



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería

“Producción de ácidos grasos en higuera (*Ricinus communis* L.) mediante el uso de ácido salicílico”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctor en Ingeniería de Biosistemas

Presenta:

Carlos Eduardo Zavala Gómez

Director:

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez

Co-Director:

Dr. Miguel Angel Ramos López

Santiago de Querétaro, Querétaro.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



“Producción de ácidos grasos en higuera (Ricinus communis L.) mediante el uso de ácido salicílico”

por

Carlos Eduardo Zavala Gómez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](#).

Clave RI: IGDCC-156591



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Doctorado en Ingeniería de Biosistemas

“Producción de ácidos grasos en higuera (*Ricinus communis* L.) mediante el uso de ácido salicílico”

Presenta:

Carlos Eduardo Zavala Gómez

Dirigido por:

Ana Angélica Feregrino Pérez

Co-Dirigido por:

Miguel Angel Ramos López

SINODALES

Dra. Ana Angelica Feregrino Pérez
Presidente

Firma

Dr. Miguel Angel Ramos López
Secretario

Firma

Dr. Juan Fernando García Trejo
Vocal

Firma

Dr. Ramón Gerardo Guevara González
Suplente

Firma

Dr. Antonio Flores Macías
Suplente

Firma

Dr. Manuel Toledano Ayala
Director de la Facultad de Ingeniería

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Querétaro
01 Julio del 2022
México

RESUMEN

La higuera (*Ricinus communis* L.) es una especie nativa de África tropical y se distribuye ampliamente alrededor del mundo. Sus semillas se utilizan para producir aceite de ricino, que tiene características únicas para la fabricación de productos de base biológica y materia prima de muchos otros. Razón por la que se busca mejorar su rendimiento, lo cual puede realizarse mediante distintas técnicas. Por ejemplo, con el uso de elicitores, que son sustancias que pueden inducir una mayor productividad, cuando se aplican a las plantas. El ácido salicílico (AS) es un compuesto fenólico y constituyente natural de las plantas, y cuando se aplica de manera exógena actúa como un elicitador. El objetivo de este trabajo fue evaluar el contenido de aceite, ácido ricinoléico y ricinina de las plantas de higuera tratadas con diferentes dosis de ácido salicílico (100, 300, 600 y 900 μM). La aplicación del elicitador se realizó foliarmente y aplicación directa, esta aplicación se efectuó 60 días después de la siembra. Se midieron las características morfológicas altura de planta, grosor del tallo y número de racimos de *Ricinus communis* L. cada 7 días hasta el día 42 para ver la homogeneidad del crecimiento. El contenido de aceite aumentó en un 39% cuando se aplicó AS 900 μM en comparación con el control. Por otro lado, el contenido de ácido ricinoléico tuvo una disminución del 4% en comparación con el control, y el contenido más alto de ricinina se obtuvo a una concentración de 300 μM AS. El uso de AS a una concentración de 900 μM puede ser un método eficaz para aumentar el contenido de aceite, mientras que la concentración de 300 μM para ricinina en las plantas de ricino. Por otra parte, el AS no fue eficaz para aumentar el contenido de ácido ricinoléico.

(Palabras clave: *Ricinus communis*, aceite de ricino, elicitador, ácido salicílico, ácido ricinoléico, ricinina.)

SUMMARY

Castor bean (*Ricinus communis* L.) is a native species of tropical Africa and is widely distributed around the world. Its seeds are used to produce castor oil, which has unique characteristics for the manufacture of bio-based products and raw materials for many others. Reason for improving their performance, which can be done through different techniques. For example, with the use of elicitors, which are substances that can induce greater productivity, when applied to plants. Salicylic acid (SA) is a phenolic compound and a natural constituent of plants, and when applied exogenously it acts as an elicitor. The objective of this work was to evaluate the oil, ricinoleic acid and ricinine content of castor plants treated with different doses of salicylic acid (100, 300, 600 and 900 μM). The elicitor was applied by foliar and direct application; this application was carried out 60 days after sowing. The morphological characteristics as tall, stem thickness and number of brunches of *Ricinus communis* L. were measured every 7 days until day 42 to see the homogeneity of the growth. The oil content increased by 39% when SA 900 μM was applied compared to the control. On the other hand, the ricinoleic acid content had a decrease of 4% compared to the control, and the higher ricinine content was obtained at a concentration of 300 μM AS. The use of AS at a concentration of 900 μM can be an effective method to increase the oil content, while the concentration of 300 μM for ricinine in castor plants. On the other hand, SA was not effective in increasing ricinoleic acid content.

(Keywords: *Ricinus communis*, castor oil, elicitor, salicylic acid, ricinoleic acid, ricinine.)

DEDICATORIAS

A mi familia y amistades, quienes siempre han estado ahí, apoyando.

A mi esposa Miriam Martínez González por todo su apoyo, ánimo y entendimiento desde que inicie este proyecto de vida.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por brindarme a través de la beca número 714272 la posibilidad de continuar los estudios de posgrado.

Del campus Amazcala de la UAQ, agradezco al Dr. Enrique Rico García por brindar las facilidades para instalar mi proyecto en un invernadero experimental, al Dr. Ramón Gerardo Guevara, por el apoyo administrativo como coordinador del programa de posgrado.

A todo mi comité tutorial por la confianza que me brindaron al darme gran libertad en los planteamientos de mi proyecto, especialmente a mi Directora Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez y Co director Dr. Miguel Angel Ramos López. A Sebastián Adolfo Pérez Macías por su apoyo en el laboratorio. A Juan Antonio Valencia Hernández por su apoyo y asesoría en aspectos relacionados con mi proyecto. Finalmente, a Miriam Martínez González por apoyar con diagramas y formato para la tesis y otros trabajos académicos, pero sobre todo por su apoyo emocional. Muchas gracias.

ÍNDICE

Página

RESUMEN	I
SUMMARY	II
DEDICATORIAS	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	X
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. HIGUERILLA (<i>RICINUS COMMUNIS</i> L.)	4
2.2. MANEJO DEL CULTIVO	5
2.3. ACEITE DE RICINO	5
2.4. EUSTRESORES	7
2.4.1. <i>Eustresores de origen biológico</i>	8
2.4.2. <i>Eustresores de origen no biológico</i>	9
2.5. ÁCIDO SALICÍLICO	10
2.6. VARIABLES ASOCIADAS AL INCREMENTO DE ÁCIDOS GRASOS	11
3. HIPÓTESIS	12
4. OBJETIVOS	12
4.1. OBJETIVO GENERAL	12
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
5. METODOLOGÍA	13
5.1. PREPARACIÓN DEL ÁREA EXPERIMENTAL	14
5.2. ANÁLISIS DE SUELO	15
5.3. DISEÑO DE EXPERIMENTOS	15
5.3.1. <i>Esquema del diseño</i>	16
5.4. MATERIAL VEGETAL	17

5.5.	CRONOGRAMA DE PARTE EXPERIMENTAL	18
5.6.	SIEMBRA Y GERMINACIÓN	19
5.7.	MANTENIMIENTO DEL CULTIVO INVERNADERO	20
5.8.	MEDICIONES MORFOLÓGICAS DE LAS PLANTAS	21
5.9.	ELICITACIÓN.....	21
5.10.	EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS SEMILLAS.....	22
5.11.	OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE HIGUERILLA.....	24
5.12.	CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA ABIERTA Y CROMATOPLACA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE RICININA	25
5.13.	CUANTIFICACIÓN DEL ALCALOIDE RICININA EN SEMILLA.....	26
5.14.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
6.1.	PREPARACIÓN DEL ÁREA EXPERIMENTAL	28
6.2.	ANÁLISIS DE SUELO.....	28
6.3.	DISEÑO DE EXPERIMENTOS DE SIEMBRA BLOQUES AL AZAR.	30
6.4.	MATERIAL VEGETAL UTILIZADO.....	31
6.5.	CRONOGRAMA DE PARTE EXPERIMENTAL	32
6.6.	SIEMBRA Y GERMINACIÓN	32
6.7.	MANTENIMIENTO DEL INVERNADERO.....	33
6.8.	MEDICIONES MORFOLÓGICAS DE LAS PLANTAS	34
6.9.	EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS SEMILLAS.....	37
6.10.	ELICITACIÓN.....	39

6.11. OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE HIGUERILLA.....	39
6.12. ANÁLISIS DE RICININA.....	43
RESUMEN DE RESULTADOS.....	51
CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS	53
APÉNDICE.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Requerimientos agroecológicos para el buen potencial productivo de higuera	3
Tabla 2. Comparación del suelo de invernadero vs condiciones óptimas para cultivo de <i>R. communis</i> L.	28
Tabla 3. Resultados de análisis de suelo de invernadero.	29
Tabla 4. Comparación de condiciones climáticas obtenidas en el invernadero.	34
Tabla 5. Diámetro del tallo de las plantas de <i>Ricinus communis</i> L. antes del tratamiento con ácido salicílico a los días 7, 14, 21, 28, 35 y 42 después de la siembra.	35
Tabla 6. Altura de las plantas de <i>Ricinus communis</i> L. antes del tratamiento con ácido salicílico a los días 7, 14, 21, 28, 35 y 42 después de la siembra.	36
Tabla 7. Número de racimos a los días 28 y 35 días después de la siembra antes del tratamiento con ácido salicílico en plantas de <i>Ricinus communis</i> L.	36
Tabla 8. Peso total de semillas de <i>Ricinus communis</i> L. por tratamiento.	
Tabla 9. Características morfológicas de semillas de plantas de <i>Ricinus communis</i> L.	37
Tabla 10. Contenido de aceite y composición de ácidos grasos de plantas de <i>Ricinus communis</i> L. tratadas con diferentes concentraciones de ácido salicílico	38
Tabla 11. Gradiente de elución para el análisis de ricinina.	61
Tabla 12. Datos de concentración y áreas bajo la curva para la ricinina.	42

Tabla 13	Concentración de ricinina y área bajo la curva de los extractos metanólicos de plantas de <i>Ricinus communis</i> L. tratadas con ácido salicílico.
----------	---

43

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Imagen de la higuera	5
Figura 2. Cronograma de actividades realizadas.	13
Figura 3. Invernadero utilizado para investigación.	14
Figura 4. Diseño experimental de bloques al azar del invernadero.	17
Figura 5. Semilla de variedad Israelí.	18
Figura 6. Semilla de variedad Guanajuatoil.	19
Figura 7. Cronograma de la parte experimental.	20
Figura 8. Siembra en invernadero	20
Figura 9. Germinación.	21
Figura 10. Sistema de riego.	22
Figura 11. Elicitación a punto de goteo.	23
Figura 12. Proceso de extracción de semillas desde la cosecha.	24

Figura 13.	Determinación de peso volumétrico de semillas.	25
Figura 14.	Proceso extracción de aceite en semillas por método Soxhlet.	26
Figura 15.	Proceso de extracción de muestra para análisis de cromatografía de columna abierta y cromatoplaca para identificación de ricinina.	27
Figura 16.	Obtención del extracto metanólico de ricinina.	26
Figura 17.	Acondicionamiento de invernadero.	27
Figura 18.	Trasplante de Higuierillas con doble germinación	33
Figura 19.	Monitoreo de Temperatura y Humedad Relativa.	
Figura 20.	Proceso de extracción de aceite en semillas.	39
Figura 21.	Cromatograma de estándar de ácido Ricinoléico.	
Figura 22.	Cromatograma de muestra de ácido Ricinoléico.	
Figura 23.	Cromatograma del estándar de ricinina y su espectro de absorción en UV-Vis.	43
Figura 24.	Curva de calibración de ricinina	44
Figura 25.	Comparación de ricinina en muestras de <i>Ricinus communis</i> L. tratadas con diferentes concentraciones de ácido salicílico	45
Figura 26.	Cromatograma HPLC de la muestra obtenida con 0 μ M. ácido salicílico	46
Figura 27.	Cromatograma HPLC de la muestra obtenida con 100 μ M. ácido salicílico	46

Figura 28.	Cromatograma HPLC de la muestra obtenida con 300 μ M. ácido salicílico	47
Figura 29.	Cromatograma HPLC de la muestra obtenida con 600 μ M. ácido salicílico	47
Figura 30.	Cromatograma HPLC de la muestra obtenida con 900 μ M. ácido salicílico	48

1. Introducción

La producción de metabolitos primarios y secundarios en plantas se puede llevar a cabo mediante distintas técnicas como, por ejemplo: la elicitación, que es la inducción del sistema inmune que mejora la protección de las plantas, la productividad y la calidad después de la aplicación de elicitores (Luciano et al., 2017). Los elicitores son sustancias que pueden inducir el incremento de productividad, respuestas defensivas, activar el sistema bioquímico entre otras actividades reportadas, cuando se adicionan en tejidos o en células de plantas (Falcón Rodríguez et al., 2015). También su aplicación en algunos cultivos ayuda a incrementar la producción de metabolitos primarios y secundarios (García-Mier et al., 2015). Existen diversas sustancias que pueden ser utilizadas como elicitores, por ejemplo, el ácido salicílico, ácido jasmónico, peróxido de hidrógeno, entre otros (Jiménez-García et al., 2013).

El ácido salicílico (AS) es un compuesto fenólico y constituyente natural de las plantas (Mady, 2009). Puede actuar como un regulador sobre el balance óxido/reducción de las células vegetales, induce respuestas adaptativas, fisiológicas y morfológicas, participa en la actividad de las catalasas y otras enzimas encargadas de controlar la oxidasa en mitocondrias (Singh & Gautam, 2013). Además, se considera como biorregulador de crecimiento y su aplicación en plantas favorece el aumento en la producción de biomasa foliar, en raíz y frutos. También se ha documentado que el AS está involucrado en respuestas a distintos tipos de estrés (biótico y abiótico) y de defensa en plantas contra el ataque de patógenos (Xuet al., 2009). Se ha demostrado que la aplicación del AS en *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) incrementa la producción de ácidos grasos (Mahalaksmiet al., 2013); la higuera es una Euphorbiaceae de la cual se obtiene aceite de ricino, el cual es uno de los que genera mayor rendimiento en peso, con alrededor del 50% en relación al peso de semilla, este aceite está constituido de los ácidos grasos: ácido ricinoléico 82%, ácido linoléico 6%, ácido oleico 5%, ácido esteárico 3%, ácido palmítico 2% y ácido linolénico 2% (Singh & Shukla, 2016). Esta característica hace deseable que el establecimiento del cultivo de higuera en México

se incrementa, debido al alto precio que tiene en el mercado nacional e internacional, en el 2017 se exportaron 626,547 Kg y se importaron 3,868,971 Kg, la demanda nacional de este aceite se provee principalmente de Brasil, España y la India, lo que encarece este producto el cual es de 2.5 dólares por Kg (SIAVI, 2017).

Se han realizado estudios donde se aplicó AS como elicitador, Vázquez Díaz et al. (2016) reportaron que incrementó el rendimiento y calidad nutracéutica de los frutos de tomate producidos en condiciones de invernadero. Saw et al. (2010) mencionan que el peso de células frescas en uvas incrementó y mejoró la síntesis de antocianinas, a cultivos de células.

La higuera *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae) es una especie procedente de África tropical (Sánchez et al., 2015). Países como la India y China la han cultivado desde hace más de 3,000 años (Shahet al., 2017). Este cultivo ha sido introducido principalmente en zonas cálidas en casi todo el mundo (Vázquez-Martínez, 2015).

En el territorio mexicano la higuera existe de manera silvestre y se distribuye ampliamente en los diferentes estados (INIFAP, 2018). De acuerdo con Espinoza et al. 2013 los requerimientos agroecológicos para el cultivo de la higuera se presentan en el Tabla 1.

Tabla1. *Requerimientos agroecológicos para el buen potencial productivo de higuera*

Variable	Potencial Productivo		
	Alto	Medio	Bajo
Altitud (msnm)	0 – 1800	1800 – 2500	>2500
Precipitación (mm)	400 – 1000	1000 – 1500	<400 y >1500
Temperatura (°C)	15 – 30	15-19 y 30-35	<15 y >35
Textura de suelo	Media gruesa	Media gruesa	Fina

Fuente: elaboración propia.

De *Ricinus communis* L. se conocen alrededor de 700 aplicaciones en el uso industrial debido a su alto contenido de nitrógeno y otros compuestos y su aprovechamiento

sigue incrementando (Mubofu, 2016). Los tallos de esta planta pueden utilizarse para la fabricación de papel, mientras que de las semillas se extrae el aceite de ricino que tiene usos farmacéuticos y también puede utilizarse como lubricante y para la fabricación de jabones y pinturas, entre otros (Rzedowski & Rzedowski, 2001; Vasco-Leal et al., 2017). Se estima que para el año 2020 el mercado global de aceite de ricino y sus derivados alcance los 1.81 billones de dólares (Mubofu, 2016).

Actualmente se ha observado una mayor demanda en el uso del aceite de ricino, el desplazamiento en el precio y la alta demanda han generado entre los investigadores la necesidad de encontrar una técnica para lograr incrementar la producción de este aceite en plantas de *Ricinus communis* L. El ácido ricinoléico tiene gran importancia como materia prima para la industria química gracias a los triglicéridos, que son sus principales componentes, los cuales pueden funcionalizarse en distintas reacciones químicas (Sinadinovic-Fiser et al., 2012) haciéndolo de gran interés para su estudio.

En este trabajo se pretende generar condiciones de manejo de higuierilla bajo condiciones de invernadero y utilizar ácido salicílico a diferentes concentraciones para incrementar la cantidad de ácidos grasos contenidos en su aceite.

2. Antecedentes

2.1. Higuierilla (*Ricinus communis* L.)

La higuierilla (*Ricinus communis* L.) es un arbusto de 2 a 5 m de altura; de tallo grueso, leñoso y hueco, puede tomar un color púrpura oscuro. Las hojas son de gran tamaño, de bordes irregularmente dentados, como se muestra en la figura 1. Las flores están dispuestas en inflorescencias al final de los tallos; las flores masculinas están en la parte inferior de las mismas, y las flores femeninas se encuentran en la parte superior de la panícula. Tiene frutos globulosos, y generalmente cubiertos de espinas, que le dan un aspecto erizado; tiene tres cavidades, cada una con una semilla, de superficie lisa y brillante, rematada por una excrecencia y contiene una proteína toxina llamada ricina (Rico et al., 2011; FAO, 2018). Según la literatura, por tonelada de higuierilla se produce 468 kg de semillas, 388 kg de tallos y 144 kg de hojas (Kaur & Bhaskar, 2019).

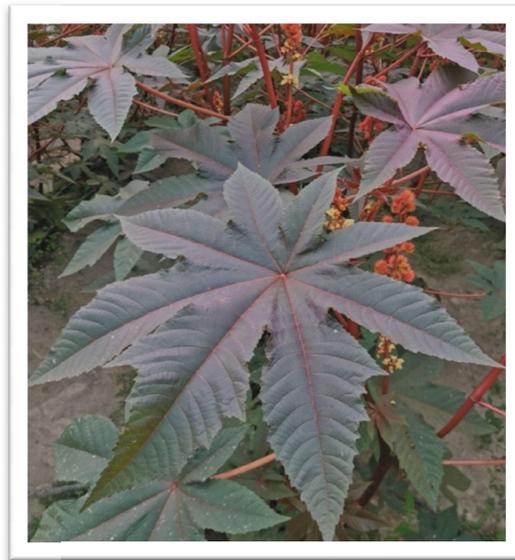


Figura 1. Imagen de la higuierilla. Fuente: Elaboración propia.

De la variedad *Ricinus communis* L. se conocen alrededor de 700 aplicaciones en el uso industrial, por su alto contenido de Nitrógeno y otros compuestos (Baladhiya & Joshi, 2016), y su aprovechamiento sigue incrementando (Mubofu, 2016). Los tallos de esta planta pueden utilizarse para la fabricación de papel, mientras tanto de las semillas se extrae el aceite de ricino que tiene usos farmacéuticos y también puede

utilizarse como lubricante y para la fabricación de jabones y pinturas, entre otros (Rzedowski & Rzedowski, 2001; Vasco-Leal et al., 2017).

Además, *Ricinus communis* L. está entre las plantas con la mayor producción de aceite, lo que lo convierte en un cultivo rentable, con la ventaja de no ser comestible y no competir con los cultivos de campo tradicionalmente utilizados para la alimentación (López-Ordaz et al., 2019).

2.2. Manejo del cultivo

El INIFAP (2018) reportó 10, 286,201 hectáreas con potencial para el cultivo de higuierilla en México. Rico et al. (2011) mencionaron que para cultivarlo es recomendable si el terreno lo permite el uso de maquinaria agrícola para realizar las siguientes labores: barbecho, rastreo, nivelación y surcado. El monocultivo de esta especie se considera el sistema de más fácil manejo agronómico y con mayor rendimiento de semilla, por lo que se recomienda sembrar cuando esté bien establecido el temporal de lluvias y el método de siembra puede realizarse en forma mecanizada con el uso de la sembradora de maíz o de forma manual depositando 3 semillas por golpe (Goytia-Jiménez et al., 2011).

La semilla puede ser tratada para protegerla de daños por hongos como *Fusarium ricini* L. o por *Phymatotrichopsis omnivorum* D. (Hernández-Martínez et al., 2013). La cantidad de semilla requerida por hectárea (ha) depende de la densidad de siembra que se pretenda establecer, aunque generalmente se requieren de 7 a 10 kg de semilla/ha para plantaciones con baja densidad inferior a 2, 500 plantas por ha. El arreglo topológico para el cultivo de higuierilla se sugiere de 1m x 2m debido a que representa la mejor opción de plantación para lograr mayores rendimientos de semilla por ha (Maciel-Torres et al., 2017).

2.3. Aceite de Ricino

La extracción de aceite de semillas de ricino se lleva a cabo en diversas acciones preliminares tales como limpieza, pelado, secado y fresado (Chino et al., 2019).

Además, puede llevarse a cabo mediante diferentes estrategias, la extracción mecánica o la extracción con solventes, estudios previos, han demostrado que el método con solvente produjo el máximo rendimiento de aceite en comparación con el método de extracción mecánica (Naveenkumar & Baskar, 2019). Pero la cantidad total de aceite extraído depende principalmente del tiempo de extracción, temperatura, contenido de humedad y solvente utilizado (Chino et al., 2019).

