

Cuantificación del contenido de ésteres de forbol por HPTLC en semillas de genotipos de *Jatropha*

Quantification of phorbol esters content by HPTLC in seeds of *Jatropha* species genotypes

Salazar-Villa, E.¹, Medina-Rodelo, D. P.², Rojo-Báez, I.¹, Báez-Parra, K.M.³, Soto-Landeros, F.², Angulo-Escalante, M.A.^{2*}

¹Facultad de Biología. Universidad Autónoma de Sinaloa. Calzada de las Américas y Universitarios, Ciudad Universitaria; C.P. 80040, Culiacán, Sinaloa, México.

²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Unidad Culiacán. Carretera a Eldorado Km 5.5. Campo El Diez: C.P. 80110, Culiacán, Sinaloa, México.

³Facultad de Ciencias Químico-Biológicas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Calzada de las Américas y Universitarios, Ciudad Universitaria; C.P. 80040, Culiacán, Sinaloa, México.

RESUMEN

La *Jatropha* pertenece a la familia Euphorbiaceae e incluye especies de interés como *Jatropha curcas*, *J. platyphylla* y *J. cinerea*, cuyas semillas presentan potencial para la producción de biocombustibles por su valioso contenido de aceite (50-60 %) y para la elaboración de alimentos balanceados por su alto contenido de proteína cruda (25-30 %). Sin embargo, las semillas de *Jatropha* contienen compuestos antinutricionales y tóxicos tales como ésteres de forbol, comúnmente conocidos como promotores de cáncer, lo que limita su aprovechamiento industrial y alimentario si no se identifican adecuadamente, ya que su ausencia o presencia determina la necesidad de procesos de detoxificación previos a su uso. El objetivo de este estudio fue desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de ésteres de forbol (PE) mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) en semillas de *Jatropha* de diferentes regiones de Sinaloa. Los resultados mostraron que *Jatropha curcas*-Capule, *J. curcas*-Imala y *J. cinerea*-La Campana presentaron concentraciones de 1.78 mg/g, 0.96 mg/g y 0.17 mg/g de ésteres de forbol, respectivamente. En contraste, en *J. curcas*-La Campana, *J. platyphylla*-La Campana y *J. platyphylla*-Mocorito no se detectaron niveles de estos compuestos. Estos hallazgos evidencian variaciones importantes en el contenido de ésteres de forbol entre genotipos, lo cual es relevante para su posible aprovechamiento y manejo.

Palabras clave: Cromatografía, Germen, HPTLC, *Jatropha*.

ABSTRACT

Jatropha belongs to the Euphorbiaceae family and includes species of interest such as *Jatropha curcas*, *J. platyphylla*, and *J. cinerea*, whose seeds have potential for biofuel production due to their valuable oil content (50-60 %) and to produce animal feed due to their high crude protein content (25-30 %). However, *Jatropha* seeds contain antinutritional and toxic compounds such as phorbol esters, commonly known as cancer promoters, which limits their industrial and food use if they are not properly identified, since their absence or presence determines the need for detoxification processes prior to use. The objective of this study was to develop and validate an analytical method for the quantification of phorbol esters (PE) using high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) in *Jatropha* seeds from different regions of Sinaloa. The results showed that *Jatropha curcas*-Capule, *J. curcas*-Imala, and *J. cinerea*-La Campana presented concentrations of 1.78 mg/g, 0.96 mg/g, and 0.17 mg/g of phorbol esters, respectively. In contrast, in *J. curcas*-La Campana, *J. platyphylla*-La Campana, and *J. platyphylla*-Mocorito, no levels of these compounds were detected. These findings show significant variations in phorbol ester content among genotypes, which is relevant for their potential use and management.

Keywords: Chromatography, Kernel, HPTLC, *Jatropha*.

INTRODUCCIÓN

*Autor de correspondencia: MIGUEL ÁNGEL ANGULO ESCALANTE
E-mail: manguolo@ciad.mx
ORCID ID: [0000-0001-9381-8802](https://orcid.org/0000-0001-9381-8802)

ENVIADO: FEBRERO 2026
ACEPTADO: ABRIL 2026

La familia Euphorbiaceae, conocida como una de las más diversas del reino vegetal, se distribuye por todo el mundo, excepto en las zonas polares, sin embargo, se representa más en regiones tropicales y subtropicales (Cavalcante et al., 2020). De las 186 especies de *Jatropha* que existen en todo el mundo, aproximadamente el 21 % de las especies son endémicas de México, lo que sugiere que México es un centro de diversidad y endemismo para este grupo de plantas, caracterizadas por su rápido crecimiento y fácil propagación (Govaerts et al., 2012). Además, las semillas de *Jatropha*, especialmente *J. curcas*, *J. platyphylla* y *J. cinerea*, tienen un contenido de aceite alto, lo que ha permitido que estas especies sean consideradas con potencial industrial para la producción de biodiésel (Sosa-Segura et al., 2014). Por su parte, *Jatropha curcas* L. es comúnmente conocido como "piñoncillo" y debido a su notable adaptabilidad a condiciones edafoclimáticas adversas, incluyendo suelos degradados y periodos prolongados de estrés hídrico, ha generado interés biotecnológico (Jaspal et al., 2023). En México, se han identificado variedades tóxicas y no tóxicas, en contraste con regiones de África y Asia, donde predominantemente se han reportado variedades tóxicas (Leyva-Padrón et al., 2020). Tanto las especies tóxicas como las no tóxicas de *Jatropha* presentan potencial para la producción de biocombustibles, alimentos y piensos (Makkar et al., 2011; Edrisi et al., 2015); sin embargo, en el caso de las variedades tóxicas, es necesario aplicar tratamientos adicionales para la eliminación o reducción de compuestos tóxicos, como los ésteres de forbol, a fin de garantizar su uso seguro (de Barros et al., 2024). Asimismo, estas variedades tóxicas han demostrado potencial como molusquicidas e insecticidas (Devappa et al., 2012a; Roach et al., 2012). En particular, *J. platyphylla* es una especie silvestre menos conocida, es endémica de México y se distribuye por la costa del Pacífico desde Sinaloa hasta Michoacán (Salazar-Villa et al., 2020). Esta especie tiene potencial para la producción de biocombustibles y alimentos debido a su alto contenido de aceite en la semilla (60.3 %) y proteína cruda en la harina (27.1 %), además de ser una fuente de compuestos bioactivos para el control de enfermedades fúngicas (Sosa-Segura et al., 2014; Leyva-Acuña et al., 2023). Finalmente, *J. cinerea* es una especie distribuida en poblaciones silvestres del noroeste de México y se caracteriza por su resistencia a largos periodos de sequía y su desarrollo en suelos salinos. Además, tiene usos medicinales e industriales y se considera una materia prima no convencional con potencial para producir biodiésel (Vega-Ruiz et al., 2021). La relevancia de estas especies radica en su perfil químico, las semillas de *Jatropha* destacan por su composición lipídica rica en ácidos grasos, monoinsaturados como el oleico (24 % al 45

