



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

DOCTORADO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

CARACTERIZACIÓN DE ACEITE DE SEMILLA Y EFECTO
ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS DE RAÍZ DE *Jatropha dioica* Seseé
EN FITOPATÓGENOS DE JITOMATE (*Solanum lycopersicum*)

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Presenta:

JEFFERSON UVALDO PÉREZ PÉREZ

Bajo la supervisión de: JESÚS AXAYACATL CUEVAS SÁNCHEZ, DOCTOR



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
REGIÓN DE EXÁMENES PROFESIONALES



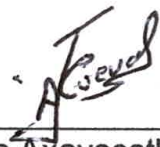
Chapingo, Estado de México, julio de 2019

**CARACTERIZACIÓN DE ACEITE DE SEMILLA Y EFECTO
ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS DE RAÍZ DE *Jatropha dioica* Seseé
EN FITOPATÓGENOS DE JITOMATE (*Solanum lycopersicum*)**

Tesis realizada por Jefferson Uvaldo Pérez Pérez bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

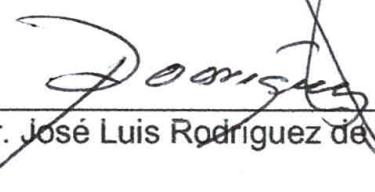
DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR:



Dr. Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez

ASESOR:



Dr. José Luis Rodríguez de la O

ASESOR:



Dr. Benito Reyes Trejo

ASESOR:



PhD. Jaime Sahagún Castellanos

LECTOR EXTERNO:



Dra. Diana Guerra Ramírez

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	vii
AGRADECIMIENTOS	viii
DATOS BIOGRÁFICOS	ix
RESUMEN GENERAL	1
GENERAL ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
1.1. OBJETIVOS	5
General	5
Específicos	5
1.2. HIPÓTESIS.....	5
2. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1 México como un país Megadiverso	6
2.2 El género <i>Jatropha</i>	6
2.2.1 Biología del género <i>Jatropha</i>	6
2.2.2 Reproducción y polinización del género <i>Jatropha</i>	7
2.2.3 Botánica de <i>Jatropha dioica</i> Seseé.....	7
2.2.4 Taxonomía de <i>Jatropha dioica</i> Seseé	10
2.3 Los Biocombustibles	10
2.3.1 El sistema energético en México	10
2.3.2 Biocombustibles	11
2.3.3 Consideraciones normativas internacionales para biodiésel	11
2.3.4 Métodos para la producción de biodiésel.....	13
2.4 Fitopatógenos bacterianos del cultivo de Jitomate	14
2.4.1 Importancia económica del jitomate en México	14
2.4.2 Métodos de control de fitopatógenos	14
2.4.2.1 <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	15
2.4.2.2 <i>Pseudomonas syringe</i> pv <i>tomato</i>	17
2.4.2.3 <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>vesicatoria</i>	18
2.5 Métodos <i>in vitro</i> para la evaluación antimicrobiana	19
2.5.1 Método de difusión de agar en disco	20
2.5.2 Método de gradiente antimicrobiano	21
2.5.3 Método de dilución	21
2.5.3.1 Macro y Micro diluciones	22
3. CAPÍTULO I.....	23

ACEITE DE SEMILLA DE <i>Jatropha dioica</i> Seseé COMO FUENTE POTENCIAL DE BIODIÉSEL.....	23
3.1 RESUMEN.....	24
3.2 ABSTRACT	25
3.3 INTRODUCCIÓN.....	26
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.4.1 Material Vegetal	28
3.4.2 Caracterización morfológica de las semillas de <i>Jatropha dioica</i> Seseé	28
3.4.3 Obtención y caracterización del aceite de <i>Jatropha dioica</i> Seseé	28
3.4.4 Preparación y caracterización de Biodiésel y mezclas de biodiésel-diésel	29
3.4.5 Análisis estadístico	30
3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
3.5.1 Caracterización morfológica de semilla de <i>Jatropha dioica</i> Seseé	30
3.5.2 Contenido y caracterización de aceite y biodiésel de semilla de <i>Jatropha dioica</i> Seseé	31
3.5.3 Perfil de ácidos grasos de <i>Jatropha dioica</i> Seseé	34
3.6 CONCLUSIONES.....	35
3.7 AGRADECIMIENTOS	35
3.8 REFERENCIAS	36
4. CAPÍTULO II.....	40
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA <i>in vitro</i> DE RAÍCES DE <i>Jatropha dioica</i> Seseé	40
4.1 RESUMEN.....	41
4.2 ABSTRACT	42
4.3 INTRODUCCIÓN.....	43
4.4 MATERIALES Y MÉTODOS	44
3.4.1 Cepas bacterianas	44
4.4.2 Material Vegetal	44
4.4.3 Medios de cultivo para incubación microbiana	44
4.4.4 Preparación de extractos y particiones de raíces de <i>Jatropha dioica</i> Seseé	44
4.4.5 Evaluación antimicrobiana por método de microplaca.....	45
4.4.6 Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	46
4.4.7 Análisis estadístico	46
4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
4.6 CONCLUSIONES.....	50
4.7 AGRADECIMIENTOS	50

4.8 REFERENCIAS	51
5. DISCUSIÓN GENERAL	53
6. CONCLUSIONES GENERALES.....	54
7. CITAS BIBLIOGRÁFICAS	55
8. ANEXOS.....	64
8.1 Salida data Minitab	64
8.1.1 Para <i>Clavibacter michiganensis</i> subesp. <i>michiganensis</i>	64
8.1.2 Para <i>Pseudomonas syringe</i> pv <i>tomato</i>	65
8.1.3 Para <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>vesicatoria</i>	66
8.2 Espectro Infrarrojo del compuesto citlalitriona.....	68
8.3 Espectro RMN ¹ H	69
8.4 Espectro RMN ¹³ C	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Morfología de polen de <i>Jatropha dioica</i> Seseé de un grano de polen completo (x65).	7
Figura 2 Planta completa de <i>Jatropha dioica</i> Seseé fotografía tomada por Jefferson Uvaldo Pérez Pérez	8
Figura 3. Planta con fruto de <i>Jatropha dioica</i> Seseé	8
Figura 4 Floración de <i>Jatropha dioica</i> Seseé	9
Figura 5 Colecta y prensado de ejemplar para herbario de <i>Jatropha dioica</i> Seseé.....	9
Figura 6 Planta de jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) infectada con <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp <i>michiganensis</i>	16
Figura 7 Planta de jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) infectada con <i>Pseudomonas syringe</i> pv <i>tomato</i>	18
Figura 8 Planta de jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) infectada con <i>Xanthomomas campestris</i> pv <i>vesicatoria</i>	19

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1 Especificaciones para el uso de biodiésel	12
Cuadro 2 Características físicas de semillas de <i>Jatropha dioica</i> Seseé	30
Cuadro 3 Propiedades físicas de aceite de semilla de <i>Jatropha dioica</i> Seseé	31
Cuadro 4 Propiedades de biodiésel de <i>Jatropha dioica</i> Seseé y mezcla de biodiésel-diésel comparado con estándares de biodiésel.	33
Cuadro 5 Composición de ácidos grasos (%) de <i>Jatropha dioica</i> Seseé y otras fuentes naturales.	34
Cuadro 6 Prueba de medias de absorbancia de extractos de raíz de <i>Jatropha dioica</i> Seseé	47
Cuadro 7 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de la actividad antimicrobiana de extractos vegetales de <i>Jatropha dioica</i> Seseé contra bacterias fitopatógenas expresado en $\mu\text{g mL}^{-1}$	48
Cuadro 8 Concentración mínima inhibitoria de la actividad antimicrobiana de fracciones hexánicas de <i>Jatropha dioica</i> Seseé contra bacterias fitopatógenas expresado en $\mu\text{g mL}^{-1}$	49

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 Reacción de transesterificación de un triglicérido	13
Esquema 2 Estructura molecular de citlalitriona	49

DEDICATORIA

Dedicada a mi esposa María del Carmen González Rangel, a mi amiga, compañera y madre, Ma. Guadalupe Sánchez Ayssa, por su apoyo, amor y compañía durante la realización de mis estudios

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo por haber permitido llevar mis estudios de posgrado y la realización de esta investigación. Al posgrado en Horticultura por haberme aceptado como alumno y facilitado las herramientas necesarias para cumplir los objetivos.

Agradecimientos a los sinodales, Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez, José Luis Rodríguez de la O, Benito Reyes Trejo y Jaime Sahagún Castellanos, por su impecable dirección en el desarrollo de esta investigación, pero sobre todo por haberme compartido sus conocimientos científicos. Especiales agradecimientos a la Doctora Diana Guerra Ramírez y Doctora Priscila Guerra Ramírez por su incondicional apoyo y acompañamiento en toda la investigación.