El aceite de ricino es un producto natural y amigable con el medio ambiente. Este aceite es viscoso, color amarillo pálido, no volátil, de sabor suave y se utiliza como un purgante (Panhwar et al., 2019). Hay diferentes variedades de semillas de ricino, pero en promedio, contienen aproximadamente 46-55 % de aceite en peso y es más versátil que otros aceites vegetales, debido a su estructura única por la presencia de ácido ricinoléico, que contiene tanto un doble enlace como un grupo hidroxilo, los cuales le imparten una mayor lubricidad al aceite de ricino y sus derivados en comparación con otro aceite vegetales (López-Ordaz et al., 2019).

El aceite de ricino es ampliamente utilizado como materia prima para la producción de distintos productos químicos como: pinturas, recubrimientos, tintas, lubricantes y una amplia variedad de otros productos (Ogunniyi, 2006). El aceite está constituido de aproximadamente 80–90 % de ácido ricinoléico, 3 – 6 % de ácido linoleico, 2 – 4 % de ácido oleico y 1 – 5 % de ácidos grasos saturados (López –Ordaz et al., 2019). En los últimos años se ha utilizado para la producción de biocombustibles como: bioturbosina, biodiesel y bioetanol (Amaral et al., 2019; Baskar et al., 2018).

Los principales productores de aceite de ricino a nivel mundial son Brasil, China y la India con aproximadamente el 90% de producción a nivel mundial (Naveenkumar & Baskar, 2019), la superficie cultivada con higuierilla alrededor del mundo en 2017 fue de 1,473,751 hectáreas y en México se reportó una superficie cercana a 500 hectáreas. La producción de semilla de higuierilla a nivel mundial fue de 1,499,111 toneladas y mientras que en el territorio nacional se reportaron únicamente 100 toneladas (Rico et al., 2011; Shah et al.,2017). Estas semillas son venenosas para los humanos y los

animales debido a que contienen ricina, ricinina y ciertos alérgenos que son tóxicos, además de obtenerse el aceite de ricino por medio de su extracción (Whitfield et al., 2017).

2.4. Eustresores

El estrés de las plantas se puede clasificar como “interno” que provienen del interior de la planta y “externos” que existen fuera de la planta. Las tensiones externas e internas suelen denominarse “factores de estrés” y “factores de estrés”, respectivamente (Kranner et al., 2010). En prácticas hortícolas y agrícolas en todo el mundo, las plantas están expuestas a diferentes factores de estrés (estresores) que limitan el rendimiento, el crecimiento, la calidad y el rendimiento. Estos pueden clasificarse según su origen, y se dividen en: bióticos, por ejemplo: patógenos, insectos y abióticos, por ejemplo. sequía, temperaturas extremas, salinidad, etc.

Por lo tanto, el balance entre la respuesta de la planta (rendimiento, crecimiento, calidad, defensa o tolerancia) y la sensibilidad puede determinar si un estresor tiene un efecto positivo (eustrés) o negativo (distrés) en el metabolismo de la planta y, por lo tanto, en el crecimiento (Hideg et al., 2013). Con base en este enfoque, un factor de estrés puede llamarse eustrésor si la respuesta de la planta en términos de rendimiento, crecimiento, calidad y resistencia a enfermedades/plagas o tolerancia a factores abióticos es positivo (eustrés) o si la respuesta es negativa (distrés) (Vázquez-Hernández et al., 2019). Por ejemplo, las bajas temperaturas causan malestar en los tejidos vegetativos de las plantas vasculares y son letales para muchas especies de plantas por debajo del punto de congelación. (Schwarz et al., 2010), mientras que baja temperatura durante un período corto en la mañana induce el endurecimiento y tiende a mejorar el crecimiento a favor de los productores (Kalberer et al., 2006).

Por otra parte, la hórmesis se define actualmente como una respuesta bifásica en la que altas dosis de un agente tóxico podría causar inhibición, es decir, angustia, mientras que una dosis baja de la misma toxina puede causar estimulación, es decir, eustrés (Vázquez-Hernández et al., 2019).

Una variedad de estresores biológicos desencadena respuestas de defensa inducibles después de ser reconocidos por la planta, proporcionando así una resistencia eficiente contra los patógenos no adaptados (Wiesel et al., 2014). Estos eustrésos se denominan "elicitors" y pueden ser una variedad de estresores biológicos, debido a que su aplicación en la superficie de estas activa múltiples señales de defensa intracelular (Jiménez-García et al., 2013). Para la utilización de elicitors se deben evaluar los efectos de las respuestas inducidas sobre la productividad agrícola. La aplicación de elicitors como estrategia biotecnológica es de importancia en el estudio de los procesos relacionados con el cultivo de material vegetal, lo que permite alcanzar una mayor productividad de metabolitos primarios y secundarios además de generar conocimiento sobre las respuestas fisiológicas de las plantas (Yakhin et al., 2017). Así mismo, la elicitación es una alternativa prometedora a otras técnicas biotecnológicas convencionales utilizadas para mejorar los compuestos bioactivos en los cultivos (Liu et al., 2019). de forma similar a lo descrito para los bioestimulantes de plantas (Naik y Al-Khayri, 2016).

Los eustrésos son factores de estrés biológicos, químicos o físicos que cuando se aplican en dosis horméticas/duración mejora el rendimiento de la planta aumentando varias vías fisiológicas que pueden o no incluir defensa vegetal. Además de los eustrésos biológicos, los químicos de origen no biológico y los eustrésos físicos también han demostrado ser útil potenciando la producción hortícola provocada por diferentes mecanismos.

2.4.1. Eustrésos de origen biológico

Los elicitors bióticos tienen origen biológico y pueden ser células completas, fracciones celulares o moléculas que son producidas naturalmente por las plantas o se encuentran naturalmente en el suelo de cultivo, por ejemplo: fitoalexinas, ácido salicílico, ácido jasmónico, ácido giberélico, peróxido de hidrógeno entre muchas otras (Alvarado et al., 2018). Son comúnmente aplicados para mejorar la composición

fitoquímica de plantas y dependiendo del tipo de compuesto, la planta activa diferentes vías de señalización para sintetizar una mezcla óptima de metabolitos defensivos.

La composición de los elicitores bióticos es muy compleja y su origen se considera endógeno. Además, una gran cantidad de compuestos distintos, como oligosacáridos, lípidos y glicoproteínas se consideran bióticos (Chialva et al., 2018; Joo et al., 2018). La señalización de hormonas de defensa de las plantas, tales como ácido salicílico y ácido jasmónico fluctúa con la aplicación de endófitos únicos o combinados en las plantas enfermas y juegan un papel esencial en la ignición de las cascadas de señalización que inducen la producción de metabolitos secundarios para servir como una defensa a las plantas (Talebi et al., 2018). También puede simular defensa de planta inducida por patógenos y conducir a la producción de metabolitos secundarios a través de varios mecanismos (Baenas et al., 2014).

2.4.2. Eustresores de origen no biológico

Los elicitores abióticos son de origen no biológico, incluyen metales, luz, osmótica, sequía, salinidad, por mencionar algunos ejemplos. Tienen diferentes efectos sobre los procesos celulares en el sistema de la planta, como el crecimiento, la fotosíntesis, el reparto de carbono, el metabolismo de carbohidratos y lípidos, la homeostasis osmótica, la síntesis de proteínas y la expresión génica (Naik & Al-Khayri, 2016).

Los elicitores abióticos tienen un amplio rango de efectos en las plantas y en la producción de metabolitos secundarios. Su uso en cultivos de células vegetales ha recibido menos atención en comparación con los elicitores bióticos (Radman et al., 2003). Rodziewicz et al. (2014) menciona que trabajos de investigación recientes explicaron las funciones de muchos genes clave, proteínas, metabolitos y redes moleculares involucradas en las respuestas de las plantas a metales pesados, luz, sequía, salinidad, térmicos, hormonales y otros elicitores abióticos.

2.5. Ácido Salicílico

El ácido salicílico (AS, ácido 2-hidroxibenzoico) es uno de un diverso grupo de compuestos fenólicos sintetizados por plantas (endógenos). Juega un papel en múltiples procesos fisiológicos de las plantas, incluido el crecimiento, la absorción de nutrientes, la inducción de flores, los movimientos estomáticos, actividades enzimáticas, fotosintéticas, así como contribuyendo al aumento de resistencia a los efectos de la sequía al reducir generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ijaz et al., 2019; Nada y El-Hady, 2019). Regula diferentes aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas (Estaji & Niknam, 2020). Es un conocido inductor de la resistencia sistemática adquirida de las plantas (RSA) en la interacción planta-patógeno, pero no es un inductor universal para la producción de metabolitos de defensa de las plantas (Ho et al., 2018). El AS se acumula rápidamente en el sitio de infección durante el ataque de patógenos y la reacción de hipersensibilidad de la planta, y se propaga a otras partes de la planta para inducir una amplia gama de respuestas de defensa (Papadopoulou et al., 2018). También interviene en las vías de los fenilpropanoides y es eficaz para desencadenar la respuesta al estrés a través de la elicitación y desempeña un papel importante en los procesos bioquímicos y cuando se aplica exógenamente, causa la acumulación de peróxido de hidrógeno. Su aplicación exógena influye en las funciones de la planta de una manera dependiente de la dosis aplicada, por ejemplo, Khan et al. (2015) mencionan que en *Matricaria chamomilla* L., se informó que las concentraciones de 50 y 250 μM de AS, respectivamente, promueven e inhiben el crecimiento. A concentraciones de 0.1 y 0.5 mM el AS promovió la fotosíntesis y el crecimiento de *Vigna radiata* L.

Además, Figueroa-Pérez et al. (2018) reportaron que la nefropatía diabética se mejora con infusiones de menta piperita (*Mentha piperita* L.) preparadas a partir de plantas estimuladas con ácido salicílico. Hayat et al. (2010) menciona que el AS es conocido por la resistencia sistémica adquirida que induce en la respuesta de la planta para muchos patógenos, también puede provocar la producción de metabolitos secundarios en las plantas. Evidencia reciente ha demostrado que las concentraciones adecuadas de AS también pueden promover la producción de monoterpenos (Xu et al., 2012).

2.6. Variables asociadas al incremento de ácidos grasos

Mahalakshmi et al. (2013) reportaron que al elicitar *Jatropha curcas* L. con 200 μ M de AS, incrementó la producción de ácidos grasos y alcanos. Jadhav et al. (2013) encontraron que al aplicar AS foliarmente a 200 ppm en cacahuate (*Arachis hypogaea* L.) incrementó el contenido de ácidos grasos además de aumentar la vida de anaquel del aceite. Por otra parte, Xu et al. (2017) reportaron que al adicionar AS a *Phaeodactylum tricornutum* L. tuvo un incremento de amino ácidos, ácidos grasos y carbohidratos.

3. HIPÓTESIS

La producción de ácidos grasos y el alcaloide ricinina en la semilla de higuera bajo condiciones de invernadero, se incrementa cuando se elicitada con ácido salicílico la raíz y por aspersión a punto de goteo al momento de antesis, en comparación con sistemas de producción sin elicitación.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar el efecto del ácido salicílico sobre la producción de ácidos grasos y el alcaloide ricinina en semilla de higuera.

4.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del ácido salicílico sobre la producción de ácidos grasos en semillas de higuera cultivada en invernadero.
- Analizar el contenido de ácidos grasos del aceite de higuera.
- Determinar el contenido del alcaloide ricinina en el bagazo de semilla de higuera.

5. METODOLOGÍA

Esta investigación se hizo en cuatro etapas, con la finalidad de poder llevar a cabo la integración de la información disponible.

Etapa 1

Se realizó la selección de la especie a trabajar en el invernadero entre la variedad Guanajuatol e Israelí; se cultivó en primer instancia la variedad Israelí, al no obtener un porcentaje adecuado de germinación, se decidió cambiar de especie.

En esta etapa se llevó a cabo el acondicionamiento del invernadero, siembra, mantenimiento, monitoreo del cultivo y finalmente la cosecha; todo esto se realizó en el Campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro en la Facultad de Ingeniería.

Etapa 2

Una vez llevada a cabo la cosecha, se acondicionaron los frutos obtenidos para extraer las semillas. Esto se llevó a cabo en el Laboratorio de Compuestos Naturales e Insecticidas de la Facultad de Química en Ciudad Universitaria en la Ciudad de Querétaro.

Ya teniendo las semillas secas e identificadas, se realizaron dos métodos para extracción de aceites, eligiendo con el que obtuvo mayor rendimiento: el Método Soxhlet.

Etapa 3

En esta fase, se utilizaron equipos de Cromatografía de Gases y Líquidos para la cuantificación de ricinina.

Se trabajaron las muestras en el Laboratorio de Metabolitos y Nanocompositos del Campus Aeropuerto de la Facultad de Ingeniería y Laboratorio del Posgrado de Ciencias Químicas y Biológicas de la Facultad de Química en Ciudad Universitaria.

Etapa 4

En esta etapa, se analizaron los resultados obtenidos en las etapas previas para posteriormente utilizarse en la publicación de artículos científicos. En la Figura 2, se muestra el cronograma de las etapas realizadas en esta investigación.

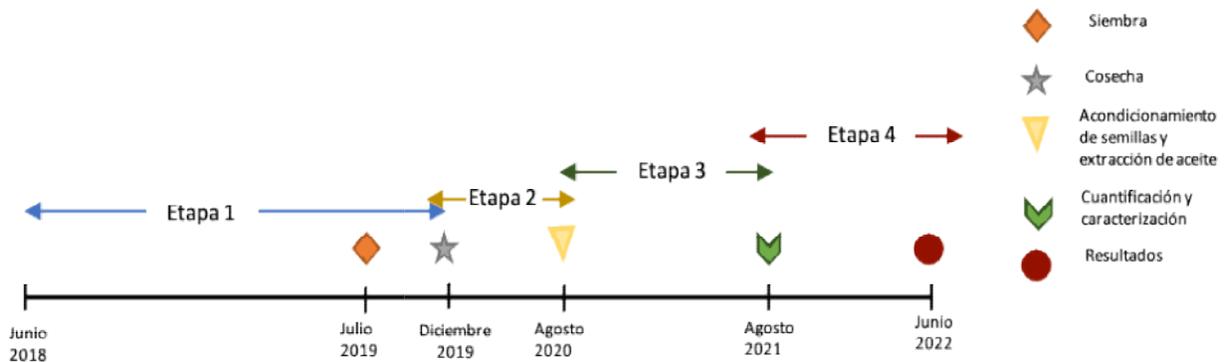


Figura 2. Cronograma de actividades realizadas. Fuente: elaboración propia.

5.1. Preparación del área experimental

La experimentación se llevó a cabo en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro Campus Amazcala en un invernadero de 432 m², de paredes rectas de policarbonato y techo de plástico tricapa con una difusión del 10% de 800 galgas de espesor. En la Figura 3, se muestra la ubicación del Invernadero utilizado.



Figura 3. *Invernadero utilizado para investigación.* Fuente: Elaboración propia obtenida de Google Maps.

5.2. Análisis de suelo

La muestra para analizar fue tomada en seis puntos del invernadero de 1 Kg de cada punto seleccionados al azar. Se efectuó una mezcla de estas y se tomó un Kg, se realizó el análisis físico-químico, el cual fue realizado por Fundación Produce A.C., para comprobar que el suelo fuera apto para la siembra de *Ricinus communis* L.

5.3. Diseño de experimentos

El diseño experimental consistió en bloques completamente al azar con 3 repeticiones, 5 plantas por unidad experimental, 5 tratamientos (4 concentraciones de ácido salicílico, y un control sin elicitor).

5.3.1. Esquema del diseño

El invernadero se dividió en cuatro bloques totalmente al azar con ayuda del software de excel, para evitar tendencia en los resultados, el esquema obtenido de la distribución se puede observar en la Figura 4.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T5 =900 µM	T4 =600 µM	T3 =300 µM	T2 = 100 µM	T5 =900 µM	T5 =900 µM	T2 = 100 µM	T3 =300 µM		T1 = 0 µM
	T2 = 100 µM	T1 = 0 µM	T4 =600 µM	T3 =300 µM		T2 = 100 µM	T1 = 0 µM	T3 =300 µM	
T2 = 100 µM	T1 = 0 µM	T3 =300 µM		T1 = 0 µM	T2 = 100 µM	T4 =600 µM	T1 = 0 µM	T4 =600 µM	T5 =900 µM
T3 =300 µM	T1 = 0 µM	T3 =300 µM	T2 = 100 µM	T4 =600 µM	T3 =300 µM	T4 =600 µM	T5 =900 µM	T3 =300 µM	T2 = 100 µM
T4 =600 µM		T1 = 0 µM	T4 =600 µM	T2 = 100 µM	T1 = 0 µM		T4 =600 µM		
T3 =300 µM	T5 =900 µM		T2 = 100 µM	T5 =900 µM	T2 = 100 µM	T3 =300 µM	T1 = 0 µM	T5 =900 µM	

Figura 4. *Diseño experimental de bloques al azar del invernadero.* Fuente: Elaboración propia.

Como se puede observar en la Figura 4, cada color representa un bloque al cual se le aplicaron los diferentes tratamientos de elicitación. El tratamiento uno para todos los bloques representa el control el cual utilizó un blanco de agua destilada al momento de la elicitación.

El invernadero se dividió en 10 líneas de cultivo en las cuales se colocaron 30 plantas por línea. Cada bloque contenía 15 plantas de cada tratamiento.

5.4. Material vegetal

La planta modelo seleccionada en este estudio fue la higuera (*Ricinus communis* L.). Se utilizaron 2 variedades de semilla:

- La variedad Israelí: la semilla fue donada por el M. en C. Juan Fernando Rocha Mier coordinador de la Universidad Autónoma de Querétaro campus CONCA. (Figura 5)
- La variedad Guanajuatoil: la semilla fue proporcionada por el Dr. Miguel Hernández Martínez del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) campo experimental Celaya. (Figura 6)



Figura 5. Semilla de variedad Israelí. Fuente: Elaboración propia.

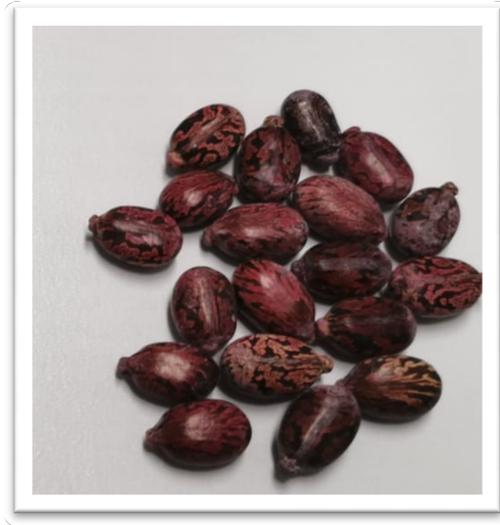


Figura 6. *Semilla de variedad Guanajuatol.* Fuente: Elaboración propia.

5.5. Cronograma de parte experimental

A continuación, se muestra en la Figura 8, el cronograma de actividades realizadas una vez que el diseño de bloques se llevó a cabo en el invernadero y fue seleccionada la variedad de semilla a utilizar. El tiempo total de la parte experimental en invernadero fue de 138 días a partir de la siembra, la cual se realizó en julio del 2019. En la cual se sembraron 600 semillas, una vez transcurrido el periodo de aclimatación, se realizaron las mediciones de las características morfológicas de las plantas: altura, diámetro de tallo cada siete días hasta el día 42 y el número de racimos una vez que se observaron frutos.

En el día 60 se realizó la elicitación de las plantas, la cual se llevó a cabo a través de aplicación foliar a punto de goteo y aplicación directa a raíz.

Finalmente, la cosecha de los frutos se realizó al día 138 para proceder con la parte de extracción de aceite en el laboratorio.

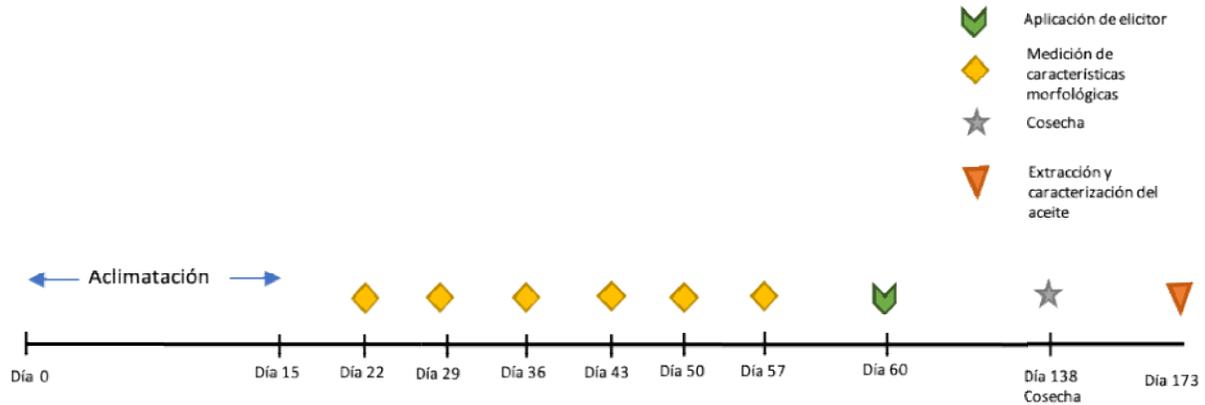


Figura 7. Cronograma de la parte experimental. Fuente: Elaboración propia.

5.6. Siembra y germinación

La siembra se realizó el 15 de julio de 2019. Se sembraron en total 600 semillas, dos por cada cavidad, a una profundidad de 30 cm, con distancia de 0.7 metros entre cada surco. El invernadero disponía de 10 líneas, con una separación de 1 m entre líneas, donde se colocaron 30 semillas por línea como se observa en la Figura 8.



Figura 8. Siembra en invernadero. Fuente: Elaboración propia.

La germinación de la higuierilla se realizó en semillero de plástico de 68 cavidades y directamente en el invernadero (Figura 9). Para el semillero se utilizó como sustrato una mezcla de peatmoss y vermiculita 4 a 1 respectivamente. Se llenaron las charolas con el sustrato humedecido y se sembraron las semillas a 0.5 mm profundidad para favorecer la germinación. De las plantas que no germinaron se

realizó el trasplante de los semilleros al invernadero cuando presentó de 3 a 4 hojas verdaderas, así como de las plantas donde hubo dos emergencias en el invernadero.



Figura 9. Germinación. Fuente: Elaboración propia.