%) y poliinsaturados como el linoleico (27 % al 34 %), ideales para la producción de biodiésel de alta calidad (Duque & López, 2022; Halim et al., 2022). De igual manera, la harina desgrasada posee un alto contenido de proteína cruda (61.8 %) con un balance de aminoácidos competitivo frente a fuentes convencionales como la soya y la quinoa (Olloqui et al., 2022; Ramadan-Hassanien, 2023). Sin embargo, una limitación importante en la aceptación de *Jatropha* como fuente de biodiésel es la presencia de ésteres de forbol, los cuales son tóxicos y potencialmente cancerígenos cuando son consumidos por humanos y animales, lo que además impide el uso directo del aceite y de la torta residual en la formulación de alimentos para aves, ganado y peces (Pelletier et al., 2015). No obstante, estos compuestos también presentan interés desde el punto de vista de su posible aprovechamiento como agentes bioactivos, particularmente insecticidas, por lo que su cuantificación precisa es necesaria tanto para la evaluación de riesgos como para la valorización del recurso.

Los ésteres de forbol son promotores de tumores y pueden causar una variedad de efectos biológicos negativos a bajas concentraciones (Wakandigara et al., 2020). En este contexto, la determinación de su contenido es fundamental, ya que permite establecer la seguridad del material vegetal, así como su potencial de uso industrial y la necesidad de procesos de detoxificación cuando sea necesario. Sin embargo, los métodos analíticos disponibles para su cuantificación, aunque efectivos, pueden presentar limitaciones en términos de accesibilidad, costo o tiempo de análisis, lo que justifica el desarrollo de metodologías alternativas.

Considerando lo anterior, esta investigación tuvo como objetivo desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de ésteres de forbol (PE) mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) en semillas de los genotipos de *J. curcas*, *J. platyphylla* y *J. cinerea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Las semillas utilizadas en este estudio se obtuvieron de diferentes especies del género *Jatropha* establecidas en un campo experimental localizado en La Campana, Sinaloa, México, con coordenadas geográficas (N 25 ° 30'; W 108 ° 22'). En total, se evaluaron tres genotipos de *Jatropha curcas*: JCC-T (tóxico) y JCC-NT (no tóxico), ambos originarios de El Capule, Culiacán, así como JCI proveniente de Imala, Culiacán. Asimismo, se analizó un genotipo de *Jatropha cinerea* (JCL) de La Campana, Culiacán, y dos genotipos de *Jatropha platyphylla*: JPLC, originario de La Campana, y JPP, procedente de

Pericos, Mocrorito. Las muestras fueron codificadas utilizando una nomenclatura compuesta por la abreviatura de la especie seguida de la localidad de colecta.

Las semillas fueron recolectadas durante el periodo de fructificación, comprendido entre agosto y septiembre de 2021, a partir de individuos previamente seleccionados con base en criterios de sanidad y vigor. Se eligieron plantas bien ramificadas, con adecuado desarrollo vegetativo y sin síntomas visibles de enfermedades o daño por plagas, con el fin de garantizar la calidad y representatividad del material vegetal empleado en el estudio. Posteriormente, las semillas se almacenaron en condiciones secas y a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y EXTRACCIÓN DE ÉSTERES DE FORBOL (PE)

Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Biorecursos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.). Las semillas de genotipos de especies de *Jatropha* se descascararon y molieron en una licuadora para obtener una harina homogénea, por separado. Para la extracción se pesaron 2 g de cada muestra y se mezclaron con 15 mL de metanol grado HPLC (SIGMA-Aldrich, Misuri, E.U.A., 99.9 % de pureza) en tubos cónicos de centrifuga de 50 mL. Las muestras se sometieron a sonicación en baño ultrasónico (Modelo Branson 2800) durante 30 min a 10 °C. Posteriormente, se centrifugaron a 12,000 rpm a 4 °C durante 10 min.

El sobrenadante metanólico (capa superior) se recuperó en un matraz limpio. El residuo se sometió a dos extracciones adicionales bajo las mismas condiciones y los sobrenadantes obtenidos se combinaron para cada muestra.

Los extractos metanólicos combinados de cada muestra se concentraron en un evaporador rotatorio a 337 mbar y 70 rpm y el extracto concentrado se reconstituyó con 2 mL de metanol, se agitó en un vórtex (Genie 2 Fisher) y se filtró a través de una membrana de 0.45 µm y se almacenó a -18 °C en un vial ámbar para análisis cromatográficos posteriores (Devappa et al., 2012a; Jonas et al., 2022).

ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS

Con un aplicador semiautomático (Limonat 5, CAMAG, Muttentz, Suiza), se aplicaron 10 µL de cada muestra en forma de bandas cromatográficas de 8 mm de longitud sobre placas de aluminio de 20 x 10 cm recubiertas con gel de sílice TLC 60 F254. Las placas se desarrollaron en una cámara

cromatográfica (CAMAG, Muttentz, Suiza) previamente saturada durante 10 min con una fase móvil de acetona-éter de petróleo 4:6 (v/v) (SIGMA-Aldrich Misuri, E.U.A., 99.9 % de pureza). Una vez alcanzado el frente del disolvente (80 mm), se permitió que la placa desarrollada se secase con aire frío durante 5 min. Las placas se escanearon en una cámara de luz ultravioleta (UV) (Cabinet 4, CAMAG, Muttentz, Suiza) a 254 y 366 nm. Posteriormente, se realizó un escaneo densitométrico utilizando un escáner (TLC Scanner 4, CAMAG, Muttentz, Suiza). El factor de retención (Rf) se calculó como la relación entre la distancia recorrida por cada banda cromatográfica y la distancia recorrida por el frente del solvente en la placa. Los datos espectrales UV de todos los picos se acumularon en el rango de 200-400 nm y los cromatogramas se registraron a 280 nm con la ayuda del software visionCATS, versión 2.4 (CAMAG, Muttentz, Suiza).

PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

La validación del método se realizó con base a los parámetros de especificidad, linealidad, precisión, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ), de acuerdo con ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) (ICH, 2005; Patel et al., 2010).

La linealidad se evaluó mediante curvas de calibración construidas con cinco concentraciones diferentes de PMA (Forbol 12-miristato-13-acetato, pureza ≥ 98 %), por duplicado en cuatro corridas independientes. La especificidad se verificó utilizando datos de espectros UV, confirmando la ausencia de interferencias en el tiempo de retención del analito.