A la C. María del Refugio González Rangel y la Señora Ma. de la Paz Rangel, por su acompañamiento y participación durante la colecta de material vegetal.

A CONACYT por la beca otorgada para llevar a cabo mis estudios de doctorado.

A mis compañeros del Laboratorio de Cultivo *in vitro*, M.C. Gabriel Ramírez y todos mis compañeros del laboratorio de Productos Naturales.

A mi familia, mi madre Ma. Guadalupe y mi esposa Ma. del Carmen, por su compañía y amor.

DATOS BIOGRÁFICOS

Nombre: Jefferson Uvaldo Pérez Pérez
Fecha de nacimiento: 8 de febrero de 1988
Lugar de nacimiento: México, Distrito Federal
No. Cartilla militar: 9050942
CURP: PEPJ880208HDFRRF09
Profesión: Maestro en Ciencias en Biotecnología Agrícola
Cédula profesional: 10972108

Desarrollo académico



2003-2006	Especialidad de Diseño Arquitectónico Universidad Bancaria México Teoloyúcan, México
2008-2012	Ingeniero en Biotecnología Departamento de Biotecnología Universidad Tecnológica de Tecámac
2013-2014	Maestro en Ciencias en Biotecnología Agrícola Posgrado en Biotecnología Agrícola Instituto de Horticultura Departamento de Fitotecnia Universidad Autónoma Chapingo

RESUMEN GENERAL

CARACTERIZACIÓN DE ACEITE DE SEMILLA Y EFECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS DE RAÍZ DE *Jatropha dioica* Seseé EN FITOPATÓGENOS DE JITOMATE (*Solanum lycopersicum*)

Se colectaron semillas y raíces de *Jatropha dioica* Seseé (Euphorbiaceae) en San José Iturbide, Guanajuato, México, para determinar las características físicas del aceite de semillas y su composición de ácidos grasos, además, a partir de sus raíces se prepararon extractos de hexano, metanol y acetato de etilo, mismos que fueron evaluados en su efecto en tres bacterias fitopatógenas; *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), *Pseudomonas syringe* pv. *tomato* (Pst) y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xv). El extracto hexánico tuvo mayor actividad antimicrobiana para Pst ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) y Xv ($1.7 \mu\text{g mL}^{-1}$), respectivamente y el extracto de acetato de etilo con actividad para Cmm ($2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$). El extracto hexánico se analizó por cromatografía en columna aislando la citlalitriona cuya actividad antimicrobiana fue de 1.0, 1.0 y $1.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ sobre Cmm, Pst y Xv, respectivamente. El aceite de semilla se obtuvo mediante extracción Soxhlet y maceración con un rendimiento de 55.8 y 43.5%, respectivamente y el biodiesel a través de una reacción de transesterificación con metanol en medio alcalino. Al aceite obtenido se evaluó la viscosidad ($16.915 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$), índice de acidez y saponificación (0.63 ± 0.03 y $44.48 \pm 1.27 \text{ mg KOH g}^{-1}$), respectivamente, y calor de combustión de aceite y biodiesel (37.27 y 38.09 MJ kg⁻¹). Se determinaron los principales ácidos grasos del aceite (ácido linoleico 57.8% y oleico 23.86%) por cromatografía de gases. El aceite de semillas de *Jatropha dioica* Seseé es una alternativa para la generación de biocombustibles, además, el extracto de raíz podría ser útil en programas de biocontrol en fitopatógenos de jitomate (*Solanum lycopersicum*).

Palabras clave: biocombustible, ésteres metílicos de ácidos grasos, citlalitriona, *Solanum lycopersicum*, Sangre Grado.

Tesis de Doctorado en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: M. en C. Jefferson Uvaldo Pérez Pérez

Director de Tesis: Doctor, Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez

GENERAL ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF SEED OIL AND ANTIMICROBIAL EFFECT OF ROOT EXTRACTS OF *Jatropha dioica* Seseé IN TOMATO PHYTOPATHOGENS (*Solanum lycopersicum*)

Seeds and roots of *Jatropha dioica* Seseé (Euphorbiaceae) were collected in San José Iturbide, Guanajuato, Mexico, to determine the physic characteristics of the oils of the seeds and fatty acids composition, besides, extracts of hexane, methanol and ethyl acetate were prepared from its roots, which were evaluated in their effect on three phytopathogenic bacteria; *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), *Pseudomonas syringe* pv. *tomato* (Pst) and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xv). The hexane extract had higher antimicrobial activity for Pst ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) and Xv ($1.7 \mu\text{g mL}^{-1}$), respectively and the ethyl acetate extract with activity for Cmm ($2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$). The hexane extract was analyzed by column chromatography isolating the citlalitrione whose antimicrobial activity was 1.0, 1.0 and $1.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ over Cmm, Pst and Xv, respectively. The seed oil was obtained by Soxhlet extraction and maceration with a yield of 55.8 and 43.5%, respectively, and biodiesel through a transesterification reaction with methanol in an alkaline medium. The oil obtained was evaluated viscosity ($16,915 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$), acid value and saponification (0.63 ± 0.03 and $44.48 \pm 1.27 \text{ mg KOH g}^{-1}$), respectively, combustion heat of the oil and biodiesel (37.27 and 38.09 MJ kg^{-1}). The main fatty acids of the oil (57.8% linoleic acid and 23.86% oleic acid) were determined by gas chromatography. *Jatropha dioica* seed oil is an alternative for the generation of biofuels, in addition, the root extract can be useful in biocontrol programs in tomato phytopathogens (*Solanum lycopersicum*).

Key words: biofuel, methyl esters of fatty acids, citlalitrione, *Solanum lycopersicum*, Sangre Grado.

Tesis de Doctorado en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: M. en C. Jefferson Uvaldo Pérez Pérez

Director de Tesis: Doctor, Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

México posee una gran biodiversidad, comprendida por ecosistemas terrestres y acuáticos, especies animales y vegetales. La gran biodiversidad en México se debe a las condiciones geográficas características que derivan a la existencia de distintos climas y microclimas en un mismo territorio. Actualmente existe un interés por explorar el uso potencial de las especies vegetales endémicas de México, en particular, para la obtención de biocombustibles y de metabolitos secundarios útiles para el control de microorganismos fitopatógenos en la agricultura. Hoy en día, la reducción del consumo de combustibles fósiles y la urgente necesidad de disminuir las emisiones de CO₂ en el medio ecológico son una alerta para todos los países, conduciendo a nuevas investigaciones en la búsqueda de fuentes de energía como biocombustibles. Pinzi y colaboradores (2009) confirman que en años recientes la investigación científica para la exploración de bioenergías se relaciona con plantas oleaginosas para producir ésteres metílicos de ácidos grasos (biodiesel) ya que éste es menos contaminante y biodegradable comparado con el diésel fósil.

El estudio y uso de extractos y productos naturales para el control de plagas y enfermedades en el sector agrícola son ahora una línea de investigación ampliamente estudiada. La mayoría de los biocompuestos se encuentran de forma natural en las plantas como mecanismos de defensa o para caracterizar una especie por su olor o sabor. Estudios recientes demuestran que el uso de biocompuestos es una alternativa de bajo costo para el control de microorganismos fitopatógenos, que afectan la productividad y calidad de los alimentos (López *et al.*, 2005)

Jatropha dioica Seseé es una especie vegetal de la familia Euphorbiaceae, misma que comprende 199 especies actualmente aceptadas (The Plant List, 2019), de las cuales, 48 son endémicas de México (Steinmann, 2003). En la medicina tradicional, el género *Jatropha* se ha utilizado ampliamente para curar heridas y calmar el malestar estomacal (Manzanero-Medina *et al.*,

2009). Así mismo se ha demostrado sus propiedades antivirales y antimicrobianas contra patógenos que afectan a los humanos (Silva-Mares *et al.*, 2013, Silva-Belmares *et al.*, 2014), su capacidad antioxidante y quimioprotectante (Martínez *et al.*, 2014), así como también el estudio de su estructura química (Domínguez *et al.*, 1980, Villareal *et al.*, 1988) y principales grupos funcionales involucrados (Montenegro *et al.*, 2009, Belmares *et al.*, 2009, Castillo *et al.*, 2010) en su capacidad curativa.

La zona árida del noreste del país cuenta con más de 3,500 especies de plantas medicinales identificadas y clasificadas (Aguilar *et al.*, 2008). Sin embargo, existe escasa información sobre la extracción e identificación de compuestos fitoquímicos de estas plantas. Dada esta información y tomando en cuenta la importancia actual que ha adquirido el género *Jatropha* en México, los objetivos de este trabajo fueron: evaluar las propiedades fisicoquímicas del aceite obtenido de las semillas de *Jatropha dioica* Seseé para determinar su uso potencial como biodiesel y probar el efecto antimicrobiano de extractos de diferente polaridad, obtenidos de la raíz de dicha especie sobre algunos fitopatógenos que afectan el jitomate (*Solanum lycopersicum*).