5.7. Mantenimiento del cultivo invernadero

Se realizó una poda de las plantas debido a que se observó heterogeneidad en el crecimiento, además de las plantas que presentaron una emergencia de una segunda planta, se realizó una separación y se trasplantó en donde no hubo emergencia.

Se realizaron actividades de deshierbe y limpieza del área de invernadero cada 2 días para evitar la proliferación de malezas.

Para la fertilización se utilizó una dosis de NPK 60-40-00 la cual el INIFAP (2018) reporta, se aplicó la mitad del nitrógeno y todo el fósforo al momento de la siembra y el resto del nitrógeno a los 35 días después de la emergencia. Se utilizó nitrato de amonio y ácido fosfórico grado técnico para la fertilización.

El sistema de riego se realizó por goteo con 2 mangueras ciegas marca Toyodrip de 16 mm, con un flujo de 1.0 L x h por hilera, para distribuir el agua de mejor manera para las raíces de la planta (Figura 10).



Figura 10. Sistema de riego. Fuente: Elaboración propia.

5.8. Mediciones morfológicas de las plantas.

Una vez que se arrojaron hojas verdaderas y después de un periodo de climatización de 15 días, se inició la medición morfológica de las 300 plantas sembradas (altura, grosor de tallo y número de racimos) las variables altura y diámetro se llevó a cabo con ayuda de una cinta métrica cada siete días durante 42 días, el número de racimos se cuantificó a los 28 y 42 días. Las mediciones morfológicas se llevan a cabo para evaluar la homogeneidad del cultivo.

5.9. Elicitación

La elicitación se realizó simultáneamente a punto de goteo y de manera directa 50 mL, por aplicación foliar utilizando un tanque de fumigación en el cual, se colocaron de forma independiente las diferentes soluciones de ácido salicílico a evaluar: 0, 100, 300, 600 y 900 μM ., correspondiente a control, T1, T2, T3, T4 respectivamente; la aplicación se realizó a los 60 días. La elicitación directa se aplicó con las mismas soluciones de ácido salicílico directamente a la raíz con ayuda de un vaso de precipitado de 50 mL (Figura 11). La elicitación se llevó a cabo antes del proceso de floración.



Figura 11. *Elicitación a punto de goteo.* Fuente: Elaboración propia.

5.10. Evaluación morfológica de las semillas

Una vez recolectadas los frutos, se pusieron a secar al sol en el Laboratorio de compuestos naturales e insecticidas de la Universidad Autónoma de Querétaro durante dos semanas; posteriormente se colocaron en bolsas de papel estraza perfectamente identificadas y se colocaron en un secador solar en el mismo laboratorio durante una semana, se pesaron los frutos secos obtenidos.

Finalmente se extrajeron las semillas de los frutos secos con guantes de carnaza y pinzas, nuevamente se colocaron las semillas en bolsas de estraza identificadas previamente, la evaluación del tamaño de semilla se realizó tomando una muestra al azar de 30 semillas por lote de plantas obteniendo así un total de 180 semillas completamente maduras, esto nos garantizó contar con la mayor diversidad de pesos y tamaños de semillas. Se midieron las siguientes variables en las semillas: grosor, largo de extremo a extremo y el ancho en la parte central, ambas medidas se tomaron con un vernier (mm) (Rodríguez et al., 2001) como se muestra en la Figura 12.



Figura 12. *Proceso de extracción de semillas desde la cosecha.* Fuente: Elaboración propia.

Se determinó el peso de las semillas en gramos tomando al azar 100 semillas correspondientes a cada lote (tratamiento) y para el peso volumétrico se utilizó una probeta de 100 mL, la cantidad de semilla contenida en esta se pesó en una balanza analítica y el valor del volumen se expresó en gramos por hectolitro (g HL^{-1}) (González-Torres et al., 2008) Como se muestra en la Figura 13.



Figura 13. *Determinación de peso volumétrico de semillas.* Fuente: Elaboración propia

5.11. Obtención y evaluación del contenido de ácidos grasos del aceite de higuera

Las semillas recolectadas se secaron en una estufa para reducir la humedad a un valor adecuado para la extracción. Posteriormente se calcinaron 100 g de semilla a 500 °C para obtener un mayor rendimiento al realizar la molienda. Finalmente, las semillas de higuera se molieron utilizando un molino y se extrajeron utilizando un equipo Soxhlet a una temperatura de 45 – 50 °C en un tiempo de 6 - 8 horas hasta que se completó la extracción. El contenido de aceite se determinó como la diferencia en peso de la semilla de higuera seca antes y después de la extracción. El proceso puede observarse en la Figura 14. La determinación se realizó por triplicado (Negm et al., 2016; Vasco-Leal et al., 2017).



Figura 14. Proceso extracción de aceite en semillas por método Soxhlet. Fuente: elaboración propia

La determinación de ácidos grasos se realizó utilizando un equipo de cromatografía de gases acoplado a masas marca Agilent, el cual está equipado con biblioteca de referencia NIST (National Institute of Standards and Technology). Se utilizó una columna DB-5MS, utilizando una temperatura de la columna de 80 °C durante 0 min, aumentando a 150 °C a 10 °C /min, posteriormente 250 °C a 5 °C /min, finalmente se subió a 270 °C a 20 °C manteniendo la temperatura durante 6 min. La temperatura del inyector fue de 270 °C, el modo de inyección fue por split; utilizando un split 1:20; se

inyectó un volumen de 2µl del aceite. Como gas portador se utilizó Helio; con una temperatura de la interfaz 270 °C; adquisición de masa rango, m / z 55-550. Los compuestos se identificaron comparando sus índices de retención con los de la biblioteca NIST (Mahalakshmi et al., 2013).

5.12. Cromatografía en columna abierta y cromatoplaaca para la identificación de ricinina

La identificación de los cristales se realizó por cromatografía empacada con sílica gel 60, usando como eluyente metanol para conocer su composición química. El sistema de solvente utilizado fue Metanol:Cloroformo utilizando un agente revelador.

Para llevar a cabo el proceso, se pesaron 2 g de extracto en caja petri, se redisolieron en 20 mL de metanol y se colocaron en el ultrasonido por 30 minutos a 35 °C, el extracto obtenido se colocó en una caja petri, la cual contenía sílica gel 60, posteriormente se colocó en la estufa a 60 °C para secarla, se degasificó la sílica con ayuda de la bomba y matraz Kitazato y cloroformo durante 5 minutos. Se llenó la columna con sílica y cloroformo y se rellenó dos veces. Posteriormente se hizo una mezcla de Metanol:Cloroformo con el objetivo de separar las fracciones, las cuales fueron de 150 mL como se puede observar en la Figura 15.

Se realizaron las siguientes fracciones: 3%, 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 35% y 65%. A las fracciones colectadas correspondientes al 20%, 25%, 30% y 35% se les realizaron 3 lavados, para posteriormente calentarlas y agitarlas. Para clarificar la muestra, se le adicionó carbón activado.



Figura 15. *Proceso de extracción de muestra para análisis de cromatografía de columna abierta y cromatoplaqa para identificación de ricinina.* Fuente: Elaboración propia.

5.13. Cuantificación del alcaloide ricinina en semilla

Para determinar la presencia de ricinina, se trabajó con el residuo de la semilla resultante de la extracción del aceite, se realizó la extracción en un matraz erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de metanol, se calentó a una temperatura de 50 °C con un sonicador marca Elma, modelo Elmasonic S 40 H por 30 minutos y con la función sweep, posteriormente se eliminó el disolvente a presión reducida en un evaporador rotatorio.

Se pesaron 5 mg de la muestra y se disolvieron en 5 mL de metanol, luego se tomó en un vial una muestra de 50 μ L de cada muestra y se procedió a realizar una cromatoplaqa con las muestras y con una muestra de ricinina estándar. Como eluyente se usó mezcla de cloroformo:metanol 50%:50% V:V como se puede observar en la Figura 16.



Figura 16. *Obtención del extracto metanólico de ricinina.* Fuente: Elaboración propia.

5.14. Análisis estadístico

Los datos de los rendimientos de aceite, ricinina, mediciones morfológicas de plantas, mediciones morfológicas de semilla se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con prueba post- hoc Tukey con un intervalo de confianza del 95% con el software Minitab versión 17.1.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Preparación del área experimental

Previo a la siembra se realizó el acondicionamiento del invernadero para lo cual se llevó a cabo el retiro de maleza y un deshierbe cada dos días para evitar el crecimiento de la misma maleza, adicionalmente se aplicó herbicida a los extremos del invernadero. Se compró cintilla marca Toyodrip para facilitar el riego por goteo; se repararon y cambiaron las válvulas que ya no servían y se cambió el techo en las partes dañadas con el objetivo de mantener todas las plantas bajo las mismas condiciones climáticas. Para evitar la proliferación de plagas se utilizaron trampas cromáticas.

En la Figura 17 se muestran los pasos que se realizaron para llevar a cabo el acondicionamiento del invernadero.



Figura 17. Acondicionamiento de invernadero. Fuente: Elaboración propia.

6.2. Análisis de suelo

Los resultados obtenidos por el Laboratorio Fundación Produce A.C. indicaron que el suelo del invernadero podría ser utilizado para la siembra de Higuierilla. El pH obtenido fue de 7.69 lo cual es medianamente alcalino. De acuerdo con Reed (1976) el pH

óptimo de crecimiento de la planta es de 4.5 a 8.3, demostrando la viabilidad de cultivo en el invernadero.

El contenido de nitrógeno del suelo que reporta Campos, et al. (2014) en su estudio realizado en Oaxaca fue de 4.3 mg Kg⁻¹, mientras el reporte realizado en el invernadero fue de 6.3 mg Kg⁻¹

El invernadero está localizado a una altitud de 1900 msnm, Hernández Martínez y Montes Hernández (2018) reportan que el potencial productivo de la Higuierilla variedad Guanajuatoil es medio en una altura de 1800 – 2500 msnm.

Se monitoreo la temperatura durante los 138 días, obteniendo un promedio de 27.8 °C +/- 4.7 °C, el potencial productivo reportado por Hernández Martínez y Montes Hernández (2018) en un rango de 15 a 30 °C es alto.

Contrastando los resultados obtenidos en los análisis realizados versus la bibliografía, se demostró que el suelo del invernadero era viable para la realización del cultivo de Higuierilla (*Ricinus communis* L.); los resultados obtenidos del análisis de suelo utilizado para esta investigación se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Comparación del suelo de invernadero vs condiciones óptimas para cultivo de *R. communis* L.

Parámetro	Resultado	Óptimo	Referencia
pH	7.69	4.5 – 8.3	Reed (1976)
Nitrógeno	4.3 mg Kg ⁻¹	6.3 mg Kg ⁻¹	Campos et al. (2014)
Temperatura	27.8 °C +/- 4.7 °C	15 a 30 °C	Hernández Martínez & Montes Hernández (2018)
Recomendación: El suelo es óptimo para su uso.			

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados obtenidos del análisis de suelo utilizado para esta investigación se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados de análisis de suelo de invernadero.

Parámetro		Resultado	Unidades	Interpretación
pH (En relación 1:2)		7.69	Unidades	Medianamente alcalino
Conductividad eléctrica		0.093	dSm ⁻¹	Efectos imperceptibles de salinidad
Materia Orgánica		3.65	%	Alta
Nitrógeno Mineralizable		63.88	KN/Ha	Aporte por ciclo (**)
Textura	Arena	32.36	%	Arcilloso
	Arcilla	45.64		
	Limo	22.00		
Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)		25.66	Cmol(+)/Kg	Alta
Capacidad de campo		34.08	%	No especificado
Punto de marchitez		18.52	%	No especificado
Parámetro		Cmol(+)/Kg	mg/Kg	Interpretación
Calcio (Como Ca)		16.96	6,797.51	Alto
Magnesio (Como Mg)		4.65	1,130.87	Alto
Potasio (Como K)		2.44	561.75	Alto
Sodio (Como Na)		1.61	627.78	Alto

Fuente: Elaboración propia basado en Fundación produce A.C., 2019.

6.3. Diseño de experimentos de siembra bloques al azar.

De acuerdo con Martínez Rueda (2015) el diseño de bloques completos al azar es uno de los métodos experimentales que han presentado mayor factibilidad y aplicación dentro de la investigación agronómica debido a que es de gran utilidad para experimentos de campo donde no es muy elevado el número de tratamientos y el área experimental presenta un gradiente de productividad predecible, por esta razón el invernadero se dividió en cuatro bloques con el objetivo de tener una mayor muestra

representativa del análisis realizado, tratando de evitar sesgos por efectos de la luz solar. La distribución de la dosificación de los tratamientos, también fue realizada al azar.

Una de las principales características de este diseño es la presencia de bloques o franjas de las mismas dimensiones el cual debe contener todos los tratamientos a analizar; el uso de bloques nos ayuda a reducir el error experimental de fuentes de variación conocidas sobre las unidades experimentales.

Se observó una variación significativa entre bloques, pero no así entre tratamientos

6.4. Material vegetal utilizado

Inicialmente se había seleccionado la variedad Israelí para realizar el trabajo de campo, sin embargo, no se obtuvieron resultados satisfactorios con esta especie debido a que el porcentaje de germinación fue menor al 5%, esto se pudo deber a que las semillas utilizadas no se encontraban en las condiciones más apropiadas de almacenamiento, humedad y vida útil como latencia impuesta y latencia innata.

Estas semillas se utilizan en el estado de Querétaro para su investigación en el Campus Conca en el Municipio de Jalpan de Serra cuyas condiciones climáticas de acuerdo a lo reportado por INEGI (2018) presentan una temperatura promedio de 23 °C con una altura de 760 msnm y una Humedad Relativa promedio de 83%. En contraste con el Municipio del Marqués, donde se encuentra ubicado el invernadero, donde se presenta una temperatura promedio de 18 °C a una altura de 1920 msnm y una Humedad Relativa promedio de 43%.

Se realizó una investigación de qué variedad de Higuierilla era más factible que germinara bajo las condiciones climatológicas y de terreno disponibles en nuestra área de trabajo, encontrando así, que la variedad Guanajuatol cumplía con las características óptimas para ser sembrada en el invernadero. Esta especie ha sido altamente estudiada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas

y Pecuarias (INIFAP) del estado de Guanajuato, Estado colindante con Querétaro y que presenta características similares de terreno y clima.

6.5. Cronograma de parte experimental

De acuerdo con Hernández Martínez y Montes Hernández (2018) el tiempo de cosecha de la higuera variedad Guanajuatoil es de 135 a 145 días después de que ha sido sembrada. La siembra realizada en el invernadero del campus Amazcala fue cosechada a los 138 días a partir de la siembra. Como menciona Llaven Valencia, G. et al. (2019) el tiempo de cosecha varía dependiendo de la variedad utilizada, oscilando entre los 138 a 166 días resultado que obtuvo después de sembrar ocho variedades en el Estado de Sinaloa.

Por su parte, Barrios-Gómez et al. (2018) evaluó los ciclos de crecimiento de 16 genotipos de higuera provenientes de los estados de Chiapas, Morelos y Jalisco y el estudio fue llevado a cabo en el estado de Morelos en el cual se observó que el tiempo de cosecha fue entre 120 y 150 días, similar a lo que se obtuvo en esta investigación (138 días).

6.6. Siembra y germinación

La siembra se realizó de manera tradicional colocando dos semillas por orificio a lo largo de cada hilera del invernadero, sumando un total de 600 semillas sembradas. De manera paralela se realizó una siembra en semilleros con el objetivo de tener plántulas disponibles para trasplante en caso de que no germinaran en su totalidad las sembradas en el invernadero. Se utilizaron 15 de estas plantas para trasplantarlas al invernadero. Así mismo, de las plantas sembradas en invernadero inicialmente, 20 germinaron doble, las cuales fueron retiradas para ser trasplantadas donde no hubo germinación, como se muestra en la Figura 18.



Figura 18. *Trasplante de Higuerrillas con doble germinación.* Fuente: Elaboración propia.

6.7. Mantenimiento del invernadero

Durante el tiempo de cultivo, se monitorearon las condiciones climáticas y de Humedad Relativa del invernadero, con el objetivo de evaluar si hubiese existido alguna anomalía en ellas, que afectaran el desarrollo de las plantas. El monitoreo de la Humedad Relativa y Temperatura del invernadero durante esta investigación se muestran en la figura 19.

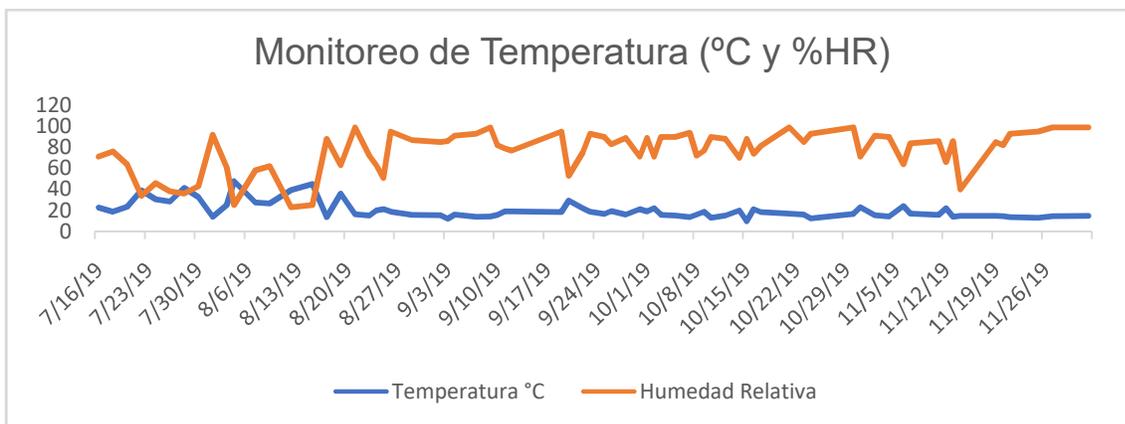


Figura 19. *Monitoreo de Temperatura y Humedad Relativa.* Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 4 se muestran los resultados de la temperatura y Humedad Relativa del invernadero, de acuerdo con Lobato (2008), la Higuierilla se adapta a zonas con un fotoperiodo mayor a 12 horas, con humedades < 50% su adaptación es óptima en climas templados y tropicales, donde las temperaturas favorecen su crecimiento durante todo el año. En regiones húmedas, frías y costeras la especie no se desarrolla adecuadamente, debido al ataque de enfermedades provocadas por hongo que se desarrolla en Humedades Relativas altas.

Tabla 4. *Comparación de condiciones climáticas obtenidas en el invernadero.*

Condiciones climáticas	En invernadero	Condiciones óptimas
Temperatura	27.8 °C	15 - 28 °C
Humedad Relativa	43 %	< 50 %
Fotoperiodo	14 h luz / 10 h oscuridad	12 h luz / 10 oscuridad

Fuente: Elaboración propia basado en Hernández Martínez & Montes Hernández (2018).

Como se puede observar en los resultados del monitoreo de condiciones climáticas realizado, las condiciones de trabajo fueron adecuadas para el buen desarrollo de las plantas, comprobando que la zona de Amazcala, ubicado en el Municipio del Marqués, Querétaro es apto para el desarrollo de la especie Guanajuatol y su explotación.

6.8. Mediciones morfológicas de las plantas.

Para tener un correcto monitoreo del crecimiento de las plantas es necesario medir las características morfológicas de las plantas como es el diámetro de los tallos, altura y número de frutos. Como reporta Mostacedo, B., & Fredericksen, T. (2000), la altura es uno de los parámetros principales que se mide como característica de crecimiento en una vegetación en estudio, esta altura se puede medir dependiendo del interés que se tenga, puede ser cualitativa o cuantitativa, para fines de este estudio, las mediciones realizadas fueron cuantitativas con el objetivo de tener un análisis estadístico del mismo.

La medición del diámetro de tallo es uno de los principales parámetros de mayor uso para el estudio de ecología vegetal; Román de la Vega, et al. (1994), expone que el diámetro consiste en determinar la longitud de la recta que pasa por el centro del círculo y termina en los puntos en que toca toda la circunferencia. Es a través del diámetro que es posible medir el crecimiento de las plantas gracias al desarrollo de la circunferencia del tallo que se monitorea periódicamente; la medición del diámetro puede llevarse a cabo mediante una forcípula o una cinta métrica. En el caso de nuestro estudio realizado, se llevó a cabo la medición del diámetro con ayuda de una cinta métrica.

Como se puede observar en la Tabla 5. Los resultados del diámetro son el promedio de 60 plantas \pm desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencia estadística entre columnas a través de la Prueba de Tukey, $p = 0.05$.

Se puede concluir que no existió diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento del diámetro de las plantas entre bloques.

Tabla 5. *Diámetro del tallo de las plantas de Ricinus communis L. antes del tratamiento con ácido salicílico a los días 7, 14, 21, 28, 35 y 42 después de la siembra.*

Tratamiento (μM)	Diámetro de tallo a 7 días (cm)	Diámetro de tallo a 14 días (cm)	Diámetro de tallo a 21 días (cm)	Diámetro de tallo a 28 días (cm)	Diámetro de tallo a 35 días (cm)	Diámetro de tallo a 42 días (cm)
900	4.36 \pm 0.81a	5.92 \pm 1.10a	6.56 \pm 0.95a	7.12 \pm 0.87a	7.95 \pm 0.90a	8.84 \pm 0.76a
600	4.09 \pm 0.65a	5.71 \pm 0.66a	6.33 \pm 0.55a	7.19 \pm 0.46a	8.09 \pm 0.45a	8.83 \pm 0.33a
300	4.42 \pm 0.95a	6.05 \pm 0.95a	6.74 \pm 0.92a	7.45 \pm 0.89a	8.29 \pm 0.97a	9.11 \pm 0.82a
100	4.63 \pm 0.71a	6.14 \pm 0.66a	6.75 \pm 0.68a	7.31 \pm 0.61a	8.26 \pm 0.80a	9.19 \pm 0.88a
0	4.89 \pm 0.51a	5.60 \pm 1.45a	6.42 \pm 0.97a	7.07 \pm 0.97a	7.83 \pm 0.90a	8.65 \pm 0.71a

Fuente: Elaboración propia

El diámetro de tallo es el promedio de 60 mediciones. Letras diferentes indican diferencia estadística entre columnas Prueba de Tukey, $p = 0.05$. Fuente: elaboración propia.

En la Tabla 6, se presentan las mediciones de altura realizadas cada siete días. Los resultados son el promedio de 60 plantas \pm desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencia estadística entre columnas a través de la Prueba de Tukey, $p = 0.05$.

