ésteres de forbol con el método combinado (exposición a solución de NaCO₃ al 0.07% en alcohol al 90% por 120 minutos).
- El proceso de detoxificación favoreció la disminución de factores antinutricionales presentes en semilla de jatrofa tóxica.
- Se encontró en semilla de jatrofa no tóxica baja concentración de ésteres de forbol (0.11 mg/g). El nivel de la semilla tóxica fue muy superior teniendo 1.74 mg/g. Por su parte la semilla detoxificada presentó 0.16 mg/g.
- La semilla de jatrofa tóxica resultó ser altamente dañina, los pollos expuestos a su consumo tuvieron un 100% de mortalidad en las primeras dos semanas de experimento.
- El residuo de ésteres de forbol contenido en semilla de jatrofa detoxificada fue suficiente para causar efecto tóxico en pollos de engorda, las unidades experimentales del tratamiento suplementado con dicha semilla sobrevivieron sólo 28 días (cuatro semanas).
- El índice de conversión, índice de productividad y ganancia de peso diaria en pollos de engorda se vieron afectados por la semilla tóxica y detoxificada. En los pollos de dichos tratamientos la ganancia de peso fue mínima y por ende los índices de conversión y de productividad fueron muy bajos.

- Se presentaron diferentes signos de intoxicación principalmente pérdida de apetito, postración, diarrea, baja coloración y resequedad en patas, ataxia y daño neurológico.
- El daño hepático en las aves de los tratamientos con semilla tóxica y detoxificada fue evidente, tanto en las necropsias como en la medición de enzimas relacionadas con el funcionamiento de dicho órgano.
- Se encontraron diversos efectos tóxicos entre los que destacan el engrosamiento de intestinos, edemas, inflamación de esófago, hemorragias internas y ulceraciones en molleja en los tratamientos tóxico y detoxificado aunque fueron más severos en el suplementado con semilla tóxica.
- En las aves expuestas a jatrofa tóxica se encontraron daños celulares (tumefactas y con aspecto granular del citoplasma) en hígado y riñón.
- La semilla no tóxica resultó un buen suplemento en la alimentación de los pollos de engorda, no se encontraron efectos adversos y sus parámetros productivos no presentaron diferencias respecto al grupo control.

VIII. REFERENCIAS

- Abou-Arab**, A.A.; Abu-Salem, F.M. (2010). Nutritional quality of *Jatropha curcas* seeds and effect of some physical and chemical treatments on their anti-nutritional factors. *Afr. J. Food Sci.*, 4:93–103.
- Achten** WMJ, Verchot L, Franken YJ, Mathijs E, Singh VP, Aerts R, (2008). *Jatropha curcas* bio-diesel production and use. *Biomass Bioenergy* 32:1063-1084.
- Adam**, S. E. I. (1974) Toxic effects of *Jatropha curcas* in mice. *Toxicology* 2: 67-76.
- Adam**, S. E., and Magzoub, M. (1975). Toxicity of *Jatropha curcas* for goats. *Toxicology* 4:347–354.
- Anton**, A. and J. Lizaso. 2001. PCBs y Dioxinas. Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria 255, Inscripción 1º, tomo XXX: 1-25. Madrid. España.pp.5.
- AOAC**. (1990). Official Methods of Analysis, 14th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA, USA.
- Aregheore** E. M., Makkar H.P.S., Becker K. (1997). Assessment of lectin activity in toxic and a non-toxic variety of *Jatropha curcas* using latex agglutination and hemagglutination methods and inactivation of lectin by heat treatments. *J Sci Food Agric* 77:349-352.
- Aregheore**, E.M., Makkar, H.P.S., Becker, K., (1998). Assessment of lectin activity in a toxic and non-toxic variety of *Jatropha curcas* using latex agglutination and hemagglutination methods and inactivation of lectin by heat treatments. *J. Sci. Food Agri.* 77:349–352.
- Aregheore**, E. M.; Becker, K.; Makkar, H. P. S. (2003) Detoxification of a toxic variety of *Jatropha curcas* using heat and chemical treatments and preliminary nutritional evaluation with rats. *S. Pac. J. Nat. Sci.* 21:50–56.
- Arrieta Mendoza** D., Pérez Arévalo M.L., Luengo A., Hernández J.P., Lista Alves D., Mosquera J. (2007). Alteraciones histológicas hepáticas e incremento de proteína séricas en pollos de engorde alimentados con dietas suplementadas con *Saccharomyces cerevisiae*. *Investigación Clínica*, 48: 431-443.