1.1. OBJETIVOS

General

1. Explorar el uso potencial de las semillas y raíces de *Jatropha dioica* Seseé con base en estudios etnobotánicos y fitoquímicos para su aprovechamiento como recurso fitogenético.

Específicos

- Determinar las propiedades fisicoquímicas y el perfil de ácidos grasos del aceite aislado de semilla de *J. dioica* para explorar su potencial como fuente de biodiésel.
- Evaluar las propiedades antimicrobianas de extractos de diferentes polaridades obtenidos de raíces de *J. dioica*, mediante el método de microdilución en placa para lograr una protección contra fitopatógenos en el cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum*).

1.2. HIPÓTESIS

El aceite extraído de semillas de este recurso fitogenético es potencialmente útil en la producción de biocombustible.

Los extractos vegetales de *Jatropha dioica* Seseé de diferente polaridad son útiles para el tratamiento antimicrobiano contra algunos agentes fitopatógenos de jitomate.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 México como un país Megadiverso

Nuestro país forma parte de los territorios del planeta con una mayor cantidad y diversidad de especies vegetales y animales. Cuenta con alrededor de 200 mil especies, albergando el 10 a 12% de la riqueza biológica global de cada *taxón* (SRE, 2013). La interacción de cinco placas tectónicas: norteamericana, del Pacífico, Rivera, de Cocos y del Caribe, originan en el territorio mexicano cordilleras por plegamiento (Sierra Madre Oriental, Sierra Madre del Sur) o por vulcanismo (Sierra Madre Occidental, Faja Volcánica Transmexicana) (Espinosa-Organista y Ocegueda-Cruz, 2008) ofreciendo así, distintas regiones con diversas características ecológicas. En México existen: 297 familias, 73 órdenes, 2 854 géneros (7.8% (219) son endémicos), 23 314 especies, 22 126 angiospermas, 1 039 helechos y plantas afines y 149 gimnospermas (Villaseñor, 2016); sin considerar especies no vasculares. Sin embargo, de las 23 314 especies contenidas en el territorio mexicano, se estima que, en promedio, sólo 125 son utilizadas con mayor frecuencia (Cuevas, comunicación personal).

2.2 El género *Jatropha*

2.2.1 Biología del género *Jatropha*

El género *Jatropha* pertenece a la familia Euphorbiaceae, comprende actualmente 199 especies (The Plant List, 2019) localizadas principalmente en México y Centroamérica. Jiménez-Ramírez y Martínez (1994) mencionan que el 77% del total de las especies son endémicas de México, comparado con regiones de India y África, donde su distribución es limitada a ciertas regiones.

La sexta familia más diversa entre las angiospermas es la familia Euphorbiaceae, después de Orchidaceae, Compositae, Leguminosae, Gramineae y Rubiaceae. Porras *et al.*, (2008) mencionan que esta familia es de gran importancia ya que muchas especies son cultivadas para su aprovechamiento en la medicina tradicional, industrial, alimenticio y ornamental. Muchas de las especies del género *Jatropha* son arbustos o árboles que tienen como característica principal un exudado (látex) incoloro o blanquecino, que

aparece al hacer un daño en sus tallos. Sus hojas normalmente alternas con frutos capsulares que contiene de 1 a 3 semillas ovoides o subglobulares. Son plantas dicotiledoneas y la mayoría de las flores de este género son perfectas, es decir, con ambos sexos siendo las plantas monoicas frecuentemente pequeñas.

2.2.2 Reproducción y polinización del género *Jatropha*

Watson y Dallwitz (1991) mencionan que en la mayoría de las especies de *Jatropha*; las flores son perfectas, además, debido a que éstas muestran una estructura similar, se sugiere un ancestro común de *Euphorbia* silvestre. La reproducción de flores femeninas y masculinas en la misma planta (monoicismo) es un sistema relativamente común entre las angiospermas y principalmente en los miembros de la familia Euphorbiceae (Solomon-Raju y Ezradanam, 2002). El polen de *J. dioica* es más o menos esferoidal, con formas claviformes, alineado en forma reticulada en un patrón crotonoide laxo con pilas de redondas a triangulares lisas (Figura 1).

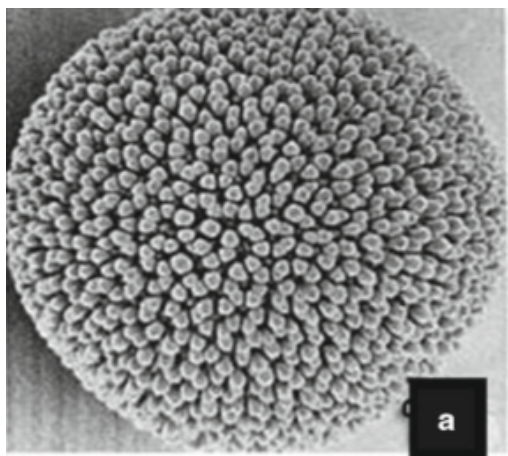


Figura 1 Morfología de polen de *Jatropha dioica* Seseé de un grano de polen completo (x65).

2.2.3 Botánica de *Jatropha dioica* Seseé

Jatropha dioica Seseé es un arbusto con tallos carnosos y flexibles de color café rojizo, puede alcanzar hasta los 1.5 m de altura (Figura 2). Su fruto (drupa) es globoso y contiene sólo una semilla que presenta un pericarpio firme y compacto (Figura 3), sus hojas miden de 2 a 4 cm de longitud con punta redondeada y se presentan agrupadas en los nudos

con flores pequeñas de color rosa pálido (Figura 4) y su savia es incolora, pero al contacto con el aire vira a color rojizo. En la Figura 5 se observa el ejemplar completo para su posterior prensado y almacenamiento.



Figura 2 Planta completa de *Jatropha dioica* Seseé fotografía tomada por Jefferson Uvaldo Pérez Pérez



Figura 3. Planta con fruto de *Jatropha dioica* Seseé fotografía tomada por Jefferson Uvaldo Pérez Pérez



Figura 4 Floración de *Jatropha dioica* Seseé
fotografía tomada por Jefferson Uvaldo Pérez Pérez



Figura 5 Colecta y prensado de ejemplar para herbario
de *Jatropha dioica* Seseé
fotografía tomada por Jefferson Uvaldo Pérez Pérez

2.2.4 Taxonomía de *Jatropha dioica* Seseé

Familia: Euphorbiceae

Subfamilia: *Crotonoideae*

Tribus: *Jatropheae*

Género: *Jatropha*

Especie: *Jatropha dioica*

2.3 Los Biocombustibles

2.3.1 El sistema energético en México

Para el año 2006, México ocupaba el sexto lugar en la producción de petróleo crudo, mientras que en América Latina ocuparía la segunda posición. Según la Secretaría de Energía (SENER) (2008), en el año 2007 México produciría 3 081.7 millones de barriles (mdb), lo que representaría un 5.3% menos con relación al año 2006. Cuatro años más tarde el país bajaría de posición hasta el octavo lugar, manteniéndose así hasta el año 2011, con una producción de 2 958 mdb (SENER, 2013). Los precios del barril de petróleo son establecidos respecto a las referencias nacionales del Artículo 31 de la Ley Federal de Presupuesto y Responsabilidad Hacendaria, dependiendo del aumento o disminución del valor del dólar y estrategias internas nacionales petroleras en el mundo. Del año 2014 a 2016, el valor de cada barril llegó a un promedio de 43.286 dólares, comparado con 100.92 dólares en el año 2011 (SENER, 2013). Esta oscilación de precios es de gran interés debido a que México conserva una gran dependencia de combustibles fósiles y la demanda de éstos es cada vez mayor en la industria del transporte principalmente. El Departamento de Energía de los Estados Unidos menciona que el consumo mundial de energía aumentará un 35% en 2030 comparado con el año 2005 (Ye *et al.*, 2013; Ganesh-Ram *et al.*, 2008), la SENER (2013) menciona también que a nivel mundial en el año 2006, el 48% de energía producida estaba destinada al transporte, sin embargo, estiman que para el año 2035 este porcentaje supere el 50%. En 2011, México obtuvo energía mediante diversas fuentes, el petróleo ocupó el primer lugar, con un 64.1%, seguido de

gas natural con un 22.9% y la obtenida de fuentes renovables ocupó un 6.9%. Es por ello que la industria energética se está enfocando en las especies de oleaginosas como la mejor opción de materias primas para la producción de nuevas fuentes de energía renovables y amigables con el medio ecológico.