Por otra parte, se puede observar en los resultados que no existió diferencia significativa en la altura entre los bloques.

Tabla 6. *Altura de las plantas de Ricinus communis L. antes del tratamiento con ácido salicílico a los días 7, 14, 21, 28, 35 y 42 después de la siembra.*

Tratamiento (μ M)	Altura a 7 Días (cm)	Altura a 14 Días (cm)	Altura a 21 Días (cm)	Altura a 28 Días (cm)	Altura a 35Días (cm)	Altura a 42 Días (cm)
900	58.21 \pm 16.06 a	98.28 \pm 17.19 a	116.85 \pm 18.74 a	140.74 \pm 22.06 a	161.28 \pm 19.51 a	195.68 \pm 26.92 a
600	51.05 \pm 11.15 a	91.17 \pm 15.37 a	114.97 \pm 16.56 a	146.69 \pm 17.82 a	171.42 \pm 15.00 a	216.27 \pm 16.77 a
300	57.00 \pm 9.44 a	96.00 \pm 14.72 a	118.13 \pm 16.04 a	147.26 \pm 18.96 a	193.04 \pm 43.10 a	210.64 \pm 27.09 a
100	54.70 \pm 8.38 a	93.54 \pm 8.71 a	115.72 \pm 9.10 a	143.37 \pm 14.39 a	168.76 \pm 13.47 a	209.39 \pm 23.22 a
0	58.31 \pm 13.80 a	96.8 \pm 13.90 a	115.22 \pm 13.69 a	145.53 \pm 14.51 a	170.14 \pm 12.11 a	207.38 \pm 26.58 a

La altura es el promedio de 60 mediciones. Letras diferentes indican diferencia estadística entre columnas Prueba de Tukey, $p = 0.05$. Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 7 se muestran los datos con el análisis del número de racimos antes de la adición del tratamiento, los resultados son el promedio de 60 plantas \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia estadística entre columnas Prueba de Tukey, $p = 0.05$.

Los resultados arrojados demuestran que no existió diferencia significativa entre muestras y bloques.

Tabla 7. Número de racimos a los días 28 y 35 días después de la siembra antes del tratamiento con ácido salicílico en plantas de *R. communis* L.

Tratamiento (μM)	Número de racimos a los 28 días	Número de racimos a los 42 días
900	5 \pm 3 a	5 \pm 3 a
600	4 \pm 3 a	4 \pm 3 a
300	4 \pm 2 a	5 \pm 3 a
100	4 \pm 3 a	4 \pm 3 a
0	4 \pm 3 a	4 \pm 3 a

El número de racimos es el promedio de 60 mediciones. Letras diferentes indican diferencia estadística entre columnas Prueba de Tukey, $p = 0.05$. Fuente: Elaboración propia.

6.9. Evaluación morfológica de las semillas

De acuerdo con la SAGARPA (2018) El análisis de peso de 100 semillas se realiza con base a las reglas vigentes de la Asociación Internacional de Pruebas de Semillas (ISTA) para poder realizar esta prueba, las semillas deben estar puras, retirando cualquier impureza (maleza, cascarillas, otro tipo de semillas, entre otras).

En la Tabla 8 se muestra el análisis de resultados del peso total de las semillas por tratamiento, como se puede observar existe una diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos de acuerdo con la Prueba de Tukey, $p = 0.05$ donde letras diferentes indican diferencia estadística.

Se puede analizar en los resultados que, a mayor concentración de ácido salicílico adicionado en los tratamientos, el peso de 100 semillas aumentó, sin embargo, a la concentración de 100 μM existió un efecto eustrésico, pero a concentraciones mayores de 300 μM , la elicitación tiene efecto positivo en el peso de las semillas.

Para las mediciones de la morfología de las semillas (largo, ancho y grosor) no hubo diferencia significativa entre tratamientos. Sin embargo, para el peso de 100 semillas,

las concentraciones de 600 μM y 900 μM tuvieron un peso superior en 25 % y 14 % respecto al control. Lo cual se reflejó en un mayor contenido de aceite.

Tabla 8. *Peso total de semillas de Ricinus communis L. por tratamiento.*

Tratamiento con AS (μM)	Peso total de semillas (Kg)
900	24.70 \pm 2.89 a
600	22.33 \pm 3.12 ab
300	21.50 \pm 1.15 bc
100	17.97 \pm 1.58 d
0	19.65 \pm 2.10 cd

El peso de semillas es el peso total de las semillas por tratamiento Letras diferentes indican diferencia estadística Prueba de Tukey, $p = 0.05$. Fuente: elaboración propia.

En la Tabla 9 podemos observar el análisis de las características morfológicas (Longitud, Ancho y Espesor) de las semillas por tratamiento, como se puede observar no existe una diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos de acuerdo con la Prueba de Tukey, $p = 0.05$.

Tabla 9. *Características morfológicas de semillas de plantas de R. communis L.*

Tratamiento con AS (μM)	Longitud de la semilla (mm)	Ancho de la semilla (mm)	Espesor de la semilla (mm)
900	14.37 \pm 0.13 a	9.10 \pm 0.09 a	6.66 \pm 0.06 a
600	14.23 \pm 0.12 a	9.03 \pm 0.14 a	6.64 \pm 0.07 a
300	14.37 \pm 0.12 a	9.08 \pm 0.10 a	6.64 \pm 0.06 a
100	14.30 \pm 0.10 a	9.10 \pm 0.06 a	6.60 \pm 0.06 a
0	14.39 \pm 0.30 a	9.07 \pm 0.08 a	6.65 \pm 0.11 a

La longitud, el ancho y el grosor de la semilla son el promedio de la medida de 100 semillas. Letras diferentes indican diferencia estadística entre columnas Prueba de Tukey, $p = 0.05$. Fuente: Elaboración propia.

Los resultados obtenidos en la medición de semillas demuestran que no existe diferencia significativa entre muestras y tratamientos en ninguna de las características de longitud, ancho y espesor.

6.10. Elicitación

El proceso de elicitación utilizando Ácido Salicílico a diferentes concentraciones se aplicó basado en el estudio realizado por Mahalaksmi et al. (2013) quien trabajó con *Jatropha curcas* L., perteneciente a la familia Euphorbiaceae misma que pertenece *Ricinus communis* L. Diversos autores han reportado que la aplicación exógena de este compuesto ha tenido un efecto positivo en el incremento de metabolitos secundarios en distintas especies, por ejemplo, jitomate y uvas (Saw et al., 2010; Vázquez Díaz et al., 2016).

6.11. Obtención y evaluación del contenido de ácidos grasos del aceite de higuera

Una vez realizada la cosecha y el tratamiento de secado de los frutos, se obtuvieron las semillas. Originalmente la técnica de extracción de aceite que se implementó fue a través de sonicación con el uso de un ultrasonido, dicha técnica se realizó de acuerdo a lo citado por González Molina (2013); sin embargo, los resultados obtenidos no fueron satisfactorios debido a que el rendimiento obtenido no superó el 20%; por esta razón se buscó una técnica de extracción tradicional y más compleja como fue el Soxhlet, donde se obtuvo un rendimiento del 41%, cuyo principio de extracción está basado en la solubilidad de las grasas, las cuales se disuelven en disolventes no polares, como el hexano, éter de petróleo entre otros, haciendo entonces una extracción sólido-líquido para posteriormente recuperarse con ayuda de un evaporador rotatorio con el cual se destiló la muestra bajo el principio de diferentes puntos de ebullición. Una vez recuperado el aceite, se eliminó el exceso de solvente en la muestra con ayuda de un baño María; cuando la muestra quedó libre de solvente, se cuantificó el contenido de aceite en base seca peso/peso. El proceso de extracción se muestra en la Figura 20.



Figura 20. *Proceso de extracción de aceite en semillas.* Fuente: Elaboración propia.

El análisis de ácidos grasos se llevó a cabo en un Cromatógrafo de Gases acoplado a Masas de la serie Agilent 7890A (Wilmington, DE, EE.UU.) y un detector Agilent simple cuadrupolo MS (modelo 5975C), con set de energía de electrones a 70 eV y el intervalo de masas 50-700 m / z. Una columna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm de diámetro interno x 0.25 lm) y un inyector splits/splitless (2 mm de diámetro). El inyector tenía una temperatura 250 °C. Se utilizó el cromatógrafo en modo splitless con un tiempo de 2.5 minutos sin splitless. La temperatura inicial del horno fue 100 °C durante 1 min y se elevó a 220 °C a 6 °C/min, se mantuvo durante 1.23 min, posteriormente se elevó a 290 °C a 10 °C/min, y luego se elevó a 310 °C a 40 °C/min, se mantuvo durante 7.5 min. La velocidad de flujo de gas acarreador (Helio) se mantuvo a 1 mL/min. El control de GC-MS y el procesamiento de datos se realizaron con ayuda del software Chem-Station (Agilent Technologies). Se utilizó como agente de derivatización, BSTFA (N, O-bis [trimetilsilil] trifluoroacetamida), se agitó durante 2 minutos a temperatura ambiente. El volumen de inyección fue de 200 μ L.

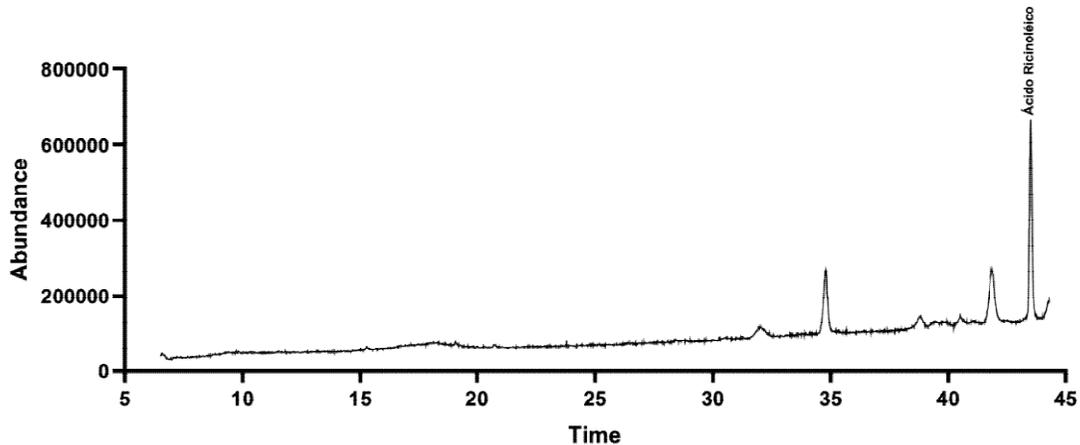


Figura 21. Cromatograma de estándar de ácido Ricinolico. Fuente: Elaboración propia obtenida a través del Software Chem Station, 2021.

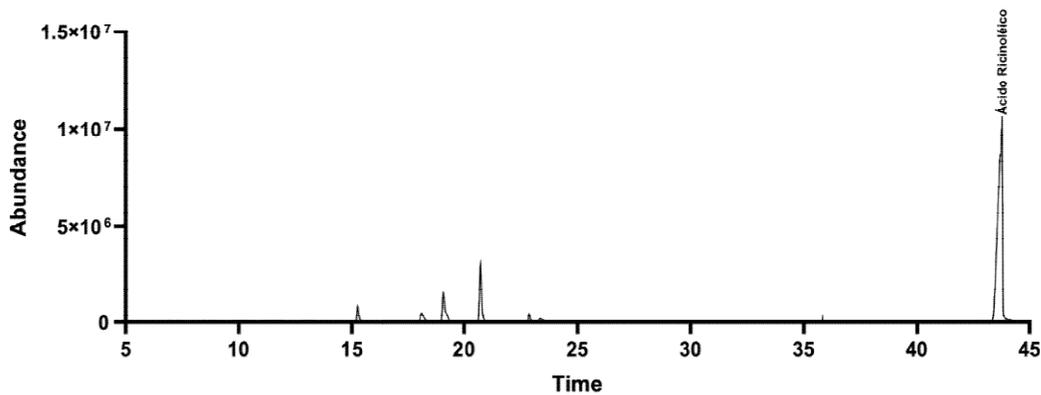


Figura 22. Cromatograma de muestra de ácido Ricinolico. Fuente: Elaboración propia a través del software Chem Station, 2021.

El efecto que produce la aplicación exógena del ácido salicílico en plantas en los metabolitos primarios y secundarios puede ser indirecto al alterar la síntesis de ácidos grasos como lo hace con la señalización de fitohormonas como el ácido jasmónico y las auxinas (Sánchez et al., 2010).

Otras investigaciones se han aplicado a distintas especies vegetales con el objetivo de estudiar las vías de síntesis de algunos metabolitos, Gutiérrez-Carbajal et al. (2010) sugiere que la aplicación exógena de ácido salicílico en concentraciones de .0001 a 10

µM incrementa el contenido de capsaicinoides en *Capsicum chinense* Jacq. y a su vez, está involucrada en la ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides además de estar acompañada de una gran actividad fotosintética y una variabilidad en el contenido de clorofila.

En la Tabla 10 se presentan los resultados obtenidos del contenido de aceite, así como el porcentaje de los diferentes ácidos grasos. Observándose que el ácido graso de mayor abundancia es el ácido ricinoléico, como lo describen Karleskind & Wolff (1996), Geethanjali et al. (2016), Román – Figueroa et al.(2020), Zavala-Gómez et al.(2021) De la misma manera se observa que la variedad Guanajuatoil utilizada en este estudio tiene un porcentaje menor de ácido ricinoléico, comparado con el reportado en la bibliografía del 80% y 90%. Esto se puede deber al estrés generado al ser cultivado en invernadero, debido a que ésta es una especie la cual se desarrolló para su cultivo a cielo abierto. Además del estrés el cual se generó por el uso de ácido salicílico, estos dos tipos de estrés pudieron generar que la cantidad de ácido ricinoléico fuera menor, a la reportada por otros autores.

Tabla 10. Contenido de aceite y composición de ácidos grasos de plantas de *Ricinus communis* L. tratadas con diferentes concentraciones de ácido salicílico.

Tratamiento con AS (µM)	Contenido de Aceite (%)	Ácido Ricinoléico (%)	Ácido Linoléico (%)	Ácido Oleico (%)	Ácido Linoleico (%)	Ácido Estearico (%)	Ácido Palmítico (%)
900	50.23 ± 1.55 a	71.72 ± 2.58 a	13.89 ± 2.25 a	6.61 ± 0.81 a	2.28 ± 0.35 a	3.26 ± 0.46 a	2.22 ± 0.68 a
600	43.75 ± 2.36 b	71.96 ± 2.62 a	12.49 ± 0.74 a	7.65 ± 3.07 a	2.41 ± 0.65 a	2.91 ± 0.36 a	2.57 ± 1.27 a
300	38.11 ± 0.78 c	74.39 ± 1.25 a	12.09 ± 0.57 a	6.20 ± 0.68 a	2.45 ± 0.39 a	3.00 ± 0.22 a	1.87 ± 0.22 a
100	34.89 ± 5.98 c	74.40 ± 1.24 a	12.02 ± 0.51 a	6.27 ± 0.49 a	2.39 ± 0.56 a	3.02 ± 0.51 a	1.91 ± 0.21 a
0	36.23 ± 4.17 c	74.74 ± 4.32 a	11.6 ± 2.08 a	5.81 ± 2.43 a	3.11 ± 0.28 a	2.82 ± 1.34 a	1.90 ± 0.86 a

El contenido de aceite y la composición de los ácidos grasos es el promedio de 3 repeticiones. Letras diferentes indican diferencia estadística entre columnas Prueba de Tukey, $p = 0.05$. Fuente: Elaboración propia.

Se puede observar que existió diferencia en el contenido de aceite bajo el efecto del ácido salicílico aplicado exógenamente como elicitador, observándose que existió mayor rendimiento en la producción de aceite conforme se incrementó la concentración de ácido salicílico, a una concentración de 900 μM se reportó el mayor rendimiento incremental del 39%. Wei et al. (2022) reportó en su investigación que la aplicación exógena de un elicitador como el ácido ascórbico incrementó la producción de ácidos grasos saturados/ insaturados en un 17% al activar el Ciclo de Krebs dando por resultado menor producción de malonil CoA, lo cual condujo a la reducción de la síntesis de citrinina, esta reacción bioquímica pudo ser similar a la encontrada en esta investigación con la disminución del ácido ricinoléico.

Por otra parte, no se observa diferencia significativa entre tratamientos en el contenido de los diferentes ácidos grasos característicos del aceite de ricino (ácido Ricinoléico, Linoléico, Oleico, Linoleico, Esteárico y Palmítico).

Sin embargo, el contenido de los ácidos grasos fue distinto a lo reportado por Geethanjali et al. (2016) y Román-Figueroa et al. (2020), los cuales reportan que los valores del ácido ricinoléico son aproximadamente del 90%, comparado con los obtenidos en este estudio, los cuales fueron ligeramente superiores al 70%.

De acuerdo a lo reportado en las referencias, los resultados del ácido ricinoléico más comúnmente encontrados para la variedad *Ricinus communis* L. oscilan entre el 80 y 90%; sin embargo, estudios realizados por Jachmanian et al. (2009) en Costa Rica y en Uruguay reportan valores del 72%, similares al obtenido en este estudio (Rivera-Brenes y Hernández-López, 2016).

6.12. Análisis de ricinina

Se realizó una cromatografía en columna abierta y cromatoplaca para la identificación de ricinina. Los cristales obtenidos de las fracciones metanólicas del 20%, 25% y 30% se les midió el punto de fusión con ayuda de un medidor de punto de fusión marca Stuart modelo SMP11, obteniendo como resultado un punto de fusión de 204 °C el cual se encuentra por encima de lo reportado en la hoja de especificación del estándar por Sigma Aldrich (2021) de 201 °C, esto se pudo deber a algunas impurezas presentes en las muestras.

Los análisis de HPLC se realizaron en un equipo de la marca Waters modelo Alliance (Milford, MA, USA) compuesto por una bomba cuaternaria modelo e2695 y un detector de arreglo de diodos modelo 2998. El manejo del equipo, la adquisición de los datos y el procesamiento de estos se realizó utilizando el software Empower3.

La identificación y cuantificación de la ricinina se realizó utilizando como fase estacionaria una columna C18 (5 µm, 150 x 4.5 mm); como fase móvil se utilizó agua acidulada con ácido acético a una concentración 0.0125N y acetonitrilo (CH₃CN), utilizando el gradiente mostrado en la Tabla 11. El flujo de la fase móvil fue de 1.0 mL/min. La longitud de onda de detección fue a 310 nm, se utilizó un volumen de inyección de 20 µL y un tiempo de análisis de 25 minutos.

Tabla 11. *Gradiente de elución para el análisis de ricinina.*

Tiempo (minutos)	Agua acético [0.0125N]	Acetonitrilo
0	95%	5%
2	95%	5%
5	85%	15%
20	50%	50%
25	95%	5%

Fuente: Elaboración propia.

Para la realización de la curva de calibración del estándar de ricinina se utilizaron las concentraciones mostradas en la Tabla 12.

Tabla 12. Datos de concentración y áreas bajo la curva para la ricinina.

[µg/L]	Área bajo la curva
0	0
6	425421
8	608784
16	1177116
20	1930221

Fuente: Elaboración propia.

La Figura 23 muestra el cromatograma de HPLC del estándar de ricinina y su espectro de absorción en UV-Vis. El tiempo de retención de las diferentes concentraciones de estándar de ricinina osciló entre 8,797 min y 8,814 min. Las áreas bajo la curva oscilaron entre 425,421 para las muestras de 6 µg mL⁻¹ y 1,930,221 para las muestras de 20 µg mL⁻¹ (Tabla 12).

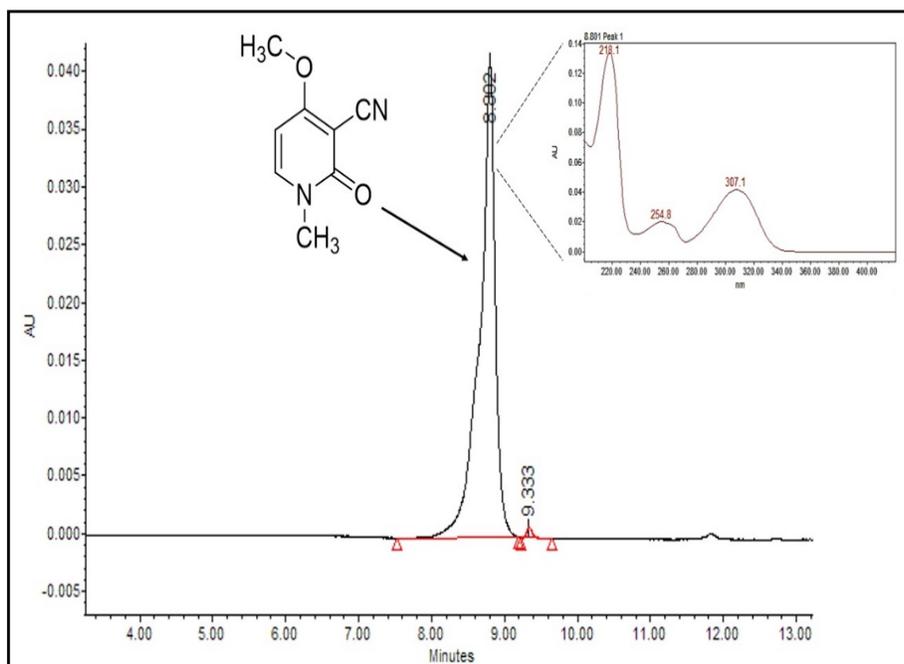


Figura 23. Cromatograma del estándar de ricinina y su espectro de Absorción en UV-Vis. Fuente: Elaboración propia.