- Azzaz** Nabil A.E., El-Nisr N.A., Elsharkawy E. E. and Elmotleb E. A. (2011) Chemical and pathological evaluation of *Jatropha curcas* seed meal toxicity with or without heat and chemical treatment. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 5(12): 49-59.
- Becker** K. y Makkar, H.P.S. (2009). *Jatropha curcas*: A potential source for tomorrow's oil and biodiesel. Lipid Technology, 20:104-107.
- Becker** y Makkar (2009a).by means of the Biuret reaction. Journal of Biological Chemistry, 177: 751–766.
- Coello**, J y Gnecco, M. (2000). El Biodiesel y sus implicaciones comerciales. <http://www.itdg.org.pe/td/pdf/biodiesel.pdf>
- Cultivos** Energéticos S.R.L. (2007). Ficha técnica de la *Jatropha curcas* L.www.elsitioagricola.com/articulos/cultivosEnergeticos/Jatropha%20Curcas%20Ficha%20Tecnica.asp.
- De Lange**, C., Nyachoti, C. y Verstegen, M. (2000). The significance of antinutritional factors in feedstuffs for monogastric animals. Feed Evaluation Principles and Practice. Amstelveen, Holanda. Wageningen Pers. Pp. 169 – 188.
- Deshpande** S. S. y Cheryan M. (1985). Evaluation of vanillin assay for tannin analysis of dry beans. J. Food Sci. 50, pp. 905-916.
- Devappa** R. K., Darukeshwara, J., Rathina Raj, K., Narasimhamurthy, K., Saibaba, P., Bhagya, S., (2008). Toxicity studies of detoxified *Jatropha* meal (*Jatropha curcas*) in rats. Food Chem. Toxicology. 46: 3621–3625.
- Devappa**, R. K., Maes, J., Makkar, H. P. S., De Greyt, W., and Becker, K. (2009a). Isolation of phorbol esters from *Jatropha curcas* oil and quality of produced biodiesel. Presented at 2nd International Congress on Biodiesel: The Science and the Technologies, Munich, Germany.
- Devappa**, R. K., Makkar, H. P. S., and Becker, K. (2009b). Fate of *Jatropha curcas* phorbol esters in soil. Presented at 13th Annual Green Chemistry and Engineering Conference (23–25 June), College Park, MD.
- Devappa**, RK., Makkar, HPS and Becker, K. (2010a). Biodegradation of *Jatropha curcas* phorbol esters in soil. J Sci Food Agric 90: 2090-2097.