2.3.2 Biocombustibles

El uso de energía en cualquiera de sus fuentes es uno de los requisitos actualmente más indispensables para la supervivencia humana, siendo un factor importante para el desarrollo social y económico. Actualmente la necesidad de buscar nuevas fuentes de energía es muy importante, especialmente la búsqueda de alternativas en materia de biomasa que sean capaces de satisfacer energía sin afectar socioeconómicamente la producción de otros cultivos de consumo básico como el maíz, trigo, cebada. La producción de nuevas fuentes de energía como el biodiésel son hoy en día una opción en el mundo, incluso algunos países han adoptado vías legislativas y reglamentarias para fomentar el uso de biodiésel (Berchmans e Hirata, 2008). Algunas de las principales ventajas en el uso de biodiésel son: 1. La disminución en emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) y azufre, comparado con el diésel comercial, 2. Biodegradable y no tóxico, 3. Proporciona una mayor lubricación en motores de combustión interna (Marchetti y Errazu, 2008).

A partir de la extracción del aceite de semillas de *Jatropha dioica* Seseé y su transesterificación a biodiésel, la pasta residual del proceso puede ser utilizada como alimento para ganado. Algunas especies como *Jatropha curcas* contiene entre 58 y 60% de proteína cruda y aminoácidos libres. Heller (1996) menciona que la pasta puede ser utilizada como abono verde (fertilizante) por ser un producto muy rico en proteínas, además, de que el valor calórico (16 MJ kg^{-1}) es casi igual al de los pellets de madera (18 MJ kg^{-1}) por lo que la industrialización de cáscara de semillas es una opción para la producción de energía en comunidades rurales (Díaz, 2011).

2.3.3 Consideraciones normativas internacionales para biodiésel

El buen funcionamiento de un biocombustible dentro de un motor va de la mano directamente con la vida útil del mismo. Para ello, algunas normas se han establecido y

con ello garantizar el cumplimiento de las características específicas para el uso de biodiésel como combustible.

Actualmente existen dos normas ampliamente reconocidas para el empleo de biodiesel como combustible.

- Norma ASTM D6751 establecida por la American Society for Testing and Materials (USA)
- Norma EN 14214 establecida por la European Standards (Unión Europea)

Estas normas especifican los requisitos y métodos de ensayo que el biodiésel necesita cumplir para su empleo en motores de combustión interna en aras de evitar daños internos. Las principales especificaciones se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1 Especificaciones para el uso de biodiésel

Propiedad	Para mezclas de biodiésel (B100)			
	EE. UU. (ASTM D6751)		Europa (EN 14214)	
	Límite	Método	Límite	Método
Agua y sedimentos (Vol. %, máx)	0.05	D2709	0.05	EN 12937
Viscosidad cinemática a 40°C (mm ² s ⁻¹)	1.9-6.0	D445	3.5-5.0	ES 3104/3105
Punto de inflamación, cerrado (°C m ⁻¹)	93	D93	101	EN 3679
No. cetano (min)	47	D613	51	EN 5165
Cenizas totales (% en peso como máx)	15	D5453	10	EN 20846
Índice de acidez (mg KOH g ⁻¹ , máx)	0.5	D664	0.5	EN 14104
Glicerina libre (% en peso como máx)	0.02	D6585	0.02	EN 14105/14106
Glicerina total (% en peso máx)	0.24	D6584	0.25	EN 14105
Monoglicérido (% en peso máx)			0.8	EN 14105
Diglicérido (% en peso máx)			0.2	EN 14105
Triglicéridos (% en peso máx)			0.2	EN 14105
Estabilidad a la oxidación (h a 110°C, min)	3	EN 14112	6	EN 14112
Éster metílico de ácido linolénico (% en peso, como máx)			12	EN 124103
Ésteres metílicos de ácidos poliinsaturados (% en peso, como máx)			1	EN 15799
índice de Yodo (g I ₂ 100 g ⁻¹ , máx)			120	EN 14111
Densidad (kg m ⁻³)			860-900	EN 3675

Tomado de Hoekman *et al.*, (2012)

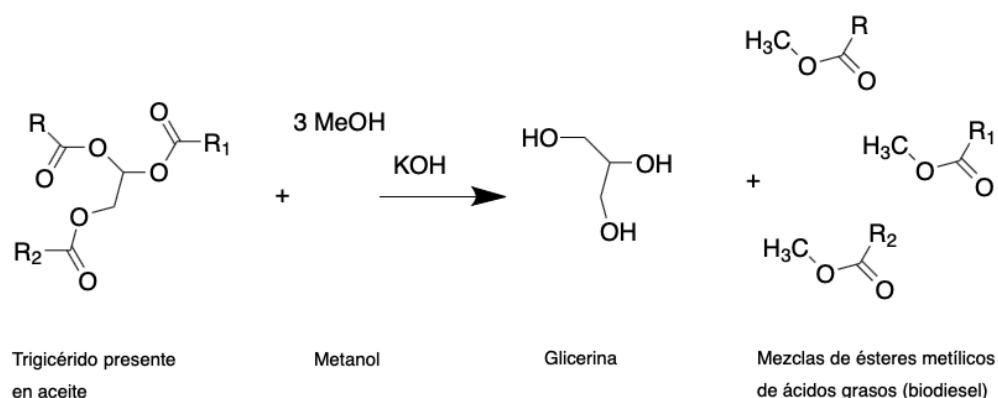
Actualmente, México no cuenta con normativas para la especificación del uso de biocombustibles, sin embargo, el 13 de noviembre de 2009 se publicaron en el Diario

Oficial de la Federación, los lineamientos para otorgar permisos de producción, almacenamiento y transporte para bioetanol y biodiésel.

2.3.4 Métodos para la producción de biodiésel

La transesterificación es uno de los métodos más amigables para la transformación de triglicéridos a ésteres metílicos de ácidos grasos. Algunas otras técnicas como la pirolisis en la que se obtienen productos de baja viscosidad, alto número de cetano y cantidades aceptables de azufre y sedimentos, sin embargo, durante el proceso se evidencia un alto contenido de residuos de carbono. La micro emulsión por otro lado, también se obtienen productos de baja viscosidad, pero el producto resultante tiene adherencia a la aguja del inyector y una combustión incompleta (Camps y Marcos, 2008).

La reacción de transesterificación se lleva a cabo entre un triglicérido proveniente de una aceite vegetal o animal y un alcohol de bajo peso molecular como metanol o etanol, para que, a partir de un triglicérido, producir un diglicérido, seguido de la conversión de un diglicérido a un monoglicérido y finalmente de monoglicérido a glicerol, proceso en el que simultáneamente se forman moléculas de ésteres metílicos provenientes de cada glicérido. En la reacción final se obtienen tres moléculas de éster metílico (biodiésel) y una molécula de glicerol. La reacción de transesterificación se muestra en el Esquema 1.



Esquema 1 Reacción de transesterificación de un triglicérido

2.4 Fitopatógenos bacterianos del cultivo de Jitomate

2.4.1 Importancia económica del jitomate en México

El cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum*) es una de las hortalizas con mayor consumo *per cápita* en el mundo y de las más frecuentes cultivadas en sistemas protegidos (mallas sombras, invernaderos). El cultivo tiene un alto desarrollo socioeconómico y tecnológico en el norte del país, principalmente en los estados de Baja California, Sonora y Sinaloa; ofreciendo ámbitos empresariales que son un claro ejemplo de la integración económica de México y Estados Unidos de América (Macías-Macías, 2003). La producción nacional de jitomate en México pasó de 2,277,791.43 toneladas en el año 2010 a 3,098, 329.41 toneladas en el año 2015 y 3,469,707.28 toneladas en 2015 (SIAP, 2019) con una derrama económica de 587,232,968.42 millones de pesos para el año 2017. En la agricultura protegida, el uso de variedades indeterminadas son las más comunes con densidades de población de 2 a 3 plantas.m², donde normalmente los tallos principales van más allá de los 8 m de longitud, cosechando cerca de 16 racimos por planta en un solo ciclo de cultivo de 10 meses (Sánchez-del Castillo, 2009), con un rendimiento promedio de 15 kg m².