El LOD y LOQ se calcularon en función de la desviación estándar (DE) de la respuesta y la pendiente (S) de las curvas de calibración según las fórmulas ($LOD = 3.3 (DE/S)$ y $LOQ = 10 (DE/S)$).

La precisión del método se evaluó en función del cálculo de la desviación estándar relativa (% RSD) calculada como la relación entre la desviación estándar y la media de las mediciones, multiplicada por 100. La repetibilidad (precisión intra-día) se determinó analizando múltiples réplicas de la misma muestra bajo las mismas condiciones experimentales y de reproducibilidad (precisión inter-día) se evaluó utilizando el análisis de las muestras en diferentes días.

La recuperación del método se evaluó mediante el análisis de muestras fortificadas con concentraciones conocidas del estándar PMA, las cuales

fueron sometidas al mismo procedimiento de extracción y análisis descrito para las muestras. La recuperación (%) se calculó como la relación entre la cantidad de analito recuperado después del proceso de extracción y la cantidad teóricamente añadida, multiplicada por 100.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados del contenido de ésteres de forbol en los genotipos de especies de *Jatropha* se expresaron como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó utilizando el software Minitab versión 18.0. Se aplicó un ANOVA de una vía y, cuando se detectaron diferencias entre las medias, se realizó una prueba post hoc de Tukey con un nivel de significancia de $p < 0.05$. La linealidad del método HPTLC se evaluó mediante análisis de regresión lineal. A partir de este análisis se obtuvo la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (R^2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE ÉSTERES DE FORBOL

Los germoplasmas de *Jatropha* pueden clasificarse en tóxicos y no tóxicos, lo cual está asociado con la presencia o ausencia de compuestos como los ésteres de forbol. Debido a que estos metabolitos están relacionados con efectos tóxicos, resulta fundamental desarrollar técnicas confiables para su detección y cuantificación. Esto permite prevenir posibles intoxicaciones y garantizar que el aprovechamiento de la pasta y el aceite de *Jatropha* en las industrias energética y alimentaria se realice de manera segura. La cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) es una herramienta analítica potente y altamente específica para identificar componentes individuales presentes en extractos de plantas (Demissie & Lele, 2010). Existen estudios donde se utiliza esta técnica para la detección de metabolitos terpenoides, un grupo al que pertenecen los ésteres de forbol (Yamunadevi et al., 2011).

Los análisis por HPTLC revelaron tres bandas cromatográficas con valores de R_f de 0.43, 0.46 y 0.50 en JCL (Figura 1). Estos valores muestran coincidencia con los rangos de migración reportados para ésteres de forbol en *Jatropha*, previamente identificados mediante HPLC en estudios anteriores (Beutler et al., 1989; Soto-León et al., 2014), lo que sugiere la posible presencia de estos metabolitos en esta especie. JCC-T y JCI muestran cuatro bandas cromatográficas que representan componentes de ésteres de forbol, respectivamente (Tabla 1)(Figuras 2 y 3). Para JCC-NT,

JPP y JPLC no se detectaron bandas cromatográficas. Los cromatogramas obtenidos para las muestras positivas (JCL, JCC-T y JCI) mostraron señales con valores de R_f comprendidos entre 0.30 y 0.50, intervalo comparable con el reportado por Demissie & Lele (2010), quienes identificaron ésteres de forbol en *Jatropha curcas* de India con valores de R_f entre 0.36 y 0.50.

El análisis densitométrico permitió obtener picos cromatográficos correspondientes a los componentes presentes en las bandas cromatográficas. En la muestra JCL se observaron tres picos principales, mientras que en JCC-T se registró una mayor intensidad relativa en los picos 1 y 4, y en JCI predominó un pico de mayor área correspondiente al primer pico detectado en el intervalo analizado.

Estos perfiles pueden asociarse con algunos de los factores de ésteres de forbol (C1-C7) descritos previamente para especies del género *Jatropha*, los cuales corresponden a variantes estructurales con diferente comportamiento cromatográfico. En particular, estos factores representan mezclas de ésteres de forbol con variaciones en su cadena lateral y grado de ciclación, lo que les confiere diferencias en su movilidad en sistemas cromatográficos (Francis et al., 2021). En este sentido, Liu et al. (1997) reportaron la presencia de estos factores en semillas de *J. curcas* de diferentes procedencias y señalaron que las variaciones en su composición pueden emplearse como indicadores químicos para la caracterización de germoplasmas y el posible origen geográfico de las semillas. El factor C1-C5 de *Jatropha* contiene una unidad de ciclohexano bicíclica, y el factor C6-C7 de *Jatropha* contiene una unidad de ciclobuteno, la cual se encontró por primera vez dentro de esta clase de compuestos (Fujiki et al., 2017).

En el presente estudio, las muestras analizadas mostraron perfiles cromatográficos diferenciados dentro de este intervalo de R_f . En JCL se observaron tres picos principales en la región de R_f 0.43-0.50, mientras que en JCC-T se registró una mayor intensidad relativa en los picos ubicados aproximadamente en R_f 0.43 y 0.52, y en JCI predominó un pico principal cercano a R_f 0.43. La coincidencia de estos valores con los rangos reportados en la literatura sugiere la posible presencia de algunos de los factores de ésteres de forbol previamente descritos para especies de *Jatropha*. El uso de técnicas, como HPTLC con espectrometría de masas, permitiría determinar el contenido de estos factores. Si bien técnicas analíticas complementarias, como la espectrometría de masas, permitirían