- Devappa** RK, Makkar HPS and Becker K, (2010b). Optimization of conditions for the extraction of phorbol esters from *Jatropha curcas* oil. *Biomass Bioenergy* 32:1125–1133.
- Donlaporn** S. and Worapot S. (2009), Antifungal Activities of Ethanolic Extract from *Jatropha curcas* Seed Cake. *J. Microbiology. Biotechnology.* 20(2): 319–324.
- Donlaporn** S., Thanyaporn K., Vijay J., and Worapot S. (2010). Functional Properties of Protein Isolate Obtained from Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) Seed Cake *Food Sci. Biotechnology.* 20(1): 29-37.
- Donlaporn** Saetae, Thanyaporn Kleekayai, Vijay Jayasena, and Worapot Suntornsuk (2011). Functional Properties of Protein Isolate Obtained from Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) Seed Cake, *Food Sci. Biotechnology.* 20(1): 29-37.
- El-Badawi**, S.M., and Adam, S. M. (1990). Toxicity of *Jatropha curcas* and *Ricinus communis* for broiler chicks. MSc dissertation, University of Khartoum.
- El-Badawi**, S. M., Mousa, H. M., Adam, S. E., and Hapke, H. J. (1992). Response of brown Hisex chicks to low levels of *Jatropha curcas*, *Ricinus communis* or their mixture. *Vet Hum. Toxicology.* 34:304–306.
- El-Badawi**, S. M., Adam, S. E., and Hapke, H. J. (1995). Comparative toxicity of *Ricinus communis* and *Jatropha curcas* in Brown Hisex chicks. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 102:75–77.
- FAO.** (1991) Protein quality evaluation. FAO Food and Nutrition Paper, No. 51. A joint FAO/WHO Expert Consultation, Rome, Italy. pp. 4-66.
- Fudge** AM. (2000) Laboratory medicine: avian and exotic pets. Saunders, Philadelphia.
- Gandini**, T.L; Despal Y Permana, I.G (2007) Nutritional Properties of Three Different Origins of Indonesian *Jatropha (Jatropha curcas)* Meal For Ruminant. *EN: Journal of agriculture and rural development in the tropics and subtropics.* 90: 94-101.
- García Falcón** M.S., Pérez Lamela C., Martínez Carballo E., Simal Gándara J. (2007). Determination of phenolic compounds in wines: Influence of

- bottle storage of young red wines on their evolution. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods. Food Chemistry* 105(1):248–259.
- Goel**, G., Makkar, H.P.S., Francis, G. & Becker, K. (2007). Phorbols esters structure, biological activity, and toxicity in animals. *International Journal Toxicology*, 26:279-288.
- Gornall** AG, Bardawill CS, David MM. (1949). Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 177: 751–766
- Haas** W, Sterk H y MittelbachM, (2002). Novel 12-deoxy-16-hydroxyphorbol diesters isolated from the seed oil of *Jatropha curcas*. *J. Nat. Prod.* 65:1434–1440.
- Hass**, W.; Mittelbach, M. (2000) Detoxification experiments with the seed oil from *Jatropha curcas* L. *Ind. Crops Prod.*, 12:111–118.
- Haug**, W. y Lantzsch, H.J. (1983) Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products *J. Sci Food Agric.* 34:1423-1426.
- Hollman**, P.C.H., Van der Gag, M., Mengelers, M.J.B., Van Trip, J.M.P., de Vries, J.H.M. & Katan, M. B. (1996) Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radic. Biol. Med.* 21: 703–707.
- Jones** JB y Case VV (1990). Sampling, Handling, and Analyzing Plant Tissue Samples. *In* RL Westerman, ed., *Soil Testing and Plant Analysis*, Ed 2. SSSA Book Series, No. 3. Soil Science Society of America, Madison, WI, pp 389–427.
- Kahkonen** M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J. Rauha J.P. (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:3954-3962.
- King** A. J., He W., Cuevas J. A., Freudenberger M., Ramiamanana D. y Graham I. A. (2009). Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. *Journal of Experimental Botany*, 60: 10:2897–2905.
- Kubena**, L. F., R. B. Harvey, R. H. Bailey, S. A. Buckley y G. E. Rottinghaus. (1998). Effects of a hydrated sodium calcium aluminosilicate (T-Bind™)