Se alcanzó una alta linealidad de $R^2 = 0,9618$, lo que permitió su uso para la cuantificación de extractos de ricinina (Figura 24). Los límites de detección y cuantificación para la curva de calibración fueron $3,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $5,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

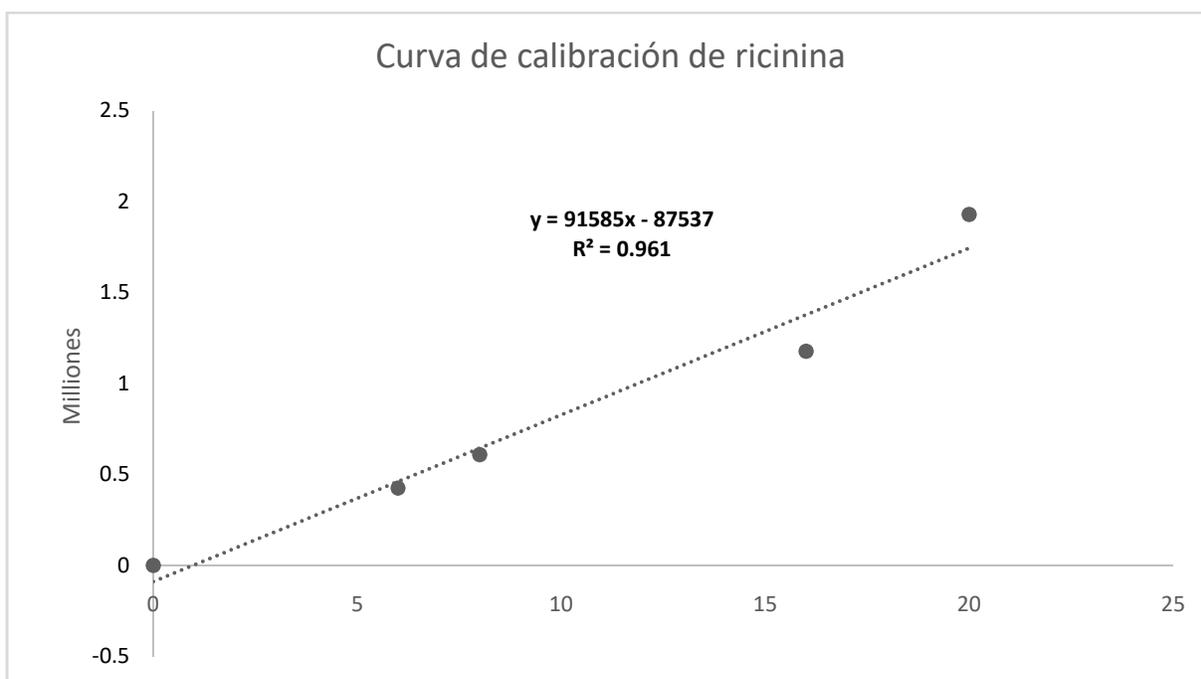


Figura 24. Curva de calibración de ricinina. Fuente: elaboración propia.

Los límites de detección y cuantificación para construir la curva de calibración fueron 3.2 y $5.3 \mu\text{g/mL}$ respectivamente. Todas las muestras presentaron concentraciones de ricinina entre 0.92 mg g^{-1} ($0 \mu\text{M}$) y 1.58 a mg g^{-1} ($600 \mu\text{M}$) de extracto como se observa en la Tabla 13, que se exhibe como una curva de hórmesis para este alcaloide usando ácido salicílico. La concentración máxima de esta curva se encontró a $300 \mu\text{M}$ de ácido salicílico y luego disminuyó a medida que aumentaba la concentración de ácido salicílico, como se ve en la Figura 25

La concentración de ricinina en el grupo control fue similar a la reportada por Nebo et al. 2019 (1,3921 a 1,442 mg g⁻¹) en hojas del extracto metanólico de *R. communis* L. Por otro lado, Flores-Macías et al. 2016 encontraron concentraciones en los extractos metanólicos de partes aéreas de *R. communis* (894, 101, 103 y 104.2 µg mL⁻¹). En este trabajo, las concentraciones de los extractos metanólicos fueron similares a las reportadas por Nebo et al 2019, las concentraciones variaron de 0.92 a 1.58 mg g⁻¹. Si bien los valores para las concentraciones de este trabajo fueron inferiores a los informados por Flores-Macías et al. 2016 que estuvieron entre 9.17 a 18.25 µg mL⁻¹.

Tabla 13. Concentración de ricinina y área bajo la curva de los extractos metanólicos de plantas de *Ricinus communis* L. tratadas con ácido salicílico.

Tratamiento	Peso de la muestra (mg)	Volumen Final (mL)	Área bajo la curva	Tiempo de retención (minutos)	Concentración(µg mL ⁻¹)	Concentración (mg g ⁻¹ extracto)
900 µM	11.5	1	1,449,959	8.790	16.78	1.46 ± 0.08
600 µM	10.2	1	1,301,895	8.739	15.17	1.48 ± 0.05
300 µM	11.5	1	1,584,532	8.823	18.25	1.58 ± 0.07
100 µM	10.2	1	1,091,388	8.868	12.87	1.26 ± 0.06
0 µM	10.0	1	752,871	8.926	9.17	0.92 ± 0.05

Fuente: Elaboración propia.

Los datos de concentración son el promedio de 3 medidas \pm desviación estándar con una Prueba de Tukey, $p = 0.05$.

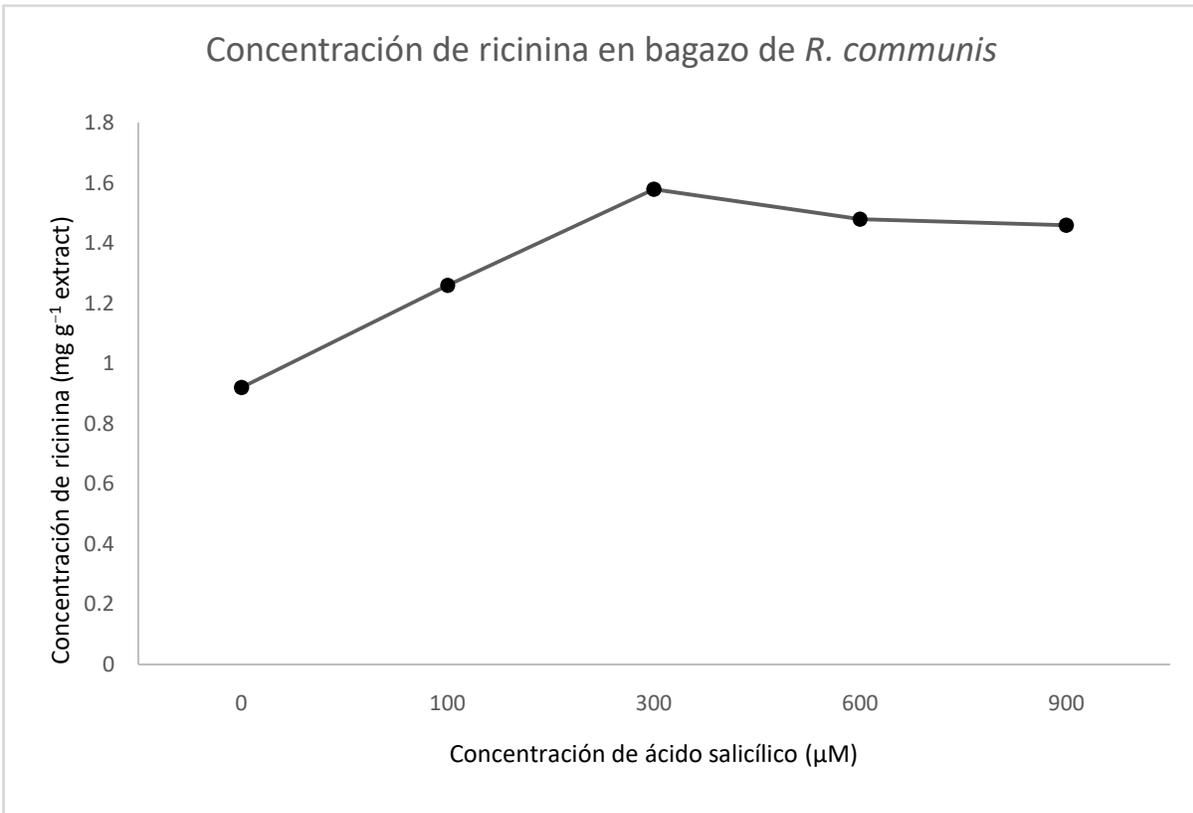


Figura 25. Comparación de ricinina en muestras de *Ricinus communis* L. tratadas con diferentes concentraciones de ácido salicílico. Fuente: Elaboración propia.

En las figuras 26, 27, 28, 29 y 30 se muestran los cromatogramas obtenidos de las muestras a las diferentes concentraciones a 0, 100, 300, 600 y 900 μM de ácido salicílico respectivamente.

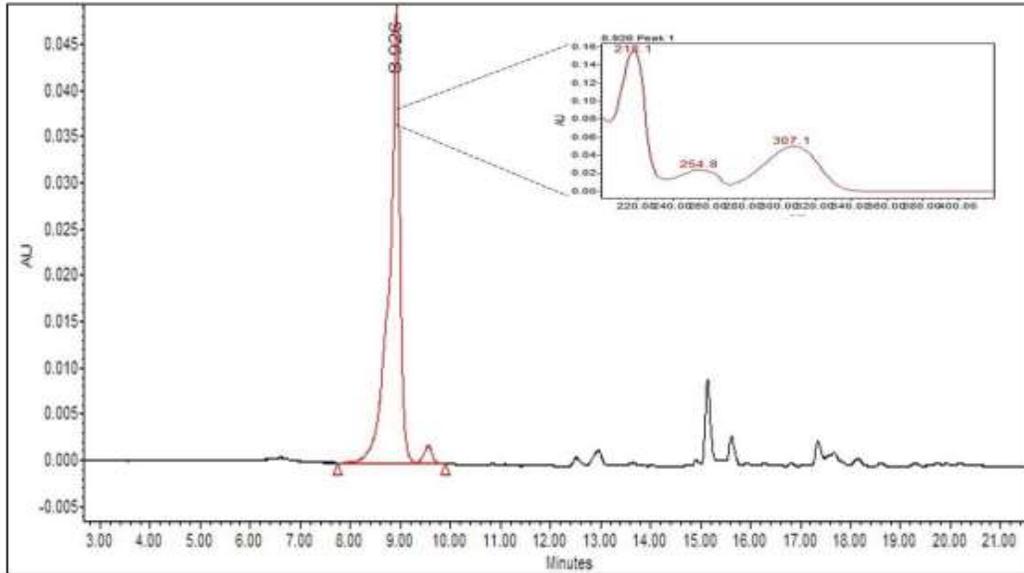


Figura 26. Cromatograma HPLC de la muestra obtenida con 0 μM ácido salicílico
Fuente: Elaboración propia obtenida a través del Software Empower, 2021.

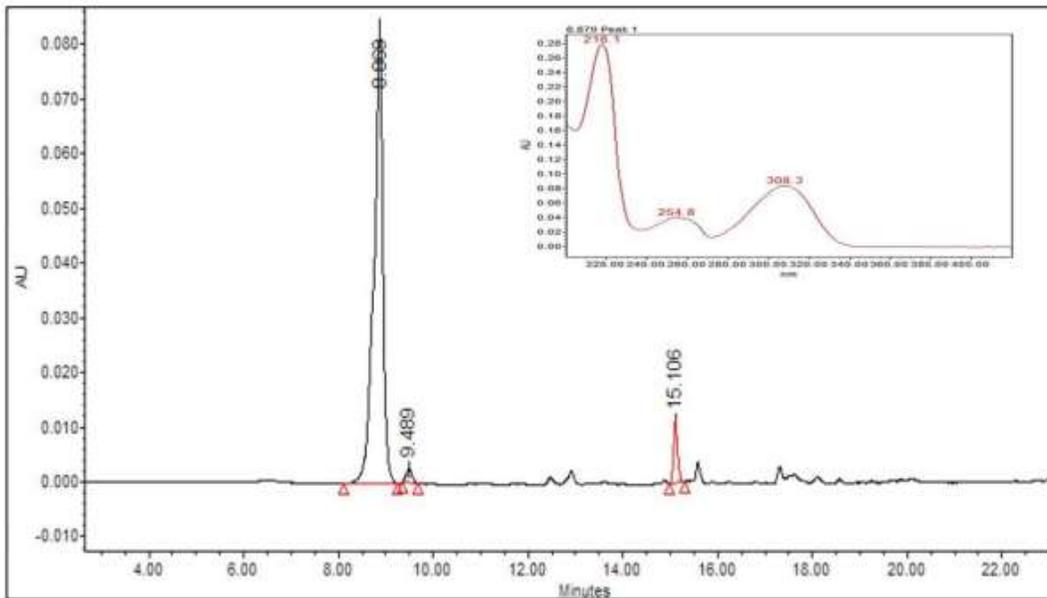


Figura 27. Cromatograma HPLC de la muestra obtenida con 100 μM ácido salicílico.
Fuente: Elaboración propia obtenidas a través del Software Empower, 2021.

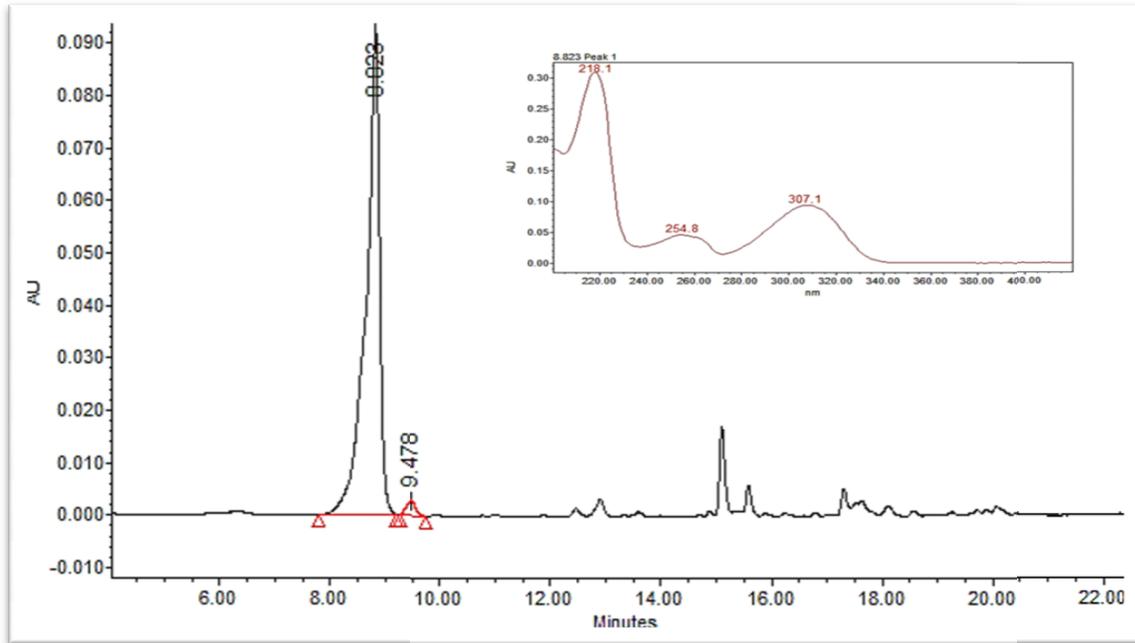


Figura 28. Cromatograma HPLC de la muestra obtenida con 300 μM ácido salicílico.

Fuente: Elaboración propia obtenidas a través del Software Empower, 2021.

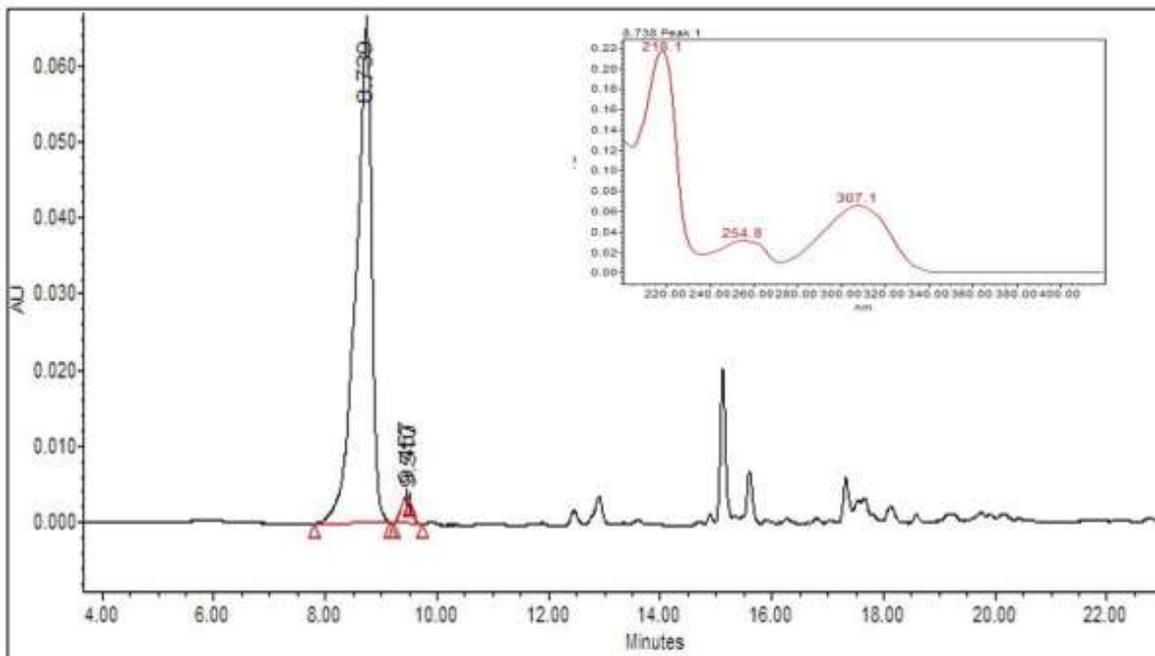


Figura 29. Cromatograma HPLC de la muestra obtenida con 600 μM ácido salicílico.

Fuente: Elaboración propia obtenidas a través del Software Empower, 2021.

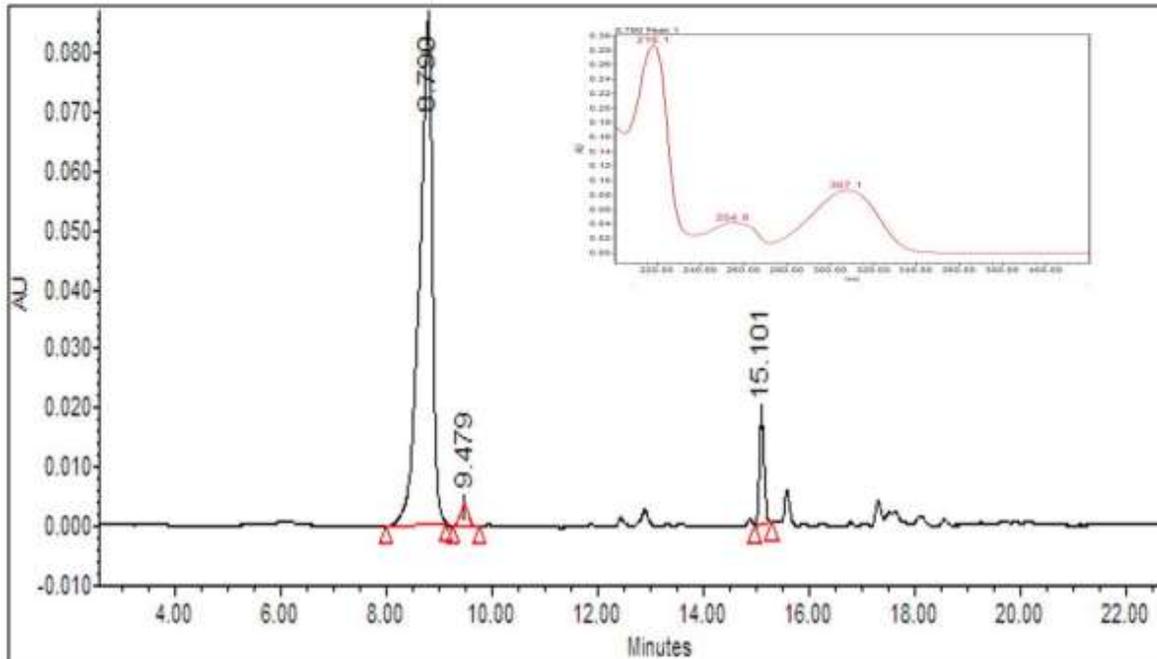


Figura 30 Cromatograma HPLC de la muestra obtenida con 900 μM ácido salicílico. Fuente: Elaboración propia obtenidas a través del Software Empower, 2021.

RESUMEN DE RESULTADOS

- No hubo diferencia significativa entre tratamientos en el crecimiento de las plantas.
- La aplicación foliar a punta de goteo y aplicación directa de ácido salicílico a diferentes concentraciones, tuvo un efecto deseado en plantas de *Ricinus communis* aumentando el contenido de aceite en las plantas.
- El ácido salicílico aplicado exógenamente a una concentración de 900 μM fue con el cual se obtuvo mayor rendimiento de aceite del 50.23%.
- La variedad Guanajuatol al ser una variedad mejorada para ser utilizada a campo abierto, al ser cultivada en invernadero pudo haberse estresado por lo cual la concentración de ácido ricinoléico fue menor al reportado por la mayoría de otros autores.
- Por otra parte, en la concentración de ricinina se observó un efecto de hórnesis obteniéndose la concentración mayor de 18.25 $\mu\text{g/mL}$ de ricinina a 300 μM de ácido salicílico.

CONCLUSIONES

Se acepta la hipótesis de esta investigación, confirmando que la elicitación con ácido salicílico aumenta la producción de ácidos grasos en la semilla de higuera y el alcaloide ricinina, bajo condiciones de invernadero, en comparación con sistemas de producción sin elicitación.