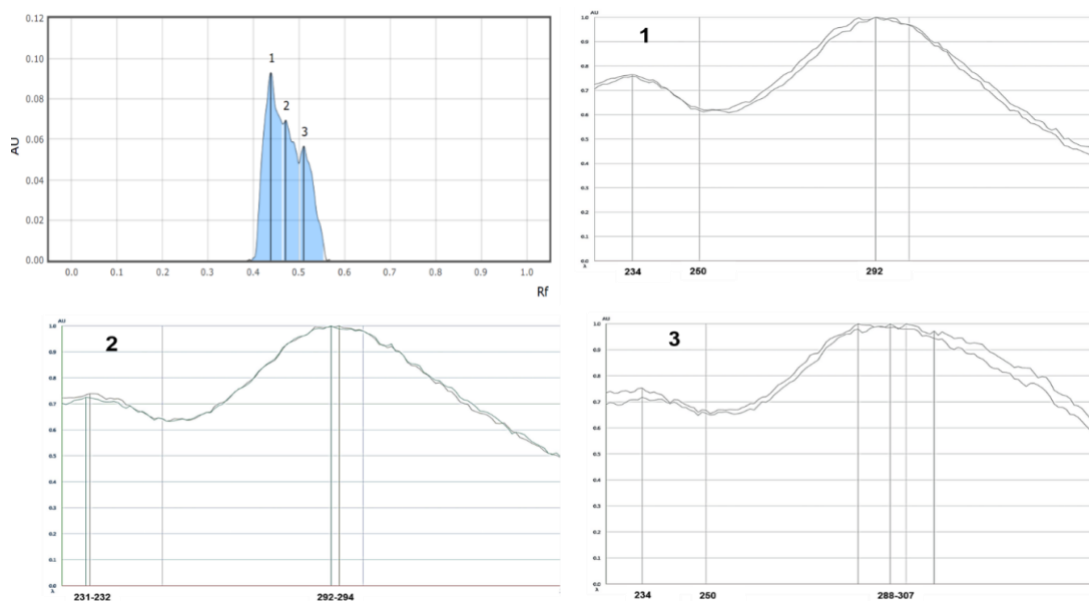


Figura 1. Cromatograma de ésteres de forbol (PE) del germen de la semilla de JCL y espectros ultravioleta (UV) de los principales picos de PE. 1. Pico 1; 2. Pico 2 y 3. Pico 3.

Tabla 1. Rf promedio de los componentes de los ésteres de forbol (PE) y correlación de los espectros de absorción.

Muestra	PE	Rf promedio±SD	Correlación
J. cinerea (JCL)	Pico 1	0.4385±0.007	0.99038
	Pico 2	0.4695±0.003	0.976028
	Pico 3	0.5015±0.01	0.967538
J. curcas Capule (JCC-T)	Pico 1	0.4375±0.002	0.994629
	Pico 2	0.465±0.004	0.999057
	Pico 3	0.4885±0.002	0.995322
	Pico 4	0.5195±0.001	0.992676
J. curcas Imala (JCI)	Pico 1	0.363±0.002	0.99315
	Pico 2	0.386±0.005	0.997804
	Pico 3	0.4±0.007	0.966096
	Pico 4	0.43±0.002	0.95253

confirmar la identidad estructural de cada uno de los factores individuales de ésteres de forbol, el presente estudio se centra en el desarrollo y validación de un método HPTLC para la determinación de ésteres de forbol totales en semillas de diferentes genotipos de *Jatropha*.

Los espectros de absorción pueden proporcionar información útil relacionada con la fragmentación de componentes individuales, lo que puede utilizarse para buscar nuevos metabolitos con características estructurales similares. Este análisis puede ser particularmente útil para determinar la presencia de componentes relacionados en materiales

vegetales e investigar la degradación fitoquímica, el metabolismo y la biosíntesis cuantitativa y cualitativa (Liu et al., 1997; Roque et al., 2017).

Tabla 2. Comparación de los espectros de absorción entre ésteres de forbol (PE) Picos. VS = Contra.

PE	Muestra	Correlación
Pico 1	JCL VS JCC-T	0.964
	JCL VS JCI	0.986519
	JCC-T VS JCI	0.971032
Pico 2	JCL VS JCC-T	0.970778
	JCL VS JCI	0.970966
	JCC-T VS JCI	0.965501
Pico 3	JCL VS JCC-T	0.983728
	JCL VS JCI	0.956347
	JCC-T VS JCI	0.975087
Pico 4	JCC-T VS JCI	0.992662

En JCL, los espectros de absorción del pico 1 fueron 234, 250 y 292 nm; del pico 2 fueron 231-232 y 292-294 nm; y del pico 3 fueron 234, 250, 288-307 nm (Figura 1). La comparación de los espectros de absorción es útil para evitar la interpretación errónea de picos no PE, que se muestran en el mismo Rf. Estos picos pueden aparecer debido a la descomposición de los PE o a la interferencia de moléculas lipídicas complejas presentes en la matriz (Devappa et al., 2012a).

En JCC-T, los espectros de absorción del pico 1 fueron 234, 250 y 287-288 nm; del pico 2 fueron 231-234 y 287-288 nm; mientras que del pico 3 fueron 232-234 y 288 nm. El pico 4 tuvo sus valores máximos de espectro de absorción en 232-233, 288 y 314 nm (Figura 2). En JCI, los espectros de absorción del pico 1 fueron 234, 250 y 292 nm; para el pico 2 fueron 231-232 y 292-294 nm; los máximos de absorción del espectro del pico 3 fueron 234, 250 y 288-307 nm. Los espectros de absorción del pico 4 fueron 232, 250 y 283-288 nm (Figura 3).

Dado que las concentraciones de PE detectadas en las muestras se informan como equivalentes al estándar de PMA, el análisis de los espectros de absorción es importante para identificar los componentes. Anteriormente, se han reportado los espectros de absorción para los factores C1-C5, cuya intensidad de señal oscila alrededor de 280 nm, mientras que para el factor C6 la máxima absorción es de 304 nm (Kongmany et al., 2016).

En el presente estudio, los espectros de absorción asociados a los picos cromatográficos observados en las Figuras 1-3 muestran máximos predominantes en el intervalo de 280-292 nm en las muestras JCL, JCC-T y JCI. Este comportamiento es consistente con el rango reportado para los factores C1-C5, lo que sugiere que los compuestos detectados corresponden principalmente a este tipo de ésteres de forbol. Asimismo, no se observaron señales con máximos cercanos a 304 nm, lo cual indicaría la ausencia o baja contribución de compuestos asociados al factor C6 bajo las condiciones analíticas empleadas.

El contraste de los picos de los espectros de absorción obtenidos para PE mostró altas correlaciones entre ellos (Tabla 2). Los picos 1 y 2 mostraron un $R^2 > 0.96$; el pico 3 un $R^2 > 0.95$ y el pico 4 un $R^2 > 0.99$. Esta alta correlación espectral indica una elevada similitud en los perfiles de absorción UV entre los diferentes picos detectados, lo cual sugiere que corresponden a compuestos estructuralmente relacionados dentro del mismo grupo de ésteres de forbol.

Tabla 3. Concentración de ésteres de forbol (PE)(mg/g) en el germen de *Jatropha*.