2.4.2 Métodos de control de fitopatógenos

La fitopatología es a ciencia que se encarga del estudio de las enfermedades en las plantas. Esta disciplina estudia los principales organismos causales (factores bióticos) y las condiciones del ambiente (factores abióticos) propicias para el desarrollo de una enfermedad, los procesos que esta lleva y las interacciones huésped-patógeno y los métodos para diagnosticar y prevenir las enfermedades. Los principales agentes causales para que se presente un agente fitopatógeno son: patógeno, hospedero susceptible, condiciones ambientales para el desarrollo del fitopatógeno, tiempo necesario para que ocurra la infección y principalmente la presencia de vectores (en el caso de virus). Los tres parámetros que gobiernan el desarrollo de una enfermedad son: la cantidad de inóculo inicial, la tasa de infección y el tiempo. Es decir, que los métodos de control deben tener efecto directamente sobre estos parámetros. Los métodos de control se pueden clasificar como: culturales, biológicos, físicos y químicos. Los métodos culturales se refieren a las actividades o labores realizadas para evitar que el patógeno establezca relación con el hospedero o reducir la población en el cultivo. Tales prácticas incluyen rotación de cultivos, erradicación del hospedero, poda fitosanitaria, desinfección de herramientas, podas de

formación, control de riegos, solarización, entre otras. El control biológico comprende uso de organismos antagónicos y variedades resistentes mejoradas genéticamente. Entre los métodos físicos se encuentran la Pasteurización, acolchado, solarización, en caso de material de propagación se incluyen: termoterapia, refrigeración, tratamientos con radiaciones con el fin de tener material vegetal libre de patógenos. Los compuestos químicos inhiben la germinación, el crecimiento y la reproducción de los fitopatógenos, o pueden ser completamente letales a éstos. Pueden ser amplio espectro o sólo para algunos fitopatógenos en específico, atacan problemas en la parte aérea de la planta, en suelo y en el material propagativo, para desinfección y protección durante su almacenamiento y transporte.

El control de enfermedades causadas por bacterias es de particular importancia debido a su rápida propagación y la magnitud de las pérdidas por unidad de tiempo. El uso de sustancias químicas no es del todo eficiente pues pocos productos actúan como bactericidas y presentan problemas como efecto residual, aparición de bacterias resistentes, fitotoxicidad y elevado costo de control (Achicanoy-López, 2001).

2.4.2.1 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (Cmm) es una bacteria gram positiva que se distribuye en la mayoría de las zonas donde se cultiva jitomate, reportándose en el continente europeo, asiático y americano. De régimen aeróbico no esporulada que constituye una de las especies *Clavibacter*. Es el agente causal del cáncer bacteriano en jitomate, principalmente localizado desde semilla y es considerada una de las enfermedades bacterianas más destructivas de este cultivo. En México, y muchos otros países Cmm es un fitopatógeno de cuarentena que debe ser tratado con premisa ya que las semillas infectadas son el principal inóculo y su diseminación es rápida en la mayoría de los sistemas de producción. La sintomatología de Cmm es vascular y en parénquima con patologías distintivas sujetas del sistema de producción, ya sea en invernadero o a cielo abierto dependiendo de las variedades, labores culturales, nutrición y edad de la planta.

En el follaje de jitomate afectado por Cmm, aparecen síntomas en las hojas de la región del segundo o tercer racimo al que se está cosechando. Entre las hojas aparecen manchas

aguanosas de color verde opaco, luego se secan tomando un color pardo claro. En tallos, el peciolo, pedúnculo y cáliz, aparecen lesiones rugosas y a menudo color claro u oscuro y escamosas. En un corte longitudinal se aprecia una decoloración en el sistema vascular que varía de un amarillo a rojizo-café, mientras que en las partes inferiores de la plantas o raíces pueden presentarse aún sanas. Los síntomas se presentan entre los primeros 30 y 40 días después del trasplante, lo cual dificulta su control y a pesar de que la biotecnología ha intentado generar variedades resistentes (Eichenlaub y Gartemann 2011) a este fitopatógeno no se ha logrado obtener resultados favorables. Algunos métodos para la detección de Cmm son la inmunofluorescencia y pruebas ELISA (Riley, 1987; Franken *et al.*, 1993), determinando la presencia o ausencia de la bacteria, otros métodos moleculares son la hibridación tipo Southern empleando sondas derivadas de los genes *CelA* y *pat-1* (Dreier *et al.*, 1995) que codifican para una endonucleasa y una serina proteasa respectivamente y a los plásmidos de virulencia pCM1 y pCM2 (Dreier *et al.*, 1997). Sin embargo, algunas de las limitantes de estos procedimientos son la baja sensibilidad y los prolongados tiempos de espera para la obtención de los resultados.



Figura 6 Planta de jitomate (*Solanum lycopersicum*) infectada con *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*

fotografía tomada por Jefferson Uvaldo Pérez Pérez

2.4.2.2 *Pseudomonas syringe* pv *tomato*

El género *Pseudomonas* se describió en 1984 como una bacteria estrictamente aerobia con flagelos polares. *Pseudomonas syringe* pv *tomato* (Pst) tiene forma de bacilo, gram negativa y es un patógeno vegetal que infecta al cultivo de jitomate, sin embargo, existen más de 50 diferentes patovares (Anzai *et al.*, 2000). Las pruebas microbiológicas dan negativo para arginina dihidrolasa y oxidasa; es una bacteria característica por secretar la toxina vegetal lipodepsinonapéptido siringomicina (Scholz-Schroeder *et al.*, 2001) y coloración amarilla fluorescente sembrado en condiciones *in vitro* en medio B King.

Los principales síntomas de Pst son manchas grasosas-acuosas en las hojas, las manchas en las hojas son inicialmente de color marrón y negro, rodeados de halos amarillos aumentando de tamaño formando grandes áreas irregulares de tejido muerto. Los daños también pueden aparecer en la fruta como manchas negras, pluriformes y con bordes definidos (menores a 2 mm) que parecen en la fruta verde simulando pecas. Estos síntomas a menudo son confundidos con peca bacteriana (*Xanthomonas campestris* v *vesicatoria*) o Tizón temprano (*Alternaria solani*). Las condiciones favorables para el desarrollo del fitopatógeno son: alta humedad relativa (mayor a 80%) y temperaturas bajas (18-24 °C).

El control de la enfermedad inicia con la obtención de semillas certificada y limpia, además de tratamientos térmicos, hipoclorito de sodio o ácido nítrico. En plántula llevar un monitoreo diario y eliminar las diagnosticadas con la enfermedad, días antes de trasplante hacer aplicaciones preventivas con soluciones cúpricas y antibióticos como estreptomycin. El uso de herramienta y condiciones asépticas al interior del invernadero son medios para el control de Pst. Las prácticas culturales como control para reducir el estrés causado por las condiciones de crecimiento de la planta, además de proporcionar niveles adecuados de nitrógeno y materia orgánica disminuirá el riesgo contaminación.



Figura 7 Planta de jitomate (*Solanum lycopersicum*) infectada con *Pseudomonas syringe* pv *tomato*
fotografía tomada de Milijašević (2009)

2.4.2.3 *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*

Es una bacteria gram negativa, causante de la enfermedad llamada Mancha Bacteriana, observada por primera vez en Texas en 1912 y actualmente se encuentra distribuida en todas las regiones templadas y húmedas del mundo (Ramírez, 2006). Las pérdidas de producción principal de este fitopatógeno se deben a la defoliación que produce aunado al daño que ocasiona en los frutos reduciendo su calidad. Esta enfermedad es de fácil diseminación debido a: viento, lluvia, insectos, semilla o por medio de los trabajadores en las labores culturales. La sintomatología aparece normalmente después de la primera semana de infección la cual se introduce por medio de lesiones en las plantas o estomas. La aparición de manchas oscuras y acuosas son características de la enfermedad. Las manchas presentan un diámetro de 4 mm volviéndose más grandes, en las hojas, peciolo y raquis. Las lesiones se unen formando estrías de color oscuro, además de generar un amarillamiento. Esta enfermedad se desarrolla en temperaturas entre los 24 y 35 °C con una humedad relativa cercana al 100% por periodos de 24 h o más. Esta bacteria puede sobrevivir en restos de plantas hasta 6 meses siempre y cuando haya un hospedero.

Las medidas preventivas van desde: el uso de variedades resistentes, semilla certificada, tratamientos térmicos (agua caliente a 55°C por 30 minutos) pre-germinación, rotación de

cultivos, evitar fugas de agua en cintas de riego o piquetas. Control cultural: eliminar plantas enfermas y tratamiento de zona infectada con Busan 30 w, antibióticos y espolvorear cal. Control biológico: mediante el asperjado de *Bacillus subtilis*, además el Acilbenzolar-s-metil, glutatión y oligosacarinas los cuales son inductores de defensas de las plantas. Control químico: mezclas de cobre + mancozeb y zineb son de los mejores tratamientos preventivos.