REFERENCIAS

- Amaral, P. M., Varanda, L. D., Nakashima, G. T., de Oliveira, P. B. M., Santos, L. R. O., de Pádua, F. A., & Yamaji, F. M. (2019). Use of castor oil plant pie for solid biofuel production. *Revista Brasileira de Energias Renováveis*, 8(3).
- Arellano, J. B., & De Las Rivas, J. (2006). Plantas y cambio climático. *Investigación y Ciencia*, 254, 42-49.
- Baenas, N., García-Viguera, C., & Moreno, D. A. (2014). Biotic elicitors effectively increase the glucosinolates content in Brassicaceae sprouts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(8), 1881-1889.
- Barrios-Gómez, E. J., Canul-Ku, J., Hernández-Arenas, M. G., & Solís-Bonilla, J. L. (2018). Evaluación de dos ciclos de higuerrilla en Morelos, México: siembra y rebrote. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9(8), 1663-1673.
- Basith, M. A., & Mohammad, S. H. A. I. K. (2010). Effect of intercropping on growth, nutrient uptake and seed yield of castor (*Ricinus communis* L.) grown under rainfed conditions. *Journal of Research, ANGRAU*, 38(1), 55-61.
- Baskar, G., Selvakumari, I. A. E., & Aiswarya, R. (2018). Biodiesel production from castor oil using heterogeneous Ni doped ZnO nanocatalyst. *Bioresource technology*, 250, 793-798.
- Bijekar, M. S. R., & Gayatri, M. C. (2014). In vitro techniques to accelerate flavonoid synthesis in some Euphorbiaceae members. *International Journal of Innovation and Scientific Research*, 9(1), 54-60.
- Campos, J., Díaz, E., Orlando, I., Loeza, J., & Bravo, C. (2014). Análisis de crecimiento de higuerrilla (*Ricinus communis* L.) En clima seco y función del nitrógeno. *de Cuerpos Académicos*, 41.
- Chialva M, Salvioli di Fossalunga A, Daghino S, Ghignone S, Bagnaresi P, Chiapello M, Novero M, Spadaro D, Perotto S, Bonfante P. (2018) Native soils with their microbiotas elicit a state of alert in tomato plants. *New Phytol* (In press).
- CONABIO, 2022 consultado el 03 enero 2022 en www.conabio.gob.mx

- Delgado Valenzuela, F. G. (2013). Cultivo de higuerilla (*Ricinus communis* L.) como materia prima para la elaboración de biodiesel.
- Herrera, J. M., Martínez, A. C., & Martínez, C. J. (2019). Effect of thermal treatment on the extraction efficiency, physicochemical quality of *Jatropha curcas* oil, and biological quality of its proteins. *Journal of food science and technology*, 56(3), 1567-1574.
- Estaji, A., & Niknam, F. (2020). Foliar salicylic acid spraying effect on growth, seed oil content, and physiology of drought-stressed *Silybum marianum* L. plant. *Agricultural Water Management*, 234, 106116.
- Espinosa Paz, H., Rodríguez Hernández, R., & Bravo Mosqueda, E. (2013). Guía para cultivar higuerilla en condiciones de temporal, en los Valles Centrales de Oaxaca.
- Falcón Rodríguez, A. B., Costales Mené, D., González-Peña Fundora, D., & Nápoles García, M. C. (2015). Nuevos productos naturales para la agricultura: las oligosacarinas. *Cultivos Tropicales*, 36, 111-129.
- FAO 2018 <http://www.fao.org/docrep/006/Q2180S/Q2180S12.htm>. Consultado el 9 de octubre del 2018.
- Flores-Macías, A., Vela-Correa, G., Rodríguez-Gamiño, M., Akhtar, Y., Figueroa-Brito, R., Pérez-Moreno, V., ... & Ramos-López, M. A. (2016). Effect of potassium nitrate on the production of ricinine by *Ricinus communis* and its insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda*. *Revista fitotecnia mexicana*, 39(1), 41-47.
- García-Mier, L., Jiménez-García, S. N., Guevara-González, R. G., Feregrino-Pérez, A. A., Contreras-Medina, L. M., & Torres-Pacheco, I. (2015). Elicitor mixtures significantly increase bioactive compounds, antioxidant activity, and quality parameters in sweet bell pepper. *Journal of Chemistry*, 2015.
- Geethanjali, G., Padmaja, K. V., & Prasad, R. B. (2016). Synthesis, characterization, and evaluation of castor oil-based acylated derivatives as potential lubricant base stocks. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 55(34), 9109-9117.
- Geocities 2018 <http://www.geocities.ws/pelabzen/metabcarb.html>. Consultado 6 de octubre 2018.
- González Molina, Jonathan. (2013). Evaluación de especies oleaginosas disponibles en el estado de Chiapas, para la producción de bioqueroseno. Proyecto de Residencia profesional. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

- González Torres, G., Mendoza Hernández, F. M., Covarrubias Prieto, J., Morán Vázquez, N., & Acosta Gallegos, J. A. (2008). Rendimiento y calidad de semilla de frijol en dos épocas de siembra en la región del Bajío. *Agricultura técnica en México*, 34(4), 421-430.
- Goytia-Jiménez, M. A., Gallegos-Goytia, C. H., & Núñez-Colín, C. A. (2011). Relación entre variables climáticas con la morfología y contenido de aceite de semillas de higuierilla (*Ricinus communis* L.) de Chiapas. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 17(1), 41-48.
- Gutiérrez-Carbajal, M. G., Monforte-González, M., Miranda-Ham, M. D. L., Godoy-Hernández, G., & Vázquez-Flota, F. (2010). Induction of capsaicinoid synthesis in *Capsicum chinense* cell cultures by salicylic acid or methyl jasmonate. *Biologia plantarum*, 54(3), 430-434.
- Hayat, S., Fariduddin, Q., Ali, B., & Ahmad, A. (2005). Effect of salicylic acid on growth and enzyme activities of wheat seedlings. *Acta Agronomica Hungarica*, 53(4), 433-437.
- Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad A. (2010) Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. *Environmental and Experimental Botany*; 68:14–25
- Hernández-Martínez, M., A. Borodanenko, S. Montes-Hernández, V. Pecina Quintero, L. Montoya-Coronado, M. S. Acosta-Navarrete y O. L. Rivas García. (2013). Manual Técnico de Producción de Cultivos Bioenergéticos. Folleto Técnico Núm. 2. INIFAP-CIRCE Campo Experimental Bajío.
- Ho T-T, Lee J-D, Jeong C-S, Paek K-Y, Park S-Y (2018) Improvement of biosynthesis and accumulation of bioactive compounds by elicitation in adventitious root cultures of *Polygonum multiflorum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:1–11.
- Ijaz, M., Sher, A., Sattar, A., Shahid, M., Nawaz, A., Ul-Allah, S., & Saqib, M. (2019). Response of canola (*Brassica napus* L.) to exogenous application of nitrogen, salicylic acid and gibberellic acid under an arid climate. *Soil & Environment*, 38(1).
- INIFAP 2018 <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/3452>. Consultado el 13 de abril del 2018.
- INEGI 2018 www.inegi.org.mx/contenidos/app/areasgeograficas/resumen/resumen_22.pdf Consultado el 20 Junio 2018.

- Jachmanian, I., Pérez Gomar, E., Villamil, J., & Villamil, J. J. (2009). El cultivo de tártago (*Ricinus comunnis* L.) en el Uruguay: Información preliminar. Boletín de divulgación, (98).
- Jadhav, S. H., Bhambudekar, S. B., & Patil, D. B. (2013) P 4-2. Effect of salicylic acid on fatty acid composition of groundnut seeds.
- Jimenez-Garcia, S. N., Vazquez-Cruz, M. A., Guevara-Gonzalez, R. G., Torres-Pacheco, I., Cruz-Hernandez, A., & Feregrino-Perez, A. A. (2013). Current approaches for enhanced expression of secondary metabolites as bioactive compounds in plants for agronomic and human health purposes—a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 63(2), 67-78.
- Karleskind, A., & Wolff, J. P. (1996). Oils and fats manual. A comprehensive treatise: properties, production, applications
- Kaur, R., & Bhaskar, T. (2020). Potential of castor plant (*Ricinus communis*) for production of biofuels, chemicals, and value-added products. In *Waste Biorefinery* (pp. 269-310). Elsevier.
- Lara, M. V., Drincovich, M. F., & Andreo, C. S. (2010). Transiciones metabólicas en la fijación fotosintética del carbono en plantas del género *Portulaca*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Fundación Ramón Areces. Madrid, España. Pp, 43-55.
- Liu, H., Kang, Y., Zhao, X., Liu, Y., Zhang, X., & Zhang, S. (2019). Effects of elicitation on bioactive compounds and biological activities of sprouts. *Journal of functional foods*, 53, 136-145.
- Llaven Valencia, G., Borbon Gracia, A., Ochoa Espinoza, X. M., Antuna Grijalva, O., Hernández Hernández, A., & Coyac Rodríguez, J. L. (2019). Productividad de higuierilla (*Ricinus communis* L.) en el norte de Sinaloa. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(5), 1011-1022.
- Lobato, V. 2008. Metodología para optimizar el análisis de materias primas para biocombustibles en los países del cono sur. Programa Cooperativo para el Desarrollo Tecnológico Agroalimentario y Agroindustrial del Cono Sur. IICA.
98 p
- López-Ordaz, P., Chanona-Pérez, J. J., Perea-Flores, M. J., Sánchez-Fuentes, C. E., Mendoza-Pérez, J. A., Arzate-Vázquez, I., & Torres-Ventura, H. H. (2019). Effect of

the extraction by thermosonication on castor oil quality and the microstructure of its residual cake. *Industrial Crops and Products*, 141, 111760.

Luciano, Á. J., Irineo, T. P., Ocampo-Velázquez, R. V., Feregrino-Pérez, A. A., Hernández, A. C., & Guevara-González, R. G. (2017). Integrating Plant Nutrients and Elicitors for Production of Secondary Metabolites, Sustainable Crop Production and Human Health: A Review. *International Journal of Agriculture and Biology*, 19(3).

Maciel-Torres, S., P., Figueroa-Viramontes, U., Jacobo-Salcedo, M. D. R.; Pedroza-Sandoval, A., Trejo-Calzada, R., & Encerrado-Alva, R., C. (2017). Micronutrients in castor-oil plants (*Ricinus communis* L.) growing in soil fertilized with biosolids. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 16(2), 13-22. Joo Y, Schuman MC, Goldberg JK, Kim S, Yon F, Brütting C, Baldwin IT. (2018) Herbivore-induced volatile blends with both “fast” and “slow” components provide robust indirect defense in nature. *FunctEcol* 32:136-149.

Mady, M. A. (2009). Effect of foliar application with salicylic acid and vitamin E on growth and productivity of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant. *J. Agric. Sci. Mansoura Univ*, 34(6), 6735-6746.

Mahalakshmi Ravi, Eganathan Palansiami, & Parida Ajai. (2013). Salicylic acid elicitation on production of secondary metabolite by cell cultures of *Jatropha curcas* L. *Int J Pharm Sci*, 5(4), 655-9.

Martínez Rueda, C. G., (2015) Unidad III Diseños experimentales relacionados con un solo factor de estudio. Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Ciencias Agrícolas, pp. 13-14

Mostacedo, B., & Fredericksen, T. (2000). Manual de métodos básicos de muestreo y análisis en ecología vegetal, Bolfor, Bolivia, pp. 28-30

Mubofu, E. B. (2016). Castor oil as a potential renewable resource for the production of functional materials. *Sustainable Chemical Processes*, 4(1), 11.

Mutlu, H., & Meier, M. A. (2010). Castor oil as a renewable resource for the chemical industry. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(1), 10-30.

Nada, M. M., & El-Hady, A. (2019). Influence of Salicylic Acid on Cucumber Plants under Different Irrigation Levels. *Journal of Plant Production*, 10(2), 165-171.

- Naik, P. M., & Al-Khayri, J. M. (2016). Abiotic and biotic elicitors—role in secondary metabolites production through in vitro culture of medicinal plants. In *Abiotic and Biotic Stress in Plants-Recent Advances and Future Perspectives*. InTech.
- Naveenkumar, R., & Baskar, G. (2019). Ultrasonic assisted extraction of oil from castor seeds: optimization using response surface methodology, extraction kinetics and characterization. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 1-12.
- Nebo, L., Varela, R. M., Fernandes, J. B., & Palma, M. (2019). Microwave-Assisted Extraction of Ricinine from *Ricinus communis* Leaves. *Antioxidants*, 8(10), 438.
- Ogunniyi, D. S. (2006). Castor oil: a vital industrial raw material. *Bioresource technology*, 97(9), 1086-1091.
- Panhwar, T., Mahesar, S. A., Kandhro, A. A., Sheerazi, S. T. H., & Kori, A. H. (2019). Physicochemical composition and FTIR characterization of castor seed oil. *Ukrainian Food Journal*, 778.
- Papadopoulou G V, Maedicke A, Grosser K, van Dam NM, Martínez-Medina A (2018) Defence Signalling Marker Gene Responses to Hormonal Elicitation differ between Roots and Shoots. *AoB Plants (In Press)*. Paraninfo. 523 pp.
- Radman R, Saez T, Bucke C, Keshavarz T. (2003) Elicitation of plants and microbial cell systems. *BiotechnolApplBiochem*; 37(Pt 1): 91-102.
- Raigón, M. D., García, M. M. D., Guerrero, C., & Esteve, P. (2006). Actividad de la nitrato reductasa y su relación con los factores productivos en lechuga. Trabajo final de carrera. Escuela Técnica Superior del Medio Rural y Enología. Universidad politécnica de Valencia. Zaragoza-España. (157) 11pp.
- Rajasekhar, VK; Oelmüller, R. 1987. Regulation of nitrate reductase and nitrite reductase in higher plants. *PhysiologiaPlantarum*, 71: 517-521.
- Rico P, H. R., Tapia V. L. M., Teniente O. R., González Á. A., Hernández M. M., Solís B. J.L., y Zamarripa C. A. 2011. Guía para cultivar higuierilla (*Ricinus communis*L.) en Michoacán. Folleto Técnico Núm. 1. INIFAP- CIRPAC Campo Experimental Valle de Apatzingán.

- Rivera-Brenes, P. A., & Hernández-López, J. (2016). Evaluación del rendimiento y calidad del aceite de siete variedades de *Ricinus communis*. *Agronomía Mesoamericana*, 27(1), 183-190.
- Rodríguez Rivas, G., Márquez Ramírez, J., & Rebolledo Camacho, V. (2001). Determinación del potencial y eficiencia de producción de semillas en *Cedrela odorata* L. y su relación con caracteres morfométricos de frutos. *Foresta Veracruzana*, 3(1).
- Rodríguez, M. S. (2003). La Fosfoenolpiruvato Carboxilasa en la respuesta de las plantas a estrés abiótico. Universidad de Sevilla.
- Rodziewicz P, Swarczewicz B, Chmielewska K, Wojakowska A, Stobiecki M. (2014) Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes. *Acta PhysiolPlant*. 36: 1–19.
- Roman de la Vega, C. F, Ramírez M., J. L. Treviño G. 1994. Dendrometría. Universidad Autónoma de Chapingo. México, p. 353
- Román-Figueroa, C., Cea, M., Paneque, M., & González, M. E. (2020). Oil content and fatty acid composition in castor bean naturalized accessions under Mediterranean conditions in Chile. *Agronomy*, 10(8), 1145.
- Rovalo Merino, M., & Rojas Garcidueñas, M. (1982). Fisiología vegetal experimental, Prácticas de laboratorio (No. 581.1 R66).
- Ruiz Ballesta, I. M. (2014). Expresión de los genes de la fosfoenolpiruvato Carboxilasa (PEPC) y PEPC-Quinasa (PPCK) de la semilla de sorgo. Función y regulación por fosforilación y ubiquitinación de estas proteínas en el desarrollo y germinación de la Semilla.
- Rzedowski, G.C. de y J. Rzedowski 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2ª ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
- Saw, N. M. M. T., Riedel, H., Kütük, O., Ravichandran, K., & Smetanska, I. (2010). Effect of elicitors and precursors on the synthesis of anthocyanin in grape *Vitis vinifera* cell cultures. *Energy Res J*, 1(2), 189-191
- Sánchez, G. R., Mercado, E. C., Peña, E. B., de la Cruz, H. R., & Pineda, E. G. (2010). El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas*, 12(2), 90-95.

- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), 2008, consultado en <https://www.gob.mx/snics/articulos/en-que-consiste-el-analisis-de-estimacion-del-peso-de-las-semillas?idiom=es>
- Salisbury, F. B., & Ross, C. W. (1994). *Fisiología Vegetal [Plant Physiology]*. México: Grupo editorial Iberoamericana.
- Sánchez, M. I., Castañeda, R. D., & Castañeda, M. J. (2015). Usos y potencialidad de la Higuierilla (*Ricinus communis*) en sistemas agroforestales en Colombia. *PUBVET*, 10, 448-512.
- Shah, M. S., Halder, P. K., Shamsuzzaman, A. S. M., Hossain, M. S., Pal, S. K., & Sarker, E. (2017). Perspectives of biogas conversion into Bio-CNG for automobile fuel in Bangladesh. *Journal of Renewable Energy*, 2017.
- Saw, N. M. M. T., Riedel, H., Kütük, O., Ravichandran, K., & Saw, N. M. M. T., Riedel, H., Kütük, O., Ravichandran, K., & Smetanska, I. (2010). Effect of elicitors and precursors on the synthesis of anthocyanin in grape *Vitis vinifera* cell cultures. *Energy Rec. J*, 1, 189-192. Smetanska, I. (2010). Effect of elicitors and precursors on the synthesis of anthocyanin in grape *Vitis vinifera* cell cultures. *Energy Rec. J*, 1, 189-192.
- SIAMI 2018 www.economia-snci.gob.mx/. Consultado el 20 de agosto del 2018.
- Sigma Aldrich 2021 <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/sds/sigma/smb00079> consultado 16 de ayo 2021.
- Singh, B., & Shukla, S. K. (2016). Experimental analysis of combustion characteristics on a variable compression ratio engine fuelled with biodiesel (castor oil) and diesel blends. *Biofuels*, 7(5), 471-477.
- Singh, P. K., & Gautam, S. (2013). Role of salicylic acid on physiological and biochemical mechanism of salinity stress tolerance in plants. *Acta physiologiae plantarum*, 35(8), 2345-2353.
- Talebi, M., Moghaddam, M., & Pirbalouti, A. G. (2018). Methyl jasmonate effects on volatile oil compounds and antioxidant activity of leaf extract of two basil cultivars under salinity stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(2), 34.
- Tucuch Haas, C. J., Alcántar González, G., & Larqué Saavedra, A. (2015). Efecto del ácido salicílico en el crecimiento de la raíz y biomasa total de plántulas de trigo. *Terra Latinoamericana*, 33(1), 63-68.

Vasco-Leal, J. F., Hernández-Rios, I., Méndez-Gallegos, S. D. J., Ventura-Ramos Jr, E., Cuellar-Núñez, M. L., & Mosquera-Artamonov, J. D. (2017). Relación entre la composición química de la semilla y la calidad de aceite de doce accesiones de *Ricinus communis* L. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(6).

Vázquez Díaz, D. A., Salas Pérez, L., Preciado Rangel, P., Segura Castruita, M. Á., González Fuentes, J. A., & Valenzuela-García, J. R. (2016). Efecto del ácido salicílico en la producción y calidad nutracéutica de frutos de tomate. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, (17).

Wei, S., He, Y., Yang, J., Li, Y., Liu, Z., & Wang, W. (2022). Effects of exogenous ascorbic acid on yields of citrinin and pigments, antioxidant capacities, and fatty acid composition of *Monascus ruber*. *LWT*, 154, 112800.

Whitfield, S. J., Griffiths, G. D., Jenner, D. C., Gwyther, R. J., Stahl, F. M., Cork, L. J., & Clark, G. C. (2017). Production, characterization and testing of an ovine antitoxin against ricin; efficacy, potency and mechanisms of action. *Toxins*, 9(10), 329.

WIKILIBROS

2018

https://es.wikibooks.org/wiki/Asimilaci%C3%B3n_de_nitr%C3%B3geno_en_plantas.

Consultado el 5 de octubre del 2018.

Xiaolong H, Min S, Lijie C, Chao X, Yanjie Z, Guoyin K. (2015) Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on tanshinone production and biosynthetic gene expression in transgenic *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Biotechnology and Applied Biochemistry*.; 62(1):24–31. DOI: 10.1002/bab.1236.

Xu YW, Lv SS, Zhao D, Chen JW, Yang WT, Wu W. (2012) Effects of salicylic acid on monoterpene production and antioxidant systems in *Houttuynia cordata*. *African Journal of Biotechnology*. 2012; 11:1364–1372.

Zavala-Gómez, C. E., Rodríguez-deLeón, E., Bah, M. M., Feregrino-Pérez, A. A., Campos-Guillén, J., Amaro-Reyes, A., & Ramos-López, M. A. (2021). Effect of Salicylic Acid in the Yield of Ricinine in *Ricinus communis* under Greenhouse Condition. *Plants*, 10(9), 1902.

7. APÉNDICE

plants

Article

Effect of Salicylic Acid in the Yield of Ricinine in *Ricinus communis* under Greenhouse Condition

Carlos Eduardo Zavala-Gómez ¹, Eloy Rodríguez-deLeón ², Mamadou Moustapha Bah ², Ana Angélica Feregrino-Pérez ¹, Juan Campos-Guillén ², Aldo Amaro-Reyes ², José Alberto Rodríguez-Morales ³, Juan Fernando García-Trejo ¹, Antonio Flores-Macias ⁴, Rodolfo Figueroa-Brito ⁵ and Miguel Angel Ramos-López ^{2,*}



Citation: Zavala-Gómez, C.E.; Rodríguez-deLeón, E.; Bah, M.M.; Feregrino-Pérez, A.A.; Campos-Guillén, J.; Amaro-Reyes, A.; Rodríguez-Morales, J.A.; García-Trejo, J.F.; Flores-Macias, A.; Figueroa-Brito, R.; et al. Effect of Salicylic Acid in the Yield of Ricinine in *Ricinus communis* under Greenhouse Condition. *Plants* **2021**, *10*, 1902. <https://doi.org/10.3390/plants10091902>

Academic Editor: Asunción Amorós Receiv

ed: 19 August 2021

Accepted: 10 September 2021

Published: 14 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Biosystems Engineering Group, Division of Graduate Studies, Faculty of Engineering, Autonomous University of Querétaro, Cerro de las Campanas, S/N, Colonia Las Campanas, C.U., Santiago de Querétaro 76010, Mexico; ezavala2@gmail.com (C.E.Z.-G.); feregrino.angge@hotmail.com (A.A.F.-P.); fernando.garcia@uaq.mx (J.F.G.-T.)
- ² Faculty of Chemistry, Autonomous University of Querétaro, Cerro de las Campanas, S/N, Colonia Las Campanas, Santiago de Querétaro 76010, Mexico; eloy.q22@gmail.com (E.R.-d.); moubahdia@yahoo.com.mx (M.M.B.); camposj78@hotmail.com (J.C.-G.); aldoamaro@gmail.com (A.A.-R.)
- ³ Nanosystems Laboratory, Division of Graduate Studies, Faculty of Engineering, Autonomous University of Querétaro, Cerro de las Campanas, S/N, Colonia Las Campanas, Santiago de Querétaro 76010, Mexico; josealberto970@hotmail.com
- ⁴ Department of Agricultural and Animal Production, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzadadel Hueso 1100, Mexico City 04960, Mexico; aflores981@gmail.com
- ⁵ Biotic Products Development Center, National Polytechnic Institute, Calle Ceprobi No. 6, Yautepec 62731, Mexico; rfigueroa@ipn.mx
- * Correspondence: agromyke@yahoo.com; Tel.: +52-44211921200 (ext.5555)

Abstract: Castor bean (*Ricinus communis*) seeds contain ricinine, an alkaloid with insecticidal and insectistatic activities. Elicitation with salicylic acid (SA) has proven to stress *R. communis* and might modify the ricinine concentration. The aim of this study was to evaluate the concentration of ricinine in the bagasse of seeds from *R. communis* elicited with exogenous SA under greenhouse conditions. Plants were grown and divided into five groups, which were sprayed with SA and drenched with 50 mL 60 days after sowing with concentrations of SA (0, 100, 300, 600 and 900 µM). Clusters were mixed and separated according to the treatment, and dried. The seeds were ground, the oil was extracted by Soxhlet with hexane, and then the bagasse was extracted with methanol. Ricinine was determined by HPLC. Elicitation did not change the plant height or diameter; the control group had 9.17 µg mL⁻¹ of ricinine; and the concentrations followed a hormesis curve with the peak at 300 µM of SA that had a ricinine concentration of 18.25 µg mL⁻¹. Elicitation with SA might be a cost-effective technique to increase ricinine from *R. communis* bagasse.