Genotipos de especies de <i>Jatropha</i>	PE mg/g±SD
JCC-T	1.78±0.1a
JCI	0.96±0.11b
JCL	0.17±0.3bc
JCC-NT	ND
JPLC	ND
JPP	ND

JCC-T = *J. curcas* Capule (tóxico), JCI = *J. curcas* Imala, JCL = *J. cinerea* La Campana, JCC-NT = *J. curcas* Capule (no tóxico), JPLC = *J. platyphylla* La Campana, JPP = *J. platyphylla* Pericos. Letras diferentes entre filas indican diferencia estadística $p < 0.05$. ND: No detectado

VALIDACIÓN DEL MÉTODO HPTLC

La tabla 3 presenta el contenido de PE determinado en semillas de tres especies de *Jatropha* provenientes de diferentes localidades. Se observaron diferencias en las concentraciones de PE entre los genotipos analizados. El mayor contenido se registró en JCC-T (1.78 ± 0.10 mg/g), seguido de JCI (0.96 ± 0.11 mg/g), mientras que JCL presentó una

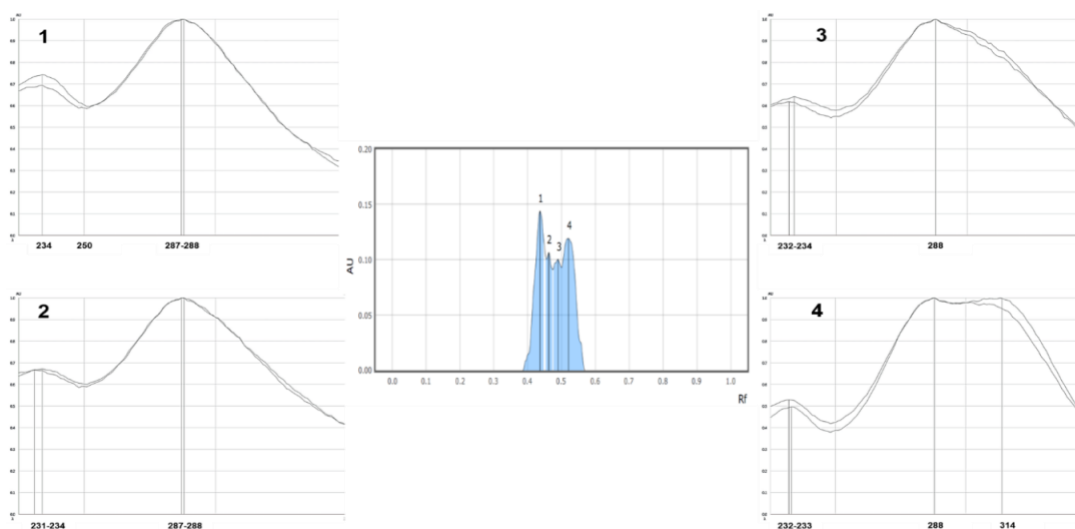


Figura 2. Cromatograma de ésteres de forbol (PE) del germen de la semilla de JCC-T y espectros ultravioleta (UV) de los principales picos de PE. 1. Pico 1; 2. Pico 2; 3. Pico 3 y 4. Pico 4.

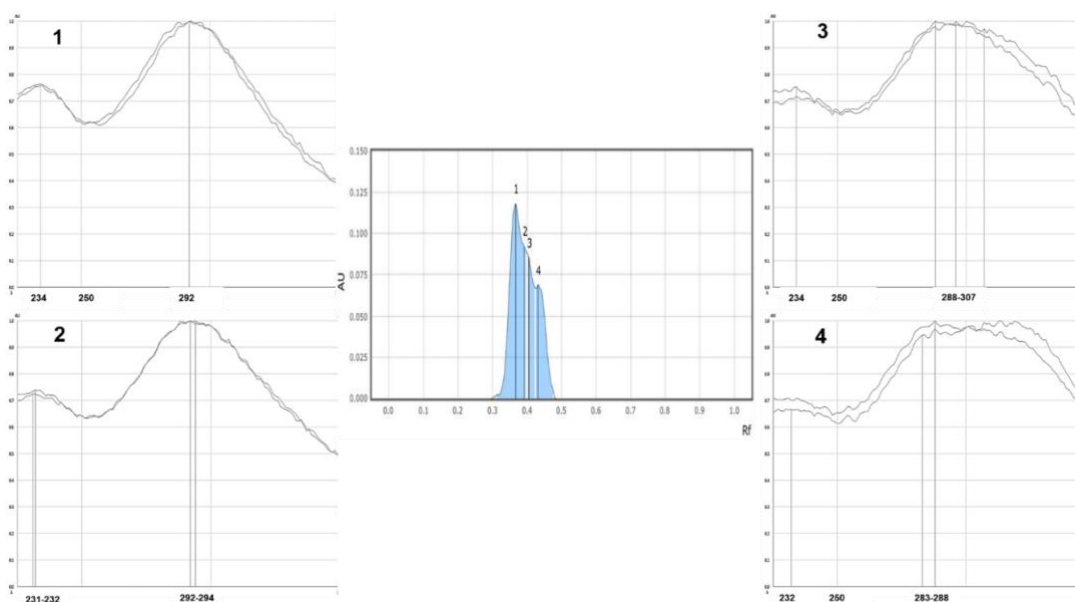


Figura 3. Cromatograma de ésteres de forbol (PE) del germen de semilla de JCI y espectros ultravioleta (UV) de los principales picos de PE. 1. Pico 1; 2. Pico 2; 3. Pico 3 y 4. Pico 4.

concentración considerablemente menor (0.17 ± 0.30 mg/g). El análisis de varianza mostró diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos ($p < 0.05$). Según Makkar & Becker (2009), un rango de 0.86 a 1.48 mg/g de PE se considera una especie tóxica. Por lo tanto, JCC-T y JCI podrían considerarse materiales tóxicos. JCL puede definirse como una

especie de *Jatropha* no tóxica debido a su bajo contenido de PE, coincidiendo con lo que se informó previamente (Soto-León et al., 2014). Estos resultados evidencian la variabilidad en el contenido de ésteres de forbol entre las especies evaluadas. Estudios previos han reportado concentraciones variables de PE en semillas de *J. curcas* provenientes de

diferentes regiones geográficas, lo que sugiere que factores genéticos y ambientales influyen en la acumulación de estos compuestos. No obstante, la información disponible sobre el contenido de PE en otras especies del género, como *J. cinerea* y *J. platyphylla*, es limitada. En este sentido, los resultados obtenidos en el presente trabajo contribuyen a ampliar el conocimiento sobre la variabilidad del contenido de ésteres de forbol en distintas especies de *Jatropha*.

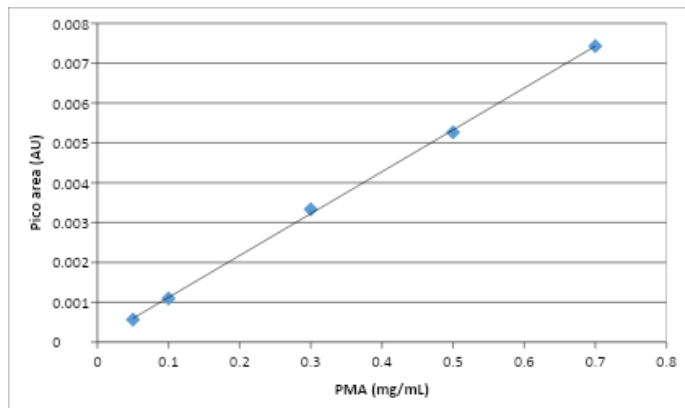


Figura 4. Curva de calibración de 12-myristato-13-acetato de forbol (PMA) y su respectiva distribución de residuos.