Figura 8 Planta de jitomate (*Solanum lycopersicum*) infectada con *Xanthomomas campestris* pv *vesicatoria*

fotografía tomada por Jefferson Uvaldo Pérez Pérez

2.5 Métodos *in vitro* para la evaluación antimicrobiana

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana son utilizadas principalmente para la detección de drogas, en áreas de investigación epidemiológicas y predicción de tratamientos terapéuticos. Muchos de los grupos de antibióticos más importantes fueron

descubiertos en los 60s, indicando así que muchos de los problemas de la quimioterapia estaban resueltos, sin embargo, con el incremento de la resistencia microbiana, estos compuestos día a día pierden eficacia. Actualmente este fallo se relaciona a resistencias bacterianas de múltiples fármacos, lo que tiene como consecuencia un problema de salud pública (Balouiri *et al.*, 2016). Por esta razón la identificación y protocolización de efectividad de nuevos compuestos es un objetivo exclusivamente importante. Los productos naturales siguen siendo la mayor fuente de nuevos compuestos hoy en día.

Una gran variedad de métodos es útil en la validación del efecto antimicrobiano de extractos compuestos o puros. Los métodos más conocidos son: difusión de agar en disco, método de gradiente microbiano, método de microdilución en placa.

2.5.1 Método de difusión de agar en disco

Técnica desarrollada en 1940, oficialmente utilizada en laboratorios de microbiología para el análisis de susceptibilidad antimicrobiano. Sin embargo, no todas las cepas de bacterias pueden ser analizadas mediante esta técnica. La estandarización de este protocolo ha sido exitosa en cepas bacterianas como *Streptococci*, *Haemophilis influenzae*, *Haemophilis parainfluenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis* usando medios de cultivo específicos (CLSI, 2012).

En este procedimiento se coloca un disco de papel filtro (6 mm aproximadamente), que contiene los compuestos antimicrobianos de interés en concentraciones seriadas y se coloca en la superficie del agar. Las cajas Petri son incubadas en condiciones deseadas. Generalmente, los agentes antimicrobianos se difunden en el agar inhibiendo la germinación y crecimiento de microorganismos y luego se mide el diámetro de inhibición. Este tipo de método no es apropiado para calcular *Concentraciones Mínimas Inhibitorias* ya que no es posible cuantificar la cantidad de agente antimicrobiano difundido en el medio de cultivo.

2.5.2 Método de gradiente antimicrobiano

Este método combina el principio de los métodos de dilución con otros con el fin de determinar la CMI. Se basa en la posibilidad de crear un gradiente de concentraciones del agente antimicrobiano analizado en un medio de cultivo. Etest® (BioMérieux) es una versión comercial del procedimiento de esta técnica. En el procedimiento, bandas son impregnadas con el agente en forma seriada y son depositadas en la superficie del agar, previamente inoculadas con los microorganismos a evaluar. Este método es utilizado para calcular CMI en la determinación de antibióticos, antifúngicos y antimicobacterias (Hausdorfer, 1998). El valor de la CMI se determina en la inserción de una banda y la elipse de inhibición de crecimiento bacteriano. Dado que es simple de implementar, su uso es ampliamente utilizado.

El estudio combina el efecto de dos agentes antimicrobianos, una banda Etest, impregnada con el primer agente y colocada en la superficie del agar previamente inoculada. Después de una hora, las bandas se remueven y son remplazadas por una segunda banda impregnada con un segundo agente. La sinergia es detectada por el incremento de la CMI de la combinación de las últimas dos diluciones comparadas con el agente más activo muestreado individualmente.

2.5.3 Método de dilución

El método de microdilución es una de las técnicas más apropiadas para la determinación de CMI, ya que ofrecen la posibilidad de estimar la concentración del agente antimicrobiano evaluado en un medio de cultivo (agar diluido) o medio líquido (macrodilución o microdilución). Ambos métodos pueden ser utilizados para medir cuantitativamente la actividad antimicrobial *in vitro* contra bacterias y hongos. Los valores de CMI registrados se definen como la concentración más baja del agente antimicrobiano evaluado que inhibe el crecimiento visible de los organismos evaluados y ésta es generalmente expresada en $\mu\text{g mL}^{-1}$ o mg L^{-1} . Actualmente existen varias guías para la evaluación de susceptibilidad antimicrobiana de bacterias y hongos. Uno de los mejores estándares reconocidos son las evaluaciones CLSI y la del Comité Europeo de Evaluación en Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST, por sus siglas en inglés).

2.5.3.1 Macro y Micro diluciones

Las macro y micro diluciones involucran la preparación de diluciones seriadas del agente antimicrobial, por ejemplo: 1, 2, 4, 8, 16 y 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en un medio líquido en tubos que contienen un volumen mínimo de 2 mL (macrodilución) o con pequeños volúmenes usando placas de 96 pozos (microdilución). Luego, cada tubo o placa es incubada con inóculo microbial preparado en el mismo medio se estandariza ajustando la suspensión microbiana a la escala de McFarland 0.5. Se mezcla perfectamente y se incuba en condiciones de temperatura y agitación dependiendo de las condiciones deseadas de cada microorganismo.

Una de las principales desventajas del método de macrodilución es la tediosa operación manual, el riesgo de errores en la preparación de soluciones antimicrobianas para cada una de las pruebas, además, la relevante cantidad de reactivos y el espacio requerido (Jorgensen, 2009). Entonces, la reproducibilidad y la economía de los agentes, sumado del espacio por la miniaturización de la prueba son las principales ventajas del método de microdilución. Los resultados finales son influenciados por cada procedimiento. Para la determinación de la CMI normalmente se puede realizar mediante un análisis previo a simple vista, sin embargo, algunos métodos colorimétricos basados en el uso de reactivos colorantes como las sales de tetrazolium, CTT (Cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio) por ejemplo, son utilizadas para la determinación del CMI. Gama-López *et al.*, (2005) mencionan que el tamaño de inóculo, el tipo de medio de cultivo, el tiempo de incubación y el método de preparación de inóculo influyen también en los valores de la CMI.

3. CAPÍTULO I

ACEITE DE SEMILLA DE *Jatropha dioica* Seseé COMO FUENTE POTENCIAL DE BIODIÉSEL

ACEITE DE SEMILLA DE *Jatropha dioica* Seseé COMO FUENTE POTENCIAL DE BIODIÉSEL

3.1 RESUMEN

Jatropha dioica Seseé es una especie de la familia Euphorbiaceae, pertenece al porcentaje de especies endémicas en México que no han sido estudiadas y valoradas como recurso fitogenético. Sus semillas son ricas en aceite y sus tallos contienen propiedades farmacológicas y curativas. El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial del aceite de las semillas de *Jatropha dioica* Seseé como materia prima para la obtención de biocombustible. Las semillas de *Jatropha dioica* Seseé se sometieron a extracción por los métodos Soxhlet y maceración. El aceite obtenido se caracterizó fisicoquímicamente y se hizo reaccionar con metanol, en presencia de hidróxido de potasio como catalizador, para la obtención de la mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos, dicha mezcla fue analizada para evaluar su posible uso como biodiésel. La extracción exhaustiva de las semillas de *Jatropha dioica* Seseé, por el método Soxhlet, proporcionó un 55.8% de aceite, mientras que por maceración se extrajo un 43.5% de aceite. Los índices de acidez (0.63 ± 0.03 mg KOH g⁻¹) y saponificación (44.48 ± 1.27 mg KOH g⁻¹) del aceite crudo, se consideraron para llevar a cabo la obtención de biodiésel mediante la reacción de transesterificación alcalina. El análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos reveló la presencia de un alto contenido de ácido linoleico (57.77%), y oleico (23.86%). De acuerdo con los resultados obtenidos, se recomienda la extracción de aceite *Jatropha dioica* Seseé y su transesterificación para un posible uso como biocombustible en la industria energética y derivados oleo químicos.

Palabras clave: biocombustible, oleaginosas, Euphorbiaceae, *Jatropha dioica*, ésteres metílicos de ácidos grasos.

Tesis de Doctorado en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Jefferson Uvaldo Pérez Pérez

Director de Tesis: Doctor, Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez

SEED OIL *Jatropha dioica* Seseé AS A BIODIÉSEL POTENCIAL RESOURCE

3.2 ABSTRACT

Jatropha dioica Seseé is a species of the *Euphorbiaceae* family, it belongs to the percentage of endemic species in Mexico that have not been studied and valued as a phylogenetic resource. Its seeds are rich in fatty acids and its stems contain pharmacological and healing properties. The objective of this work was to evaluate the potential of *Jatropha dioica* Seseé oil as a raw material in the production of biofuel. The seeds of *Jatropha dioica* Seseé were subjected to Soxhlet and maceration extraction methods. The oil obtained was characterized physicochemically and reacted with methanol in the presence of potassium hydroxide as a catalyst, to obtain a mixture of methyl esters of fatty acids, the mixture was analyzed for its possible use as biodiesel. The exhaustive extraction of the seeds of *Jatropha dioica* Seseé, provided 55.8% of yield oil by Soxhlet method and 43.5% by maceration method. The acid value (0.63 ± 0.03 mg KOH g⁻¹) and saponification value (44.48 ± 1.27 mg KOH g⁻¹) of the crude oil, were considered to carry out obtaining biodiesel by reacting alkaline transesterificación. The methyl esters analysis of fatty acid revealed the presence of a high content of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids, principally linoleic acid (57.77%), followed by oleic acid (23.86%). According to the results obtained, it is recommended the extraction of oil *Jatropha dioica* Seseé and its transesterification for possible use in the energy industry and oleo chemical derivatives.