Keywords: *Ricinus communis*; elicitation; ricinine

1. Introduction

Castor bean plant *Ricinus communis* is a non-edible seed crop. This species is native of tropical Africa, and due to its commercial importance, is currently cultivated worldwide in countries with tropical weather such as Mexico [1]. This plant contains metabolites that include proteins, carbohydrates, minerals, albumins, ricinoleic acid, ricin, ricinine, N-demethylricinine, kaempferol-3-O-β-D-xylopyranoside, kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside, quercetin-3-O-β-D-xylopyranoside, quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside, kaempferol-3-O-β-rutinoside, and quercetin-3-O-β-rutinoside, which makes the plant functional in more than 700 industrial applications such as the production of cosmetics, paints, biofuels, and pesticides [2–5].

alkaloids, and depending on the concentration, it could cause emesis, nausea, and even death if ingested [6]. This alkaloid contains a cyano group in its structure, which gives it toxicity; a property that suggests its use as an insecticidal, against *Atta sexdenx rubropilosa* and against *Spodoptera frugiperda* [7,8]. It exhibits antimicrobial activity against the bacterial species *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and the fungal species *Candida albicans* [9]. Ricinine is present in all parts of the plant, and its production can be enhanced by nitrogen, and environmental factors such as salinity and drought [10].

An additional method to enhance the production of secondary metabolites such as alkaloids is by elicitation [11], which is the induction of the immune system of a plant by an external agent [12]. For example, Akhgar et al. [13] increased the concentration of terpenoid and alkaloid with methyl jasmonate. Taha and Twaij [14] demonstrated an increase in phenolic compounds eliciting *R. communis* with AgNO_3 . Another common compound used in elicitation is salicylic acid (SA), which is a phenolic compound and a natural constituent of many plant species [15]; it is involved in responses to different types of stress (biotic and abiotic) and defense against pathogen attacks [16]. SA affects the oxidoreduction balance of plant cells, and induces adaptive, physiological, and morphological responses [17]. It is considered a bioregulator of growth and has been shown to increase the production of foliar biomass in plants, roots, and fruits [18]. SA has been shown to enhance the production of alkaloids in different plant models [19].

There is no evidence of the effect of SA on these secondary metabolites of *R. communis*. However, it has been shown to increase the concentration of phenolic, flavonoid, and flavonol compounds in *Helianthus annuus* [20]; improve the yields of alkaloids and flavonoids in *Satistinctoria* [21]; and improve the production of benzylisoquinoline alkaloids in *Papaver armeniacum* [22].

Given the industrial importance of *R. communis* and the high availability around the world, the aim of this study was to evaluate salicylic acid in the yield of ricinine alkaloid contained in *R. communis* seeds under greenhouse conditions.

2. Results

2.1. Plant Measurement and Oil Content of *R. communis*

The height of the plants ranged from 51.05 cm to 58.31 cm at day 7, and 195.68 cm to 216.27 cm at day 40; the stem diameter ranged from 4.09 cm to 4.89 cm at day 7, and 8.65 cm to 9.19 cm at day 40. No statistical differences were found in the heights and diameters between the treatments (Table 1). This showed homogeneity in the growth of all plants of this study, before applying the elicitor (SA) at day 40.

Table 1. Height of stem diameters of *R. communis* plants before treatment with salicylic acid at days 7 and 40 after sowing.

Treatment	Height at 7 Days (cm)	Height at 40 Days (cm)	Stem Diameter at 7 Days (cm)	Stem Diameter at 40 Days (cm)
900 μM	58.21 \pm 16.06a	195.68 \pm 26.92a	4.36 \pm 0.81a	8.84 \pm 0.76a
600 μM	51.05 \pm 11.15a	216.27 \pm 16.77a	4.09 \pm 0.65a	8.83 \pm 0.33a
300 μM	57.00 \pm 9.44a	210.64 \pm 27.09a	4.42 \pm 0.95a	9.11 \pm 0.82a
100 μM	54.70 \pm 8.38a	209.39 \pm 23.22a	4.63 \pm 0.71a	9.19 \pm 0.88a
0 μM	58.31 \pm 13.80a	207.38 \pm 26.58a	4.89 \pm 0.51a	8.65 \pm 0.71a

The results are the average of 60 plants \pm standard deviation. Different letters indicate the statistical difference Tuke test, $p=0.05$.

The oil content ranged from 34.89% to 50.23% between the treatments. Increments of 14% and 7.5% with respect to the control (0 μM) with the treatments of 900 μM and 600 μM were observed. The weight of 100 seeds increased 25.7% in the 900 μM treatment and 13.6% in the 600 μM treatment as compared with the control. The treatment of 100 μM decreased by 8.5%; however, this change was not statistically significant. There were no statistical

differences between the treatments in the length (from 14.30 mm to 14.39 mm), width (from 9.03 mm to 9.10 mm) and thickness (from 6.60 mm to 6.66) of these seeds (Table 2).

Table 2. Oil content, weight of 100 seeds and morphological characteristics of castor seeds of plants treated with salicylic acid.

Trat	Oil Content (%)	Weight of 100 Seeds (g)	Seed Length (mm)	Seed Width (mm)	Seed Thickness (mm)
900 μ M	50.23 \pm 1.55a	24.70 \pm 2.89a	14.37 \pm 0.13a	9.10 \pm 0.09a	6.66 \pm 0.06a
600 μ M	43.75 \pm 2.36b	22.33 \pm 3.12ab	14.23 \pm 0.12a	9.03 \pm 0.14a	6.64 \pm 0.07a
300 μ M	38.11 \pm 0.78c	21.50 \pm 1.15bc	14.37 \pm 0.12a	9.08 \pm 0.10a	6.64 \pm 0.06a
100 μ M	34.89 \pm 5.98c	17.97 \pm 1.58d	14.30 \pm 0.10a	9.10 \pm 0.06a	6.60 \pm 0.06a
0 μ M	36.23 \pm 4.17c	19.65 \pm 2.10cd	14.39 \pm 0.30a	9.07 \pm 0.08a	6.65 \pm 0.11a

Trat = Treatment. The data of oil content are the average of 3 measurements. Seed length, width, and thickness are the average of the measure of 100 seeds. Different letters indicate the statistical difference Tukey test, $p = 0.05$.

2.2. Ricinine Standard Calibration Curve

Figure 1 shows the HPLC chromatogram of the ricinine standard and its absorption spectrum in UV-Vis. The retention time of the different concentrations of ricinine standard ranged between 8.797 min and 8.814 min. The areas under the curve ranged between 425,421 for the 6 μ g mL⁻¹ and 1,930,221 for the 20 μ g mL⁻¹ samples (Table 3).

A high linearity of $R^2 = 0.9618$ was reached, which allowed it to be used for the quantification of ricinine extracts (Figure 2). The detection and quantification limits for the calibration curve were 3.2 μ g mL⁻¹ and 5.3 μ g mL⁻¹, respectively.

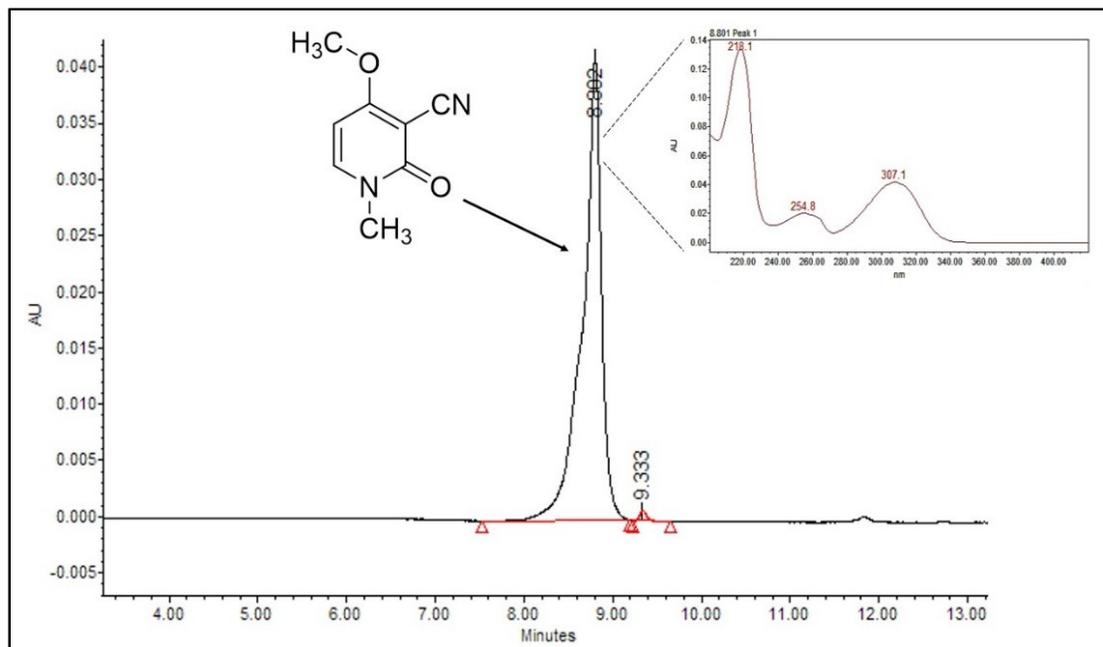


Figure 1. Chromatogram of ricinine standard and its absorption spectrum in UV-Vis.

Table 3. Ricinine concentration and area under the curve of ricinine standard.

[μ g mL ⁻¹]	Retention Time (minutes)	Area under the Curve
20	8.814	1,930,221
16	8.804	1,177,116
8	8.797	608,784
6	8.802	425,421
0	0	0

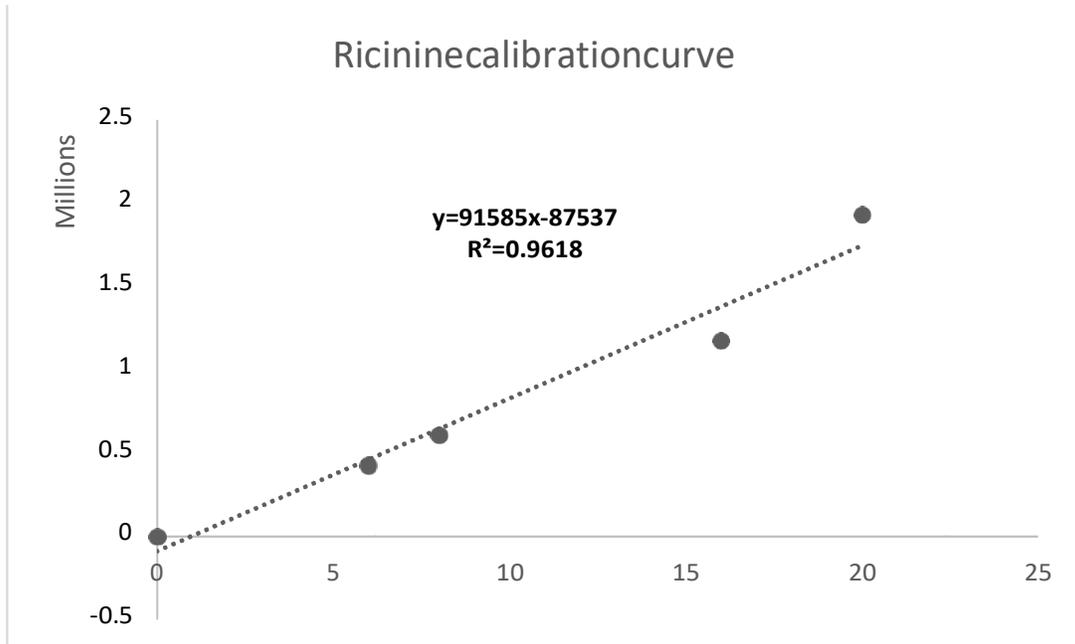


Figure2.Ricininecalibrationcurve.

2.3. RicinineQuantificationofMethanolicExtract

All samples presented ricinine concentrations between 0.92 mg g⁻¹ (0 µM) and 1.58 atmgg⁻¹(600µM)ofextract(Table4),whichisexhibitedasahormesiscurveforthisalkaloidusing salicylic acid. The peak of this curve was at 300 µM of SA and then decreased as theconcentration of SA increased, as seen in Figure 3. The chromatogram of 300 µM of SA isobservedinFigure4.

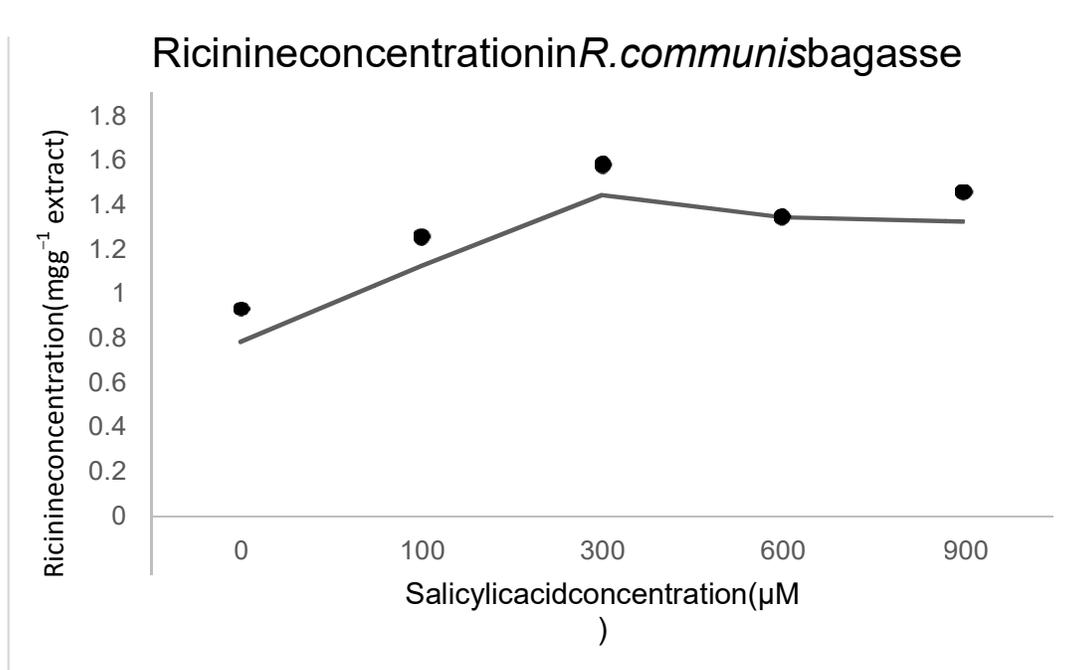
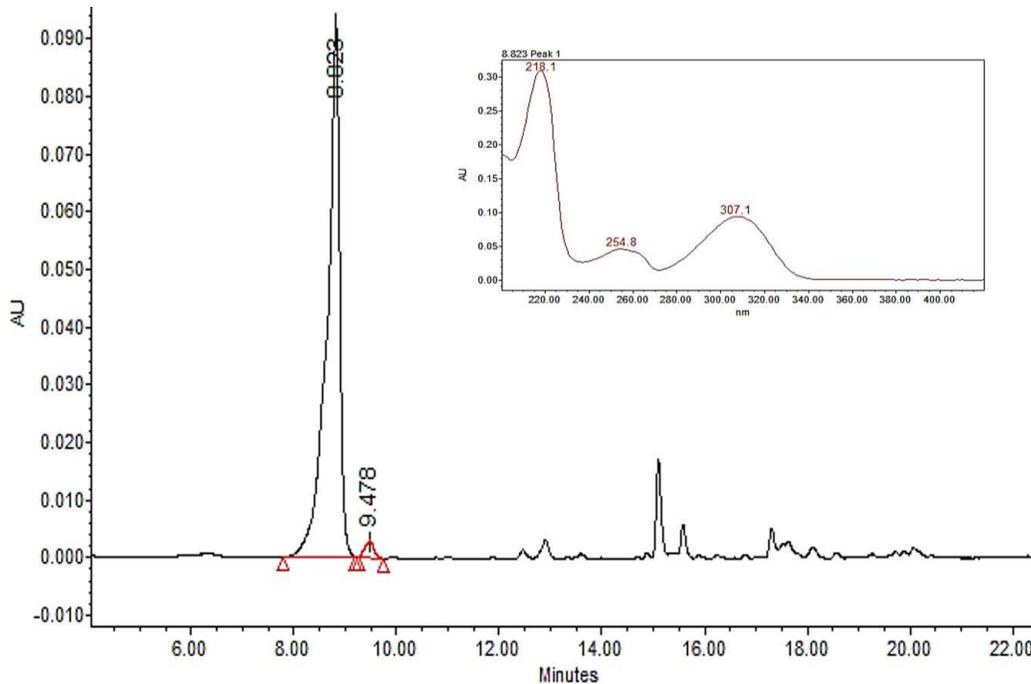


Figure3.Comparisonofricininein*R. communis*samplestreatedwithdifferentconcentrationsofSA.

Table 4. Ricinine concentration and area under the curve of the methanolic extracts of *R. communis* plants treated with salicylic acid.

Trat	Weight Sample (mg)	Final Volume (mL)	Area under the Curve	Retention Time (minutes)	Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentration (mg g^{-1} Extract)
900 μM	11.5	1	1,449,959	8.790	16.78	1.48 ± 0.08
300 μM	11.5	1	1,584,532	8.823	18.25	1.58 ± 0.07
100 μM	10.2	1	1,091,388	8.868	12.87	1.26 ± 0.06
0 μM	10.0	1	752,871	8.926	9.17	0.92 ± 0.05

The data of concentration is the average of 3 measures \pm standard deviation.

**Figure 4.** HPLC chromatogram of the sample elicited with 300 μM salicylic acid.

3. Discussion

3.1. Importance and Novelty of the Research

In this study, we demonstrated the effectiveness of SA as an elicitor to increase ricinine yield in *R. communis* for the first time. The highest yield was at a concentration of 300 μM of SA.

3.2. Difference in Height and Diameter

In contrast to our results, other studies testing the effectiveness of SA as an elicitor found various results: Hasanuzzaman et al. [23] observed an increase of 15% over the control in the height of *Brassica campestris* plants grown in lead-amended soils (1.0 mM) and elicited with salicylic acid (0.25 mM) 30 days after sowing. However, after 45 days and at harvest, there were decreases of 35% and 26% in the heights of the plants, with respect to the control. Zamaninejad et al. [24] in *Zea mays* elicited with SA (1 mM) performed before flowering demonstrated an increase of 15% in the height and 5% stem diameter, with respect to the control. In addition, Tucuch-Haas et al. [25] in *Zea mays* treated with SA (1 μM) measured 140 days after sowing had an increase of 14% in the height and 41% of the stem diameter, with respect to the control.

As can be seen in these studies, salicylic acid increased the height and stem diameter of the plants elicited with SA. However, in this work, no difference was found in height and stem diameter because it was not intended to increase these variables. In addition, the measurements of the plants were taken before elicitation. This study aimed to test the increase in these secondary metabolites, ricinine.

3.3. Effectiveness of SA as an Elicitor or Secondary Metabolites

Similar to our findings, a broad number of studies have found elicitation to be effective to increase the yield of secondary metabolites. For instance, Estaji and Niknam [26] found that *Silybum marianum* elicited with SA (1 mM) had an increased seed oil content of 7%, as compared to the control. Safeer et al. [27] reported an increase of 14% in the seed oil content of *Helianthus annuus* elicited with SA (100 mM), with respect to the control. However, there are also studies showing conflicting evidence: Ullah and Bano [28] showed a 6% decrease in the seed oil content in *Carthamus tinctorius* elicited with SA (1 μ M) with respect to the control. In this research, it was shown that the seed oil content increased by 14% with respect to the control after eliciting *R. communis* with SA (900 μ M).

For the measurements of the morphology of these seeds (length, width, and thickness) there was no significant difference between treatments. However, for the weight of 100 seeds, concentrations 600 μ M and 900 μ M had 25% and 14% higher weights with respect to the control, respectively; this was also reflected in the oil content.

Flores-Macías et al. [29] obtained a linearity of the calibration curve of ricinine standard of $R^2 = 0.992$ by HPLC, which exhibited a high correlation with different ricinine standard concentrations (2.0, 0.2, 0.02, 0.002, and 0 mg mL⁻¹). In another investigation, Wang et al. [30] reported R^2 values of 0.9992 and 0.9988 with HPLC and LC-MS, of the standard solution of ricinine with different standard concentrations (27.7, 13.8, 6.92, 3.46, 1.73, 0.87, 0.43, 0.22, 0.11, 0.05, and 0 μ g mL⁻¹) and (500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, 3.9, 1.8 and 0 ng mL⁻¹), respectively. Isenberger et al. [31] determined the correlation of ricinine standard by HPLC, which showed a high linearity of $R^2 = 0.996$ with different ricinine standard concentrations (200, 20.0, 0.800, and 0 ng mL⁻¹). In this research, a linearity of $R^2 = 0.9618$ was obtained with different ricinine standard concentrations (0, 6, 8, 16, 20 μ g L⁻¹); we proceeded to quantify the ricinine in the extracts.