En *J. curcas*, el contenido de PE reportado en la literatura muestra una amplia variabilidad dependiendo del origen geográfico y del genotipo. Se han registrado concentraciones de 1 a 3 mg/g en semillas y de 3 a 6 mg/g en aceite (Devappa et al., 2012a), mientras que otros estudios reportan valores entre 0.206 y 3.406 mg/g en diferentes regiones del mundo (Liu et al., 1997). En contraste, algunas variedades mexicanas consideradas no tóxicas presentan contenidos significativamente menores, generalmente inferiores a 0.3 mg/g, mientras que genotipos de otras regiones, como Brasil, pueden alcanzar valores cercanos a 3 mg/g (Makkar et al., 1998; Oskoueian et al., 2011; Chún & Roldan, 2013).

Se ha encontrado que el PE es tóxico para una amplia variedad de animales, incluidos ratones, ratas, cabras, ovejas, terneros, pollos, cerdos, peces y especies acuáticas más pequeñas, incluidos los caracoles (Makkar & Becker, 1997; Makkar & Becker, 2009; Devappa et al., 2012a). En consecuencia, la identificación de materiales tóxicos o aquellos con trazas de PE es esencial en los programas de mejoramiento genético para identificar genotipos con menor contenido de estos metabolitos, con el

propósito de la extracción de aceite en alimentación animal (Vischi et al., 2013; Liu et al., 1997).

De manera complementaria, la identificación de genotipos con contenidos altos de ésteres de forbol también resulta relevante debido a su potencial aplicación en el desarrollo de agentes biológicos con actividad insecticida y otras aplicaciones biotecnológicas o medicinales, aprovechando su reconocida actividad biológica sobre diversos organismos (Devappa et al., 2012a; Roach et al., 2012).

La validación del método HPTLC mostró un desempeño adecuado para la determinación de PE en semillas de *Jatropha*. La relación entre la concentración del estándar forbol 12-miristato-13-acetato (PMA) y el área de los picos cromatográficos presentó un comportamiento lineal en el intervalo de 0.05-0.7 mg/mL, obteniéndose una ecuación de regresión $y = 0.0105x + 0.00007$ con un coeficiente de determinación ($R^2 = 0.997$), lo que indica una respuesta analítica proporcional dentro del rango evaluado. La curva de regresión de las áreas de los picos frente a las concentraciones de PMA fue lineal con un coeficiente de determinación (R^2) > 0.99 y el rango de linealidad fue de 0.05-0.7 mg/mL (Figura 4) (Faria-Machado et al., 2019).

La precisión del método, expresada como desviación estándar relativa (%RSD), mostró valores intra-día entre 3.49 % y 17.45 %, mientras que el % RSD inter-día fue de 3.44 %, lo que refleja una adecuada reproducibilidad del método. Los valores más altos de % RSD se observaron en las concentraciones más bajas del estándar, lo cual es consistente con la mayor variabilidad analítica que suele presentarse cerca del límite de detección en métodos cromatográficos. De acuerdo con criterios comúnmente aceptados para la validación de métodos analíticos, valores de %RSD inferiores al 20 % pueden considerarse aceptables cuando se analizan concentraciones bajas del analito, mientras que valores menores al 10 % indican una precisión alta del método (Patel et al., 2010; Shrivastava & Gupta, 2011).

La calidad de un método analítico se evalúa en términos de su idoneidad para el propósito, considerando aspectos como recuperación, sensibilidad, estabilidad del analito y facilidad de análisis. En este contexto, el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) constituyen parámetros importantes en la validación de métodos analíticos, ya que describen la concentración mínima de un analito que puede detectarse o cuantificarse de manera confiable mediante un procedimiento analítico (Devappa et al., 2012b). En este estudio se obtuvieron valores de LOD de 0.0261 mg y LOQ de

0.087 mg, lo que indica una sensibilidad adecuada del método para la detección de PE.

En estudios previos realizados con muestras de *J. curcas*, se han reportado valores de LOD y LOQ de 0.0051 y 0.0171 mg/mL, respectivamente, empleando técnicas como espectroscopía UV e infrarroja (Liu et al., 1997). En este sentido, los límites obtenidos permiten la detección de concentraciones compatibles con los niveles reportados en semillas tóxicas y no tóxicas de *Jatropha*, considerando que concentraciones superiores a 0.86 mg/g se asocian con materiales tóxicos, mientras que contenidos entre 0.11 y 0.27 mg/g corresponden a genotipos no tóxicos reportados en la literatura (Li et al., 2010; Devappa et al., 2012a). Por lo tanto, el método presenta una sensibilidad suficiente para discriminar entre genotipos con potencial toxicológico y no tóxico dentro del rango de interés biológico.

La recuperación de PE mediante HPTLC osciló entre 41.42 % y 64.8 %. Valores comparables han sido reportados en muestras fortificadas analizadas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), donde se observaron recuperaciones entre 51 % y 69 % (Baldini et al., 2014). Otros estudios han reportado recuperaciones cercanas al 98.5 % mediante extracción con metanol seguida de análisis por HPLC-UV (Neu et al., 2018). La recuperación se considera un indicador de la exactitud del método, ya que evalúa la proximidad entre el valor medido y el valor real del analito (ICH, 2005). De acuerdo con criterios internacionales, recuperaciones entre 70 % y 120 % \pm 20 % suelen considerarse aceptables para métodos analíticos, aunque valores menores pueden ser admisibles cuando se trata de concentraciones muy bajas del analito y el método demuestra una precisión adecuada (Patel et al., 2010; Shrivastava & Gupta, 2011; Nishshanka et al., 2016; Codex Alimentarius Commission, 2017). Por otra parte, los métodos HPTLC previamente desarrollados para la determinación de compuestos fenólicos en especies del género *Jatropha* han demostrado ser reproducibles y selectivos para el análisis de metabolitos en extractos vegetales (Dwivedi et al., 2020). En conjunto, estos resultados indican que el método HPTLC desarrollado presenta sensibilidad y reproducibilidad adecuadas para la determinación de ésteres de forbol en semillas de diferentes especies de *Jatropha*.