Key words: Biofuel, Oilseeds, Euphorbiaceae, *Jatropha dioica*, fatty acids methyl ester.

Tesis de Doctorado en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: M. en C. Jefferson Uvaldo Pérez Pérez

Director de Tesis: Doctor, Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez

3.3 INTRODUCCIÓN

El estudio de fuentes de energía renovables como el biodiésel es actualmente un foco de interés para diversos centros de investigación públicos y privados (Pramanik, 2003; Bozbas, 2006). Existe un esfuerzo global para desarrollar nuevas tecnologías para la generación de energías alternativas y limpias, incluyendo celdas solares, aerogeneradores, energía geotérmica (Vera-Castillo *et al.*, 2014) y biomasa. Las energías renovables son ahora parte integral del desarrollo sustentable del medio ecológico, mejorando la calidad de vida y estabilidad económica en la población. Sin embargo, es en el caso de producción de biocombustibles a través de especies vegetales oleaginosas, es importante realizar estudios etnobotánicos conducentes al entendimiento de estos cultivos, con la finalidad de entender a estos recursos fitogenéticos como entes pertenecientes a un medio ecológico, es decir, pensar en la producción de biocombustibles sin sacrificar las riquezas biológicas de la región donde se intenten cultivar. Dichas especies oleaginosas se pueden cultivar en tierras degradadas para evitar la deforestación y así preservar una parte sustancial de la biodiversidad, asegurándonos de que las especies vegetales y animales no sean dañadas ni mucho menos sustituidas por monocultivos (White, 2008). El Departamento de Energía de los Estados Unidos estima que la demanda global de energía incrementará un 35% en 2030 comparado al año 2005, es por ello que la industria energética se está enfocando en las especies de oleaginosas como la mejor opción de materias primas para la producción de biodiésel (Ye *et al.*, 2013; Ganesh-Ram *et al.*, 2008). Especies como colza (*Brassica napus*), girasol (*Helianthus annuus*), soya (*Glycine max*), palma aceitera (*Elaeis guineensis*) y piñón (*Jatropha curcas*), tienen actualmente un gran interés, de las cuales las pertenecientes a este último género destacan por la cantidad y composición de los aceites extraídos de sus semillas, además de sus características fisiológicas, agronómicas, ambientales y de producción (Sharma *et al.*, 2013).

El uso de biodiésel como combustible tiene varias ventajas como son: proviene de fuentes renovables, seguro para su uso en motores de combustión interna y octanajes adecuados. Además, reduce las emisiones de gases de efecto invernadero (Bozbas, 2006). Este combustible se obtiene de aceites o grasas por medio de una reacción de transesterificación, usando alcohol en un medio catalítico. La transesterificación consiste

en un número consecutivo de reacciones irreversibles, donde los triglicéridos se transforman en di glicéridos, mono glicéridos y posteriormente en glicerol y ésteres metílicos de ácidos grasos (Reyes-Trejo, *et al.*, 2014). Sin embargo, es importante analizar características fisicoquímicas y el porcentaje de ácidos grasos saturados e insaturados del biodiésel para determinar que tan útil es e incluso la posibilidad de poder hacer mezclas con diésel comercial con el fin de no ocasionar daños internos en los motores.

J. dioica pertenece a la familia de las Euphorbiaceae, que comprende alrededor de 199 especies (The Plant List, 2019), de las cuales, 48 son endémicas de México (Steinmann, 2003); su origen se ubica como componente de la sucesión vegetal asociada a la regeneración de las Selvas Altas Perennifolias de México, afirmación que es apoyada en estudios moleculares (Achten *et al.*, 2010). *J. dioica* es un arbusto con tallos carnosos y flexibles de color café rojizo, puede alcanzar hasta los 1.5 m de altura, sus hojas miden de 2 a 4 cm de longitud con punta redondeada y se presentan agrupadas en los nudos, su savia es incolora, pero al contacto con el aire vira a color rojizo, sus flores son pequeñas de color rosa pálido. Su fruto (drupa) es globoso y contiene sólo una semilla que presenta un pericarpio firme y compacto. Las hojas aparecen en épocas de lluvia.

J. dioica, es comúnmente utilizada en comunidades del noroeste de México, donde utilizan sus raíces en infusiones para el tratamiento de caída de cabello, eliminar sarna o en lavados para aliviar la infección de golpes, heridas, granos (Wong-Paz, 2014) y cáncer de piel (Villareal *et al.*, 1988). Esta especie se distribuye desde el norte de Querétaro hasta Chihuahua, pero limitada por las dos Sierras Madres que dividen el área compartiendo un medio ecológico con matorrales xerófilos. Se ha encontrado alrededor de los 2,000 a los 2,800 msnm, con un clima BS₁, h' (h) w, que de acuerdo con la clasificación de Köppen, modificado por García (1981), corresponde a un clima seco, semiárido con lluvias en verano y temperatura media anual de 22°C, variando entre los 25°C en abril-mayo y 18°C en enero con precipitaciones mínimas de 43 mm y máximas de 979 mm (Fresnedo-Ramírez, 2012). A pesar del importante uso antropocéntrico de *Jatropha dioica* en localidades rurales y su uso como recurso a pequeña escala, en la actualidad no se han reportado suficientes estudios sobre el contenido de aceite y perfiles fisicoquímicos de aceite de semilla de esta especie procedente del estado de Guanajuato.

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo es aportar datos útiles que soporten el uso de este recurso fitogenético como una fuente potencial de energía renovable

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1 Material Vegetal

Las semillas de *J. dioica*, en estado de madurez y sin daño físico, fueron colectadas de 25 plantas durante los meses de junio y julio de 2017 en la localidad de Buenavistilla, Municipio de San José Iturbide, Guanajuato, México, a una elevación de 2,100 m. El ejemplar fue identificado y depositado en el Herbario-Hortorio "Jorge Espinoza Salas" de departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. Las semillas se dejaron secar a la sombra, después se obtuvieron los cotiledones y se almacenaron bajo refrigeración a 4°C hasta su procesamiento.

3.4.2 Caracterización morfológica de las semillas de *Jatropha dioica* Seseé

Un total de 30 semillas con pericarpio fueron pesadas en una balanza digital OHAUS (precisión de 0.001 g). Las dimensiones geométricas se determinaron como: largo (L), ancho (W) y espesor (T) con un vernier digital TRUPER CALDI-6MP (precisión 0.01 mm). Adicionalmente, se analizaron datos de diámetro aritmético, diámetro geométrico y esfericidad de las semillas utilizando las ecuaciones 1, 2 y 3:

$$\text{Diámetro aritmético } (Da) = \frac{L+W+T}{3} \dots\dots\dots(1)$$

$$\text{Diámetro geométrico } (Dg) = (L + W + T)^{1/3} \dots\dots\dots(2)$$

$$\text{Esfericidad } (\emptyset) = \frac{L+W+T^{1/3}}{x} = \frac{Dg}{x} \dots\dots\dots(3)$$

3.4.3 Obtención y caracterización del aceite de *Jatropha dioica* Seseé

Las semillas de *J. dioica* (previamente molidas, 50 g) se empaquetaron en cartuchos de papel filtro y se sometieron a extracción utilizando hexano por método Soxhlet durante 18 horas y por maceración por 48 horas. La mezcla de aceite con hexano, previamente secada con Na₂SO₄ anhidro, se evaporó al vacío en un rota-evaporador marca Buchi

modelo R-210 a una temperatura de 50°C. El proceso se hizo por triplicado y se determinó el rendimiento de aceite. Las propiedades fisicoquímicas que se determinaron en el aceite fueron: viscosidades, dinámica y cinemática (Viscosímetro Anton Parr SVM 3000) e índices de acidez y saponificación (AOAC, 1980) y su calor de combustión se llevó a cabo en un calorímetro marca Anton Parr modelo 6400.