The ricinine concentrations in the control group were similar to those reported by Nebo et al. [32] (1.3921 to 1.442 mg g⁻¹) in leaves of the methanolic extract of *R. communis*. On the other hand, Flores-Macías et al. [29] found concentrations in the methanolic extracts of areal parts of *R. communis* (894, 101, 103 and 104.2 μ g mL⁻¹). In this work, the concentrations of the methanolic extracts were similar to those reported by Nebo et al. [32], where the concentrations ranged from 0.92 to 1.58 mg g⁻¹. However, the values for the concentrations in this study were lower than those reported by Flores-Macías et al. [29], which were between 9.17 and 18.25 μ g mL⁻¹.

3.4. Implications

Giving the high availability of wild *R. communis* in Mexico and other tropical countries and its insecticidal activity against species such as *S. frugiperda* and *A. aegypti*, it has been considered and used in insecticides [8,33,34].

These results might have implications in the commercial production of ricinine, and in the production of secondary metabolites from *R. communis*. [35]. Ricinine is an integrated pest management control alternative of biological origin that provides novel modes of action and reduces the risk of cross-resistance [36]. The use of botanical insecticides is an accessible and low-cost control alternative for farmers [37]. Furthermore, obtaining active extracts does not require complex methodologies [38]; for instance, the extracts prepared in this study were of the methanolic type and their preparation was carried out simply and quickly with the help of an ultrasonic bath. This technique has also been used and described in similar studies [39,40]. Another benefit of using biological insecticides such as ricinine is that it has specific targets; thus, it does not affect endemic fauna [41].

The ricinine extracts of this study were obtained from the bagasse resulting from the extraction of the oil, which otherwise would have been considered as toxic waste. In addition, hydrolysis of the bagasse has shown to decrease its toxicity, providing additional benefits [42].

4. Materials and Methods

4.1. Field Conditions

The study was carried out in a 432 m² greenhouse at the Engineering Faculty of the Autonomous University of Querétaro Amazcala Campus in El Marques, Querétaro, Mexico (DMS latitude: 20°42'18.576" N, longitude: 100°15'57.24" W), during the seasons of autumn and winter, 2019. Weather conditions during the study were an average temperature of 27.8°C, photoperiod of 14 h light/10 h dark, and relative humidity of 43%.

The greenhouse was divided randomly into 4 blocks, with 3 repetitions, 5 plants per experimental unit and 4 treatments of SA as an elicitor and a control distilled water.

4.2. Plant Materials

The seeds of the Guanajuato oil variety of *R. communis* were provided by Dr. Miguel Hernández Martínez from the National Institute of Forestry Agricultural and Livestock Research Center (INIFAP) Experimental field Celaya.

The greenhouse was cleaned and all weeds were removed. Sowing and fertilization were carried out according to the methodology proposed by Hernández Martínez and Montes Hernández [43]: 600 seeds (2 per hole) were sown, at a depth of 30 cm, with a distance of 0.7 m between each other, across 10 cultivation lines with a separation of 1 m between lines. Sowing was carried out on 24 July 2019. Fertilization was performed by fertigation with doses of 60-40-00 NPK, with applications of 30-40-00 on the sowing day and a second application of 30-00-00 35 days after germination. Irrigation was carried out by means of a half drip every third day for a period of 30 min. Each group of plants was elicited with different concentrations of salicylic acid (100, 300, 600 and 900 µM) 60 days after sowing (21 September 2019) by foliar application, and by drench using a fumigation tank. The control plants received the same treatment with distilled water.

The clusters were harvested and sun-dried for 2 weeks, and then placed in a solar dryer for one more week. Finally, these seeds were extracted from the clusters.

4.3. Plant and Seed Measurements

The stem diameters and heights of the plants were measured at 7 and 40 days after sowing with a measuring tape (Truper H-1766, Jilotepec, State of México, Mexico).

The stem diameter was measured at ground level and the height was measured from ground level to the highest point of the plant. After harvesting with a vernier (Stern, Azcapotzalco, Mexico City, Mexico), a random sample of 100 seeds was collected [44], and the weight, seed length, seed width and seed thickness were measured.

4.4. Oil Extraction

The oil was extracted by taking a composite sample of 30 g seeds per treatment and block, from which they were taken and weighed on an analytical balance (Ohaus PA323C, Melrose, MA, USA). Afterwards, they were ground and inserted into a Soxhlet extractor connected to a 500 mL flask containing 250 mL of n-hexane. The extraction was conducted at 55°C, the boiling temperature of technical-grade n-hexane (Sigma-Aldrich, Toluca, State of México, México). During the extraction, an ice bath was used to control the temperature. After the extraction, the samples were centrifuged and separated into layers to remove the solvent with a rotary evaporator: IKARV10 basic (Staufen im Breisgau, BW, Germany).

4.5. Sample Preparation

The methanolic extract of *R. communis* was obtained from the bagasse of the seeds after the oil extraction: 10 g of bagasse was placed into a 250 mL Erlenmeyer flask with

100 mL of reagent-grade methanol (Sigma-Aldrich, Toluca, State of Mexico, Mexico). The mixture was placed into an ultrasonic bath [Elma sonic S40(H) (Singen, BW, Germany)] for one hour at 50 °C. Then, the extract was filtered by gravity into a funnel with a Whatman No. 3 filter (Schenectady, NY, USA). Finally, the solvent was eliminated by using an IKA RV10 basic (Staufen im Breisgau, BW, Germany) rotary evaporator.

4.6. Ricinine Quantification in *R. communis* Bagasse

HPLC analyses were performed using Waters equipment (Milford, MA, USA), Alliance model, composed of a quaternary pump model e2695 multi-solvent delivery system and a 2998 Diode Array Detector (DAD), using a C₁₈ column Agilent Zorbax (5 µm, 150 × 4.5 mm) (Santa Clara, CA, USA). The mobile phase was composed of a aqueous acetic acid 0.0125 N and acetonitrile (CH₃CN) in a linear gradient (as shown in Table 5) at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The run time was of 25 min, the volume of the injection was 20 µL and the ricinine was detected at 310 nm. Data acquisition and processing of chromatographic information were performed by Empower 3 Software (Milford, MA, USA).

Table 5. Elution gradient for ricinine analysis.

Time (minutes)	Acetic Acid Solution 0.0125 N	Acetonitrile
0	95%	5%
2	95%	5%
5	85%	15%
20	50%	50%
25	95%	5%

For the quantification of ricinine, the calibration curve was obtained using the following concentrations (µg mL⁻¹): 0, 6, 8, 16, and 20. The areas under the curves (y) obtained for each standard were plotted versus the concentrations used (x), and a linear correlation was established as $y = mx + b$. The amounts of ricinine were calculated by interpolation in the calibration curve. The detection limit and quantification limit were determined by the least-squares method.

4.7. Statistical Analysis

Descriptive analyses of the main characteristics of the plants treated with different concentrations of SA were performed. Analysis of covariance (ANCOVA) with a post hoc Tukey test were performed to assess differences between the treatments. Statistical significance was set at ($p < 0.05$).

5. Conclusions

In this research, it was found that the combination of the elicitation techniques of foliar application and drench with SA was found to improve effectively ricinine concentration in *R. communis* plant seeds. Additionally, the hormesis point of salicylic acid was found at 300 µM to increase the concentration of this alkaloid, and start decreasing at 600 µM and having the point of least concentration at 900 µM. Given the industrial importance of ricinine, SA might be a cost-effective solution to increase its yield in *R. communis* seeds.

Author Contributions: C.E.Z.-G. and M.A.R.-L. conceived the experiment and wrote part of the manuscript; E.R.-d. and M.M.B. conducted the HPLC experiments and collected the data; A.A.F.-P. and J.A.R.-M. performed the plant measurements and statistical analysis; J.C.-G. and A.A.-R. designed the experiment and performed the chemical analyses; J.F.G.-T. conducted the oil extraction; A.F.-M. and R.F.-B. reviewed and edited the manuscript; M.A.R.-L. performed the statistical analysis and wrote part of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We would like to thank the National Council of Science and Technology, México (CONA CYT) for the grant number 714272.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

8. References

- Mondal, B.; Das, S.K. Comparative evaluation of mahua (*Bassia latifolia*) oil cake and castor bean (*Ricinus communis*) seed as fish toxicants for tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and panchax (*Aplocheilichthys panchax*) with residual toxicity assessment on *Labeo bata*. *Aquac. Res.* **2019**, *50*, 2341–2349. [\[CrossRef\]](#)
- Kang, S.S.; Cordell, G.A.; Soejarto, D.D.; Fong, H.H. Alkaloids and flavonoids from *Ricinus communis*. *J. Nat. Prod.* **1985**, *48*, 155–156. [\[CrossRef\]](#)
- Chakrabarty, S.; Islam, A.K.M.A.; Yaakob, Z.; Islam, A.K.M.M. Castor (*Ricinus communis*): An Underutilized Oil Crop in the South East Asia. In *Agroecosystems—Very Complex Environmental Systems*; IntechOpen: London, UK, 2021; p. 61.
- Arboleda, F.J.; Guzmán, Ó.A.; Mejía, L.F. Efecto de Extractos Cetónicos de Higuera (*Ricinus communis* Linneo.) Sobre el Nematodo Barrenador [*Radopholus similis* (Cobb.) Thorne] en Condiciones In Vitro. *Luna Azul* **2012**, *35*, 28–47.
- Ali, B. Salicylic Acid: An Efficient Elicitor of Secondary Metabolite Production in Plants. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2021**, *31*, 101884. [\[CrossRef\]](#)
- Zhu, Q.-L.; Gu, H.; Ke, Z. Congeneration Biodiesel, Ricinine and Nontoxic Meal from Castor Seed. *Renew. Energy* **2018**, *120*, 51–59. [\[CrossRef\]](#)
- Bigi, M.F.M.; Torkomian, V.L.; De Groote, S.T.; Hebling, M.J.A.; Bueno, O.C.; Pagnocca, F.C.; Da Silva, M.F.G. Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. *Pest Manag. Sci.* **2004**, *60*, 933–938. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ramos-López, M.A.; Pérez, S. Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Afr. J. Biotechnol.* **2010**, *9*, 1359–1365. [\[CrossRef\]](#)
- Santos, P.M.; Batista, D.L.J.; Ribeiro, L.A.F.; Boffo, E.F.; de Cerqueira, M.D.; Martins, D.; de Castro, R.D.; de Souza-Neta, L.C.; Pinto, E.; Zambotti-Villela, L.; et al. Identification of Antioxidant and Antimicrobial Compounds from the Oilseed Crop *Ricinus communis* Using a Multiplatform Metabolite Profiling Approach. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *124*, 834–844. [\[CrossRef\]](#)
- El-Naggar, M.H.; Elgaml, A.; Abdel Bar, F.M.; Badria, F.A. Antimicrobial and Antiquorum-Sensing Activity of *Ricinus communis* Extracts and Ricinine Derivatives. *Nat. Prod. Res.* **2019**, *33*, 1556–1562. [\[CrossRef\]](#)
- Severino, L.S.; Auld, D.L.; Baldanzi, M.; Cândido, M.J.D.; Chen, G.; Crosby, W.; Tan, D.; He, X.; Lakshamma, P.; Lavanya, C.; et al. A Review on the Challenges for Increased Production of Castor. *Agron. J.* **2012**, *104*, 853–880. [\[CrossRef\]](#)
- Narayani, M.; Srivastava, S. Elicitation: A Stimulation of Stress in In Vitro Plant Cell/Tissue Cultures for Enhancement of Secondary Metabolite Production. *Phytochem. Rev.* **2017**, *16*, 1227–1252. [\[CrossRef\]](#)
- Luciano, A.-J.; Irineo, T.-P.; Virginia, O.-V.R.; Feregrino-Perez, A.A.; Hernandez, A.C.; Gerardo, G.-G.R. Integrating Plant Nutrients and Elicitors for Production of Secondary Metabolites, Sustainable Crop Production and Human Health: A Review. *Int. J. Agric. Biol.* **2017**, *19*, 391–402. [\[CrossRef\]](#)
- Amdoun, R.; Khelifi, L.; Khelifi-Slaoui, M.; Amroune, S.; Benyoussef, E.-H.; Thi, D.V.; Assaf-Ducrocq, C.; Gontier, E. Influence of Minerals and Elicitation on *Datura stramonium* L. Tropane Alkaloid Production: Modelization of the In Vitro Biochemical Response. *Plant Sci.* **2009**, *177*, 81–87. [\[CrossRef\]](#)
- Akhgari, A.; Laakso, I.; Maaheimo, H.; Choi, Y.H.; Seppänen-Laakso, T.; Oksman-Caldentey, K.-M.; Rischer, H. Methyl jasmonate Elicitation Increases Terpenoid Indole Alkaloid Accumulation in *Rhazya stricta* Hairy Root Cultures. *Plants* **2019**, *8*, 534. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Taha, A.J.; Twajj, B.M.A. Effect of Some Chemical and Physical Elicitors on Some Secondary Compound Induction of *Ricinus communis* through Callus Induction. *Al-Mustansiriyah J. Sci.* **2017**, *28*, 25–34.
- Mady, M. Effect of Foliar Application with Salicylic Acid and Vitamin E on Growth and Productivity of Tomato (*Lycopersicon Esculentum*, Mill.) Plant. *J. Plant Prod.* **2009**, *34*, 6715–6726. [\[CrossRef\]](#)
- Xu, Y.W.; Wen Xu, Y. Effects of Salicylic Acid on Monoterpene Production and Antioxidant Systems in *Houttuynia cordata*. *Afr. J. Biotechnol.* **2012**, *11*, 1364–1372.
- Singh, P.K.; Gautam, S. Role of Salicylic Acid on Physiological and Biochemical Mechanism of Salinity Stress Tolerance in Plants. *Acta Physiol. Plant.* **2013**, *35*, 2345–2353. [\[CrossRef\]](#)
- Gai, Q.-Y.; Jiao, J.; Wang, X.; Zang, Y.-P.; Niu, L.-L.; Fu, Y.-J. Correction to: Elicitation of *Isatis tinctoria* L. Hairy Root Cultures by Salicylic Acid and Methyl Jasmonate for the Enhanced Production of Pharmacologically Active Alkaloids and Flavonoids. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2019**, *137*, 417. [\[CrossRef\]](#)
- Hadizadeh, M.; Ofoghi, H.; Kianirad, M.; Amidi, Z. Elicitation of Pharmaceutical Alkaloids Biosynthesis by Salicylic Acid in Marine Microalgae *Arthrospira platensis*. *Algal Res.* **2019**, *42*, 101597. [\[CrossRef\]](#)

22. Rodríguez-Salus, M.; Bektas, Y.; Schroeder, M.; Knoth, C.; Vu, T.; Roberts, P.; Kaloshian, I.; Eulgem, T. The Synthetic Elicitor 2-(5-Bromo-2-Hydroxy-Phenyl)-Thiazolidine-4-Carboxylic Acid Links Plant Immunity to Hormesis. *Plant Physiol.* **2016**, *170*, 444–458. [\[CrossRef\]](#)
23. Hasanuzzaman, M.; Matin, M.A.; Fardus, J.; Hasanuzzaman, M.; Hossain, M.S.; Parvin, K. Foliar application of salicylic acid improves growth and yield attributes by upregulating the antioxidant defense system in *Brassica campestris* plants grown in lead-amended soils. *Acta Agrobot.* **2019**, *72*, 1765. [\[CrossRef\]](#)
24. Zamaninejad, M.; Khorasani, S.K.; Moeini, M.J.; Heidarian, A.R. Effect of salicylic acid on morphological characteristics, yield and yield components of corn (*Zeamays* L.) under drought condition. *Eur. J. Exp. Biol.* **2013**, *3*, 153–161.
25. Tucuch-Haas, C.; Alcántar-González, G.; Trejo-Téllez, L.I.; Volke-Haller, H.; Salinas-Moreno, Y.; Larqué-Saavedra, A. Effect of salicylic acid on growth, nutritional status, and performance of maize (*Zeamays*). *Agrociencia* **2017**, *51*, 771–781.
26. Estaji, A.; Niknam, F. Foliar salicylic acid spraying effect on growth, seed oil content, and physiology of drought-stressed *Silybum marianum* L. *plant. Agric. Water Manag.* **2020**, *234*, 106116. [\[CrossRef\]](#)
27. Safeer, M.; Rafi, Q.; Altaf, M.M.; Naeem, S.; Omer, F.; Iqbal, M.M.; Shakeel, A. Exogenous application of salicylic acid ameliorates growth and yield of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in saline soil. *Agrociencia* **2019**, *53*, 207–217.
28. Ullah, F.; Bano, A. Effect of plant growth regulator on oil yield and biodiesel production of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Braz. J. Plant Physiol.* **2011**, *23*, 27–31. [\[CrossRef\]](#)
29. Flores-Macias, A.; Vela-Correa, G.; Rodríguez-Gamiño, M.; Akhtar, Y.; Figueroa-Brito, R.; Pérez-Moreno, V.; Ramos-López, M.A. Effect of potassium nitrate on the production of ricinine by *Ricinus communis* and its insecticidal activity against Spodoptera frugiperda. *Rev. Fitotec. Mex.* **2016**, *39*, 41–47.
30. Wang, Z.; Li, D.; Zhou, Z.; Li, B.; Yang, W. A simple method for screening and quantification of ricinine in feed with HPLC and LC-MS. *J. Chromatogr. Sci.* **2009**, *47*, 585–588. [\[CrossRef\]](#)
31. Isenberg, S.L.; Carter, M.D.; Miller, M.A.; Noras, A.I.; Mojica, M.A.; Carlsen, S.T.; Bulathsinghala, C.P.; Thomas, J.D.; Johnson, R.C. Quantification of ricinine and abrine in human plasma by HPLC-MS-MS: Biomarkers of exposure to ricin and abrin. *J. Anal. Toxicol.* **2018**, *42*, 630–636. [\[CrossRef\]](#)
32. Nebo, L.; Varela, R.M.; Fernandes, J.B.; Palma, M. Microwave-Assisted Extraction of Ricinine from *Ricinus communis* Leaves. *Antioxidants* **2019**, *8*, 438. [\[CrossRef\]](#)
33. Wamakot, N.; Dieng, H.; Komalamisra, N.; Apiwathnasorn, C.; Morales, R.E.; Thanomsab, B.W.; Srisawat, R.; Attrapadung, S. Larvicidal and Adulticidal Activities of Castor Oil against the Dengue Vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vector of dengue in Colombia. *CES Med.* **2007**, *21*, 47–54.
34. Vasco-Leal, J.F.; Cuellar-Núñez, M.L.; Luzardo-Ocampo, I.; Ventura-Ramos, E.; Loarca-Piña, G.; Rodríguez-García, M.E. Valorization of Mexican *Ricinus communis* L. Leaves as a Source of Minerals and Antioxidant Compounds. *Waste Biomass Valorization* **2021**, *12*, 2071–2088. [\[CrossRef\]](#)
35. Ghassemi-Golezani, K.; Hassanzadeh, N.; Shakiba, M.-R.; Esmailpour, B. Exogenous Salicylic Acid and 24-Epi-Brassinolide Improve Antioxidant Capacity and Secondary Metabolites of *Brassica nigra*. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2020**, *26*, 101636. [\[CrossRef\]](#)
36. Henao, G.J.P.; Pajón, C.M.G.; Torres, J.M.C. Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia. *CES Med.* **2007**, *21*, 47–54.
37. Duarte, J.L.; de Faria Motta Oliveira, A.E.M.; Pinto, M.C.; Chorilli, M. Botanical Insecticide-based Nanosystems for the Control of *Aedes (Stegomyia) Aegypti* Larvae. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2020**, *27*, 28737–28748. [\[CrossRef\]](#)
38. Gafner, S.; Bergeron, C. The Challenges of Chemical Stability Testing of Herbal Extracts in Finished Products Using State-of-the-Art Analytical Methodologies. *Curr. Pharm. Anal.* **2005**, *1*, 203–215. [\[CrossRef\]](#)
39. Hilbig, J.; Alves, V.R.; Müller, C.M.O.; Micke, G.A.; Vitali, L.; Pedrosa, R.C.; Block, J.M. Ultrasonic-Assisted Extraction Combined with Sample Preparation and Analysis Using LC-ESI-MS/MS Allowed the Identification of 24 New Phenolic Compounds in Pecan Nut Shell [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] Extracts. *Food Res. Int.* **2018**, *106*, 549–557. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Valencia-Botín, A.J.; Gutiérrez-Lomelí, M.; Morales-Del-Río, J.A.; Guerrero-Medina, P.J.; Robles-García, M.A.; Ruiz-Cruz, S.; Wong-Corral, F.J.; Borboa-Flores, J.; Rueda-Puente, E.O.; Del-Toro-Sánchez, C.L. Efecto Inhibitorio de Extractos de *Vitex mollis* Kunth Contra Bacterias y Especies de *Fusarium* de Importancia Humana y Agrícola. *Rev. Fitotec. Mex.* **2018**, *41*, 353–363.
41. Bullangpoti, V.; Khumrungsee, N.; Pluempanupat, W.; Kainoh, Y.; Saguanpong, U. Toxicity of Ethyl Acetate Extract and Ricinine from *Jatropha gossypifolia* Senescent Leaves against *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Pestic. Sci.* **2011**, *36*, 260–263. [\[CrossRef\]](#)
42. Melo, W.C.; dos Santos, A.S.; Santa Anna, L.M.; Pereira, N., Jr. Acid and Enzymatic Hydrolysis of the Residue from Castor Bean (*Ricinus communis* L.) Oil Extraction for Ethanol Production: Detoxification and Biodiesel Process Integration. *J. Braz. Chem. Soc.* **2008**, *19*, 418–425. [\[CrossRef\]](#)
43. Hernández Martínez, M.; Montes Hernández, S. Guanajuato oil varied de higuera para la extracción de aceite industrial para Guanajuato. Folleto Técnico Núm. X INIFAP-CIRCE Campo Experimental Bajío. 2018. Available online: <https://es.scribd.com/document/447504555/4774-Produccion-de-semilla-de-higuera-Ricinus-communis-L-en-Guanajuato> (accessed on 20 May 2021).
44. Barrios-Gómez, E.J.; Canul-Ku, J.; Hernández-Arenas, M.G.; Solís-Bonilla, J.L. Evaluation of two castor bean cycles in Morelos, Mexico: Sowing and regrowth. *Rev. Mex. Cienc. Agric.* **2018**, *9*, 1663–1673.