CONCLUSIONES

Se confirmó la presencia de ésteres de forbol en concentraciones de 0.17 mg/g a 1.78 mg/g en el germen de algunas especies de *Jatropha* analizadas,

Jatropha curcas y *Jatropha cinérea*, utilizando la técnica HPTLC; la cual demostró ser capaz de cuantificarlos. Esta técnica podría considerarse como control de calidad para la selección de semillas y así poder obtener aceite vegetal y pasta rica en proteínas libres de ésteres de forbol.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Saúl León-Niebla, Alexander Casian-Plaza, Briceida Pérez, Verónica Pérez, Eduardo Sánchez y Werner Rubio por la asistencia técnica.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

Declaramos que no tenemos conflictos de interés.

REFERENCIAS

- Baldini, C., Ferfuaia, R., Bortolomeazzi, G., Verardo, V., Pascali, E., Piasentier, L., & Franceschi, L. (2014). Determination of phorbol esters in seeds and leaves of *Jatropha curcas* and in animal tissue by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Industrial Crops and Products*, 59, 268–276. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.023>
- Beutler, J., Alvarado, A., McCloud, T., & Cragg, G. (1989). Distribution of phorbol ester bioactivity in the *Euphorbiaceae*. *Phytotherapy Research*, 3(5), 188–192. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650030507>
- Cavalcante, N. B., da Conceição Santos, A. D., & da Silva Almeida, J. R. G. (2020). The genus *Jatropha* (*Euphorbiaceae*): A review on secondary chemical metabolites and biological aspects. *Chemico-Biological Interactions*, 318, 108976. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.108976>
- Chún, D., & Roldan, D. (2013). Cuantificación de ésteres de forbol en partes estructurales de semilla descascarada en ocho accesiones de *Jatropha curcas* [Tesis de licenciatura]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.
- Codex Alimentarius Commission. (2017). Guidelines on performance criteria for methods of analysis for the determination of pesticide residues in food and feed (CXG 90-2017).
- de Barros, C. R., Ferreira, L. M. M., Fraga, I., Mourão, J. L., & Rodrigues, M. A. M. (2024). Detoxification methods of *Jatropha curcas* seed cake

- and its potential utilization as animal feed. *Fermentation*, 10(5), 256. <https://doi.org/10.3390/fermentation10050256>
- Demissie, A., & Lele, S. (2010). Bioassay-assisted identification of phorbol ester from *Jatropha curcas* tissue culture. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 1(3), 1-7. <http://www.ijpbs.net/issue-3/6.pdf>
- Devappa, R. K., Angulo-Escalante, M. A., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2012a). Potential of using phorbol esters as an insecticide against *Spodoptera frugiperda*. *Industrial Crops and Products*, 38, 50-53. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.01.007>
- Devappa, R. K., Sanjay, K. R., Kumar, V., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2012b). Activities of *Jatropha curcas* phorbol esters in various bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78, 57-62. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.11.002>
- Dwivedi, J., Gupta, A., & Paliwal, S. (2020). Validated simultaneous HPTLC analysis of scopoletin and gallic acid in the methanolic fraction of *Jatropha glandulifera*. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 33, 457-462. <https://doi.org/10.1007/s00764-020-00063-8>
- Duque, L. F. C., & López, F. C. (2022). Propiedades químicas del aceite de cinco genotipos de *Jatropha curcas* L. en Colombia. *Agronomía Mesoamericana*, 33(1), 19. <http://doi.org/10.15517/am.v33i1.44555>
- Edrisi, S., Dubey, R., Tripathi, V., Bakshi, M., Srivastava, P., Jamil, S., Singh, H., & Abhilash, P. (2015). *Jatropha curcas* L.: A crucified plant waiting for resurgence. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 855-862. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.08.082>
- Faria-Machado, A. F., Licurgo, F. M., Pires, J. M., da Silveira-Campos, R., Wilhelm, A. E., de Lourdes, M., & Antoniassi, R. (2019). Method validation for analysis of phorbol esters from *Jatropha curcas*. *Industrial Crops and Products*, 140, 111627. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111627>
- Francis, G., Makkar, H. P., Carle, R., Mittelbach, M., Wink, M., Martinez Herrera, J., & Becker, K. (2021). Critique on conclusions regarding toxic compounds in *Jatropha curcas* kernel cake. *Communications Biology*, 4(1), 1348. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0919-z>
- Fujiki, H., Suttajit, M., Rawangkan, A., Iida, K., Limtrakul, P., Umsumang, S., & Suganuma, M. (2017). Phorbol esters in seed oil of *Jatropha curcas* L. and their association with cancer prevention. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 143(8), 1359-1369. <https://doi.org/10.1007/s00432-017-2341-6>
- Govaerts, R., Frodin, D., Radcliffe-Smith, A., & Carter, S. (2012). World checklist and bibliography of *Euphorbiaceae* (with *Pandaceae*) (Vol. 4). Royal Botanic Gardens.
- Halim, A. H. A., Zamberi, M. M., Husin, M. H. M., Haminudin, N. F., Idris, F., & Ghani, S. A. (2022). Physicochemical properties of *Jatropha curcas* oil as a potential feedstock for biodiesel production. *Proceedings of Mechanical Engineering Research Day*, 283-284.
- International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. (2005). ICH Q2(R1): Validation of analytical procedures: Text and methodology. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf
- Jaspal, N., Sharma, M., Prashar, D. B., Sharma, R., & Sharma, M. (2023). *Jatropha curcas* L.: A sustainable resource for biofuel feedstock with medicinal and commercial attributes. *Journal of Innovative Agriculture*, 10(3), 1-13. <http://doi.org/10.37446/jinagri/ra/10.3.2023.1-13>
- Jonas, M., Ketlogetswe, C., & Gandure, J. (2022). Quantification of phorbol-12-myristate-13-acetate in *Jatropha* seed oil and cake at different stages of fruit maturity. *International Journal of Environmental Studies*, 79(1), 88-97. <https://doi.org/10.1080/00207233.2021.1903672>
- Kongmany, S., Truong, H., Le, H., Imamura, K., Maeda, Y., & Van Boi, L. (2016). Semi-preparative HPLC separation followed by HPLC/UV and tandem mass spectrometric analysis of phorbol esters in *Jatropha* seed. *Journal of Chromatography B*, 1038, 1-27. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.10.021>
- Leyva-Acuña, M. A., Márquez-Zequera, I., García-Estrada, R. S., Soto-Landeros, F., Montes-Avila, J., & Angulo-Escalante, M. A. (2023). High performance thin layer chromatography fingerprint profile and antifungal activity of methanolic extracts of *Jatropha*