3.4.4 Preparación y caracterización de Biodiésel y mezclas de biodiésel-diésel

Para la obtención de biodiésel, primero se preparó una mezcla de metanol con hidróxido de potasio a una concentración de 0.028 g /mL. A esta mezcla se adicionó el aceite de *J. dioica* en una proporción 0.25:1 (v/p). La mezcla se agitó y calentó bajo reflujo con metanol durante 1 h. Transcurrido dicho tiempo se transfirió a un embudo de separación y se dejó reposar durante 12 h, hasta observar dos fases consistentes en biodiésel y glicerina. El biodiésel (Fase superior) fue tratado con ácido cítrico al 0.1% (dos lavados en proporción 1:1), después se lavó con agua caliente, finalmente se secó con sulfato de sodio anhidro y se guardó protegido de la luz a 4°C hasta su procesamiento. La composición de ácidos grasos se determinó por cromatografía de gases en un cromatógrafo Agilent 6890, equipado con un detector de ionización de flama y una columna AT-FAME (30 m x 0.25 mm x 0.25 mm). La temperatura inicial del horno fue de 170 °C (1 min), rampa 10 °C/min, temperatura final 240 °C. Temperatura del inyector y detector 260°C. Se utilizó helio como gas acarreador, a una velocidad de flujo de 1.8 mL min⁻¹. Una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos se utilizó como estándar y los tiempos de retención se utilizaron para la detección de picos de las muestras, Los ácidos grasos fueron estimados como porcentaje del área total de los picos de ésteres metílicos.

Se prepararon mezclas de biodiésel-diésel denominadas B05, B10, B20, B30, B40 y B100 donde el número indica el porcentaje de biodiésel en la mezcla. Las viscosidades cinemáticas, dinámica y la densidad del biodiésel y de cada una de las mezclas fueron medidas a presión atmosférica a 20 y 40 °C en un Viscosímetro-densímetro Anton Parr rotacional Stabinger SVM 3000. La medición de los calores de combustión del biodiésel y las mezclas B10, B20, B30, B40 y B50 se llevó a cabo en un calorímetro marca Anton Parr modelo 6 400, se evaluó aproximadamente 0.5 g de muestra.

3.4.5 Análisis estadístico

Los resultados están expresados como medias $\pm$ desviación estándar de los análisis, los ensayos se efectuaron por triplicado.

3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.5.1 Caracterización morfológica de semilla de *Jatropha dioica* Seseé

Las semillas de *J. dioica* están compuestas por una drupa, con un pericarpio firme de color café oscuro. Dentro se encuentra una semilla color blanco la cual se divide en dos cotiledones con un embrión en el medio. Datos como: diámetro aritmético, diámetro geométrico y esfericidad son útiles para procesos de almacenamiento, clasificación, descascarado, entre otros (Betancur-Prisco *et al.*, 2014). Medidas como largo, ancho y espesor de las semillas, son significativamente similares, lo que asemeja una esfera. Además, el valor de esfericidad obtiene un 91.82% calculado, lo que confirma la forma de la semilla.

Cuadro 2 Características físicas de semillas de *Jatropha dioica* Seseé

Parámetro	Media	Rango
		Mínimo-máximo
Largo (mm)	11.75 $\pm$ 1.65	9.5-16.7
Ancho (mm)	10.32 $\pm$ 1.45	8.0-13.3
grosor (mm)	10.21 $\pm$ 1.19	8.6-13.5
peso (g)	1.30 $\pm$ 0.05	0.96-1.19
Diámetro aritmético (mm)	10.76 $\pm$ 1.33	8.7 -14.1
Diámetro geométrico (mm)	10.66 $\pm$ 1.50	8.7 -14.1
Esfericidad %	91.82 $\pm$ 0.04	0.84-1.0

3.5.2 Contenido y caracterización de aceite y biodiésel de semilla de *Jatropha dioica* Seseé

El rendimiento de la extracción de aceite de semilla de *J. dioica* por método Soxhlet fue de 55.8% y por maceración 43.5%. En la Cuadro 3 se muestran algunos parámetros fisicoquímicos de aceite crudo y biodiésel obtenidos de semillas de *J. dioica*. Se observa que el contenido de aceite extraído es comparable con la de otros cultivos oleaginosos; como higuera, 64.84% (Goytia-Jiménez *et al.*, 2010), Soya, 35.5% (Mosquera-Artamonov *et al.*, 2016) e incluso similares a otras especies del género *Jatropha*, 44.4% y 56.5% (Pradhan *et al.*, 2011; Prasad *et al.*, 2012).

El alto contenido de aceite extraído de la semilla, indica que es un recurso potencialmente útil para ser transformado en biocombustible. Sin embargo, esto puede estar relacionado con el origen y el estado de maduración de las semillas.

Cuadro 3 Propiedades físicas de aceite de semilla de *Jatropha dioica* Seseé

Propiedad	Aceite	Biodiésel
Acidez (mg KOH g ⁻¹)	0.63 ± 0.03	-
Índice de saponificación (mg KOH g ⁻¹)	44.48 ± 1.27	-
Densidad a 20°C (g cm ⁻³)	0.8966	0.8843
Viscosidad a 40°C (mm ² s ⁻¹)	16.915	4.5763
Calor de combustión (MJ kg ⁻¹)	37.27	38.09

La determinación de calor de combustión de una sustancia permite estimar la cantidad de energía que se libera cuando ésta se quema (Knothe, 2010). El calor de combustión obtenido en aceite crudo y biodiésel registran, en ambos casos, cantidades menores a 39.500 MJ kg⁻¹, límite establecido por la norma internacional ASTM D240 Método de prueba estándar para calor de combustión en hidrocarburos, mediante una bomba calorimétrica para el uso de biodiésel; de modo que, tanto el aceite crudo como el biodiésel obtenido en este trabajo pueden considerarse aptos para su uso en motores de combustión interna.

El índice de acidez permite determinar el porcentaje de ácidos grasos en una muestra de aceite, además de evaluar si la reacción de transesterificación que se llevará a cabo, es de manera satisfactoria. Con el índice de saponificación se obtiene una estimación del largo de las cadenas de los ácidos grasos (Neisen, 2010) además indica si el aceite es potencialmente útil para la elaboración de jabones líquidos, así como en la industria de shampoo (Akbar *et al.*, 2009).

El índice de acidez obtenido ($0.63 \text{ mg KOH g}^{-1} \pm 0.03$) supera ligeramente el límite establecido en la norma de la Unión Europea EN 14214 para la producción de biodiésel ($0.0\text{-}0.5 \text{ mg KOH g}^{-1}$). Los resultados de saponificación corresponden a los obtenidos por otras investigaciones en especies del género *Jatropha* (Adebawale *et al.*, 2006), lo que sugiere que el aceite es potencialmente útil para elaboración de biodiésel o bien para su uso directo como biocombustible.

La viscosidad cinemática se define como la resistencia de un fluido al movimiento, esta característica tiene diferentes comportamientos según el peso molecular del aceite y proporción de sus ácidos grasos instaurados (Akbar *et al.*, 2009). Esta característica tiene un gran impacto en el motor ocasionando altos arrastres en la bomba de inyección, causando altas presiones y volúmenes de combustible, especialmente operando a bajas temperaturas (Pinzi *et al.*, 2009).

En el Cuadro 4, se muestra la comparación de estándares para biodiésel (EN 1424) y mezclas de biodiésel (ASTM D 6751) de las propiedades de viscosidad cinemática y densidad de mezclas preparadas con biodiésel-diésel (B05, B10, B20, B30, B40 y B100), de *Jatropha dioica*.

Cuadro 4 Propiedades de biodiésel de *Jatropha dioica* Seseé y mezcla de biodiésel-diésel comparado con estándares de biodiésel.

Propiedad	EN 1424	ASTM D6751	B100	B40	B30	B20	B10	B05	Método de análisis
Densidad a 15°C (Kg m ⁻³)	860- 900		888.8	849.0	843.8	836.2	828.0	826.0	EN-ISO 3675 EN-ISO 12185
Viscosidad a 40°C (mm ² s ⁻¹)	3.5- 5.0	1.9-6.0	4.6	2.7	2.6	2.5	2.3	2.3	EN-ISO 3104 ASTM-D-445

Los resultados indican que la viscosidad cinemática decrece de forma no lineal mientras la temperatura aumenta. Las altas viscosidades en los combustibles no favorecen un buen desempeño en motores, por lo que se busca que éstas tengan características específicas, y no afecten en el flujo y la atomización del combustible (Akbar *et al.*, 2009). La viscosidad cinemática de *J. dioica* disminuyó al aumentar la temperatura de 20 a 90°C (7.38 a 2.07 mm² s⁻¹). Se observa que a 40°C, el biodiésel (B100; 4.57 mm² s⁻¹) cubre los requerimientos en norma EN 14214 (3.5-5.0 mm² s⁻¹). Además, las mezclas B05, B10, B20, B30 y B40 de biodiésel-diésel son aptas para su uso según los estándares establecidos en la norma ASTM D