- on mycotoxicosis in young broiler chickens. *Poultry Science*. 77:1502–1509.
- Kumar A. & Sharma S.** (2008). An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. *Industrial Crops and Products*, 28:1-10.
- Kumar, M.S., A. Ramesh, B. Nagalingam,** (2003). An experiment comparison of methanol and *Jatropha* oil in a CI engine. *Biomass Bioeng.*, 25: 309-318.
- Landeros P., Reyes W. P., De Lucas E., Albarrán E., López Y. Y Quezada T.** (2008). Evaluación de dos adsorbentes (manano oligosacáridos y clinoptilolita) en dietas de pollos de engorde contaminadas con fumonisina B1 *Rev. Salud Anim.* Vol. 30 No.1:50-58.
- Liberalino, A. A. A., Bambilra, E. A., Morales-Santos, T. and Viera, E. C.** (1988) *Jatropha curcas* L. seeds: Chemical analysis and toxicity. *Arquivos de biología e tecnología* 31:539-550.
- López, A; Gil, A y Bello, J** (2006). Alimentos con sustancias tóxicas de origen natural: plantas superiores alimenticias. *Toxicología alimentaria*. Pp. 191-209.
- Lumeij.** (1997). Avian clinical biochemistry. In *Clinical biochemistry of domestic animals*, 5th Edition. J. J. Kaneko, J. W. Harvey, and M. L. Bruss. (eds.). Academic Press, San Diego, California, pp. 857–883.
- Makkar, H. P. S.** (1993). Antinutritional factors in foods for livestock. In *Animal production in developing countries*, eds. M. Gill, E. Owen, G. E. Pollot, and T.L.J. Lawrence, pp.69–85. Edinburgh:British Society of Animal Production.
- Makkar, H.P.S., Aderibigbe, A.O., Becker, K.,** (1997). Comparative evaluation of nontoxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. *Food Chem.* 62(2): 207–215.
- Makkar, H. P. S., Becker, K., Schmook, B.** (1998). Edible provenances of *Jatropha curcas* from Quintana Roo state of Mexico and effect of roasting on antinutrient and toxic factors in seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 52:31–36.

- Makkar**, H.P.S. and K. Becker, (1998). *Jatropha curcas* toxicity: Identification of toxic principle(s), In: Toxic Plants and Other Natural Toxicants (Garland, T. and Barr, A.C., eds.), pp: 554-558, CAB International, New York, USA.
- Makkar**, H.P.S. and K. Becker, (1999). Nutritional studies on rats and fish (Carp *Cyprinus carpio*) fed diets containing unheated and heated *Jatropha curcas* meal of a non-toxic provenance. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 53:183-192.
- Makkar**, H.P.S., Becker, K., (2009). *Jatropha curcas* an exciting crop for generation of biofuel and value-added products. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 11(8):773–787.
- Mallmann**, C; Hummes, R. y Giacomini, L (2006) Factores de formación de las micotoxinas y sus formas de control. http://www.lamic.ufsm.br/papers/20060515_factores.pdf
- Manach**, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79:727–747.
- Martinez** Herrera J., Chel Guerrero L., Martinez Ayala A.L. (2004) The nutritional potential of Mexican piñon (*Jatropha curcas*). Toxic and antinutritional factors. Toledo, Spain: Wageningen Academic Publisher, 185-188.
- Martínez** Herrera, J.; Martínez Ayala, A.L.; Makkar H.P.S.; Francis G.; Becker K. (2010) Agroclimatic Conditions, Chemical and Nutritional Characterization of Different Provenances of *Jatropha Curcas* L. from Mexico *European Journal of Scientific Research* 39(3):396- 407.
- Martínez** Herrera, J.; Siddhuraju, P.; Francis, G.; Dávila-Ortíz, G.; Becker, K. (2006). Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents and effects of different treatments on their levels in four provenances of *Jatropha curcas* L. from México. *Food Chem.* 96:80–89.
- Miller**, N. J., Diplock, A. T., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan. V., Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 84:407-412.