- platyphylla*. International Journal of Agriculture and Biology, 29, 164. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.2015>
- Leyva-Padrón, G., Vanegas-Espinoza, P. E., Evangelista-Lozano, S., Del Villar-Martínez, A. A., & Bazaldúa, C. (2020). Chemical analysis of callus extracts from toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas*. PeerJ, 8, e10172. <https://doi.org/10.7717/peerj.10172>
- Li, C. Y., Devappa, R. K., Liu, J. X., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2010). Toxicity of *Jatropha curcas* phorbol esters in mice. Food and Chemical Toxicology, 48, 620–625. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.11.042>
- Liu, S., Sporer, M., Wink, J., Jourdane, R., & Ruppel, A. (1997). Anthraquinones in *Rheum palmatum* and phorbol esters in *Jatropha curcas* with molluscicidal activity. Tropical Medicine & International Health, 2(2), 179–188. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1997.d01-240.x>
- Makkar, H. P. S., Aderibigbe, A. O., & Becker, K. (1998). Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas*. Food Chemistry, 62(2), 207–215. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00183-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00183-0)
- Makkar, H. P. S., & Becker, K. (1997). Potential of *Jatropha curcas* seed meal as a protein supplement to livestock feed, constraints to its utilization and possible strategies to overcome constraints. Biofuels and Industrial Products from *Jatropha curcas*, 23–27.
- Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2009). *Jatropha curcas*, a promising crop for biodiesel. European Journal of Lipid Science and Technology, 111(8), 773–787. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800244>
- Makkar, H. P. S., Kumar, V., Oyeleye, O., Akinleye, A., Angulo-Escalante, M. A., & Becker, K. (2011). *Jatropha platyphylla*, a new non-toxic *Jatropha* species. Food Chemistry, 125(1), 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.037>
- Neu, P., Schober, S., & Mittelbach, M. (2018). Quantification of phorbol esters in *Jatropha curcas* by HPLC-UV and HPLC-ToF-MS. European Journal of Lipid Science and Technology, 120(4). <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700293>
- Nishshanka, U. H., Jayasuriya, C., Chattopadhyaya, P. J., Kijak, P. S., Chu, R., Reimschuessel, R., Tkachenko, A., Ceric, O., & De Alwis, H. G. (2016). Screening for toxic phorbol esters in jerky pet treat products using LC-MS. Journal of Chromatography B, 1020, 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.03.018>
- Ollolqui, E. J., Castañeda-Ovando, A., Evangelista-Lozano, S., Alanís-García, E., Ramírez-Moreno, E., Valadez-Vega, C., & Añorve-Morga, J. (2022). Measurement of nutrients and minor components of a non-toxic variety of *Jatropha curcas*. Journal of Food Measurement and Characterization, 16(2), 1029–1037. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01229-6>
- Oskoueian, E., Abdullah, W. Z., Saad, A., Omar, S., Ahmed, W. B., Kuan, N. A., Zolkifli, R., Hendra, R., & Ho, Y. W. (2011). Bioactive compounds and biological activities of *Jatropha curcas* kernel meal extract. International Journal of Molecular Sciences, 12(9), 5955–5970. <https://doi.org/10.3390/ijms12095955>
- Patel, R. B., Patel, M. R., Bhatt, K. K., & Patel, B. G. (2010). HPTLC method development and validation. Analytical Methods, 2(5), 525–531. <https://doi.org/10.1039/B9AY00259D>
- Pelletier, G., Padhi, B. K., Hawari, J., Sunahara, G. I., & Poon, R. (2015). Development of a sensitive in vitro assay to quantify the biological activity of pro-inflammatory phorbol esters in *Jatropha* oil. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal, 51(6), 644–650. <https://doi.org/10.1007/s11626-014-9851-x>
- Ramadan-Hassanien, M. F. (2023). Bioactive phytochemicals from *Jatropha* oil processing by-products. In Bioactive phytochemicals from vegetable oil and oilseed processing by-products (pp. 485–503). Springer.
- Roach, J. S., Devappa, R. K., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2012). Isolation, stability, and bioactivity of *Jatropha curcas* phorbol esters. Fitoterapia, 83(3), 586–592. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.01.006>
- Roque, J., Dias, L., & Teófilo, R. (2017). Multivariate calibration to determine phorbol esters in seeds of *Jatropha curcas* using NIR and UV spectroscopies. Journal of the Brazilian Chemical Society, 28(8), 1506–1516. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20160333>
- Salazar-Villa, E., Alcaraz-Meléndez, L., León-Félix, J., Heredia, J. B., Soto-Landeros, F., & Angulo-Escalante, M. A. (2020). Morphological

- variability and oil content of *Jatropha platyphylla* germplasm. *Scientia Horticulturae*, 261, 108968. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108968>
- Shrivastava, A., & Gupta, V. B. (2011). Methods for determination of limit of detection and limit of quantitation. *Chronicles of Young Scientists*, 2(1), 21-25. <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>
- Sosa-Segura, M., Dave-Oomah, B., Drover, J., Heredia, J., Osuna-Enciso, T., Valdez-Torres, J., Salazar-Villa, E., Soto-Landeros, F., & Angulo-Escalante, M. (2014). Physical and chemical characterization of three non-toxic oilseeds from the *Jatropha* genus. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2(1), 56-61. <https://doi.org/10.12691/jfnr-2-1-10>
- Soto-León, S., López-Camacho, E., Milán-Carrillo, J., Sánchez-Castillo, M. A., Cuevas-Rodríguez, E., Picos-Corrales, L. A., & Contreras-Andrade, I. (2014). *Jatropha cinerea* seed oil as a potential feedstock for biodiesel. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13(3), 739-747.
- Vega-Ruiz, Y. C., Hayano-Kanashiro, C., Gámez-Meza, N., & Medina-Juárez, L. A. (2021). Determination of chemical constituents and antioxidant activities of leaves and stems from *Jatropha cinerea* and *Jatropha cordata*. *Plants*, 10(2), 212. <https://doi.org/10.3390/plants10020212>
- Vischi, M., Raranciuc, S., & Baldini, M. (2013). Evaluation of genetic diversity between toxic and nontoxic *Jatropha curcas* accessions using SSR markers. *African Journal of Biotechnology*, 12(3), 265-274. <https://doi.org/10.5897/AJB12.2155>
- Wakandigara, A., Nhamo, L. R. M., Kugara, J., & Mushonga, P. (2020). Mechanisms of phorbol ester toxicity, determined by molecular modelling. *International Research Journal of Pure & Applied Chemistry*, 21(18), 10-24. <https://doi.org/10.9734/irjpac/2020/v21i1830267>
- Yamunadevi, M., Wesely, E., & Johnson, M. (2011). Phytochemical studies on terpenoids of *Aerva lanata* using HPTLC. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(2), S220-S225. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60161-0](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60161-0)