- Moll**, M. y **Moll**, N. (2006). Compendio de riesgos alimentarios. Zaragoza: Editorial ACRIBIA S.A. p 379.
- Morales**, M; y **Troncoso**, A (2006). Sustancias antinutritivas presentes en los alimentos. EN: Toxicología alimentaria. (CAMEAN, A y REPETTO, M, eds.), Buenos Aires – España, Díaz de santos, 191-209.
- NRC**, (1994). National Research Council. (1994). Nutrient requirements of poultry. 9th Rev. Ed. Washington: National Academy Press. Ed. Washington: National Academy Press.
- Perveen** A, **Qaiser** M. (2005) Pollen flora of Pakistan - XLVII. *Euphorbiaceae*. Pakistan J. Bot. 37(4):785-796.
- Prior** R. L., **Wu** X., **Schaich** K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem.; 53: 4290-4302.
- Prophet** EB, **Mills** B, **Arrington** JB, **Sobin** LH. (1994). Laboratory methods in histotechnology. The American Registry of Pathology. Armed Forces Institute of Pathology. Washington, D.C.
- Prosky** L., **Asp** N. G. **Scheweizer** T. F., **De Vries** J.W. and **Furda** I. (1988). Determination of insoluble, soluble and total dietary fibre in foods and food products. J. Assoc. Of Anal. Chem. 71:10-17.
- Quintana**, L. J. (2003). Avitecna manejo de las aves domésticas más comunes pp. 11-36.
- Satterlee**, L. D., **Marshall**, H. F., & **Tennyson**, J. M. (1979). Measuring protein quality. Journal of the American Oil Chemist`s Society, 56:103–109.
- Shukla** & **Pachauri** (1995). **Shukla**. S.K. and S.P. **Pachauri**, 1995. Blood biochemical profiles in induced aflatoxicosis of cockerels. British Poult. Sci., 36(1):155-160.
- Singleton**, V. L., **Orthofer**, R., **Lamuela-Raventos**, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. Methods Enzymol, 299:152–178.
- Sirisomboon** P., **Kitchaiya** P., **Pholpho** T., **Mahuttanyavanitch** W., (2007) . “Physical and mechanical properties of *Jatropha curcas* L. fruits, nuts and kernels”. Biosystems Engineering, 97:201–207.

- Snedecor**, G. W. y W. G. Cochran. (1967). *Statistical Methods*. Ed. Ames. pp 54-68.
- Trabi M.**, Gubitiz M.G., Steiner W., Foidl N. (1997). Toxicity of *Jatropha curcas* seeds. In *Biofuels and Industrial Products From Jatropha curcas*. Proceedings from symposium held in Managua, Nicaragua.
- Van den Berg H.**, Guido R., Aalt B. (1999). Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*. 66:511-517.
- Villegas y Mertz** (1970), VILLEGAS, E.; MERTZ, E.T. 1970. Screening technique used at CIMMYT for protein quality maize. Technical Bull. No. 20 CIMMYT México.
- Webster**, G. L. (1987). The saga of the spurge: A review of classification and relationships in the Euphorbiales. *Bot. J. Linn. Soc* 94:3–46.
- Weibking T.S.**; Ledoux, D.R.; Bermudez, A.J.; Turk, J.R.; Rottinghaw, G.E. (1993): Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B1 on the young broiler chick. *Poult Sci*. 72: 456-466.
- Wheeler**, D. S., Catravas, J. D., Odoms, K., Denenberg, A., Malhorta, V., & Wong, H. R. (2004). Epigallocatechin-3-gallate, a green tea-derived polyphenol, inhibits IL-1 b-dependent proinflammatory signal transduction in cultured respiratory epithelial cells. *Journal of Nutrition*, 134:1039–1044.
- Williams**, M. J., Sutherland, W. H., Whelan, A. P., McCormick, M. P., De Jong, S. A. (2004). Acute effect of drinking red and white wines on circulating levels of inflammation-sensitive molecules in men with coronary artery disease. *Metabolism*, 53:318–323.
- Yuan**, H., Gong, A., Young, C. Y. (2005). Involvement of transcription factor Sp1 in quercetin-mediated inhibitory effect on the androgen receptor in human prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, 26:793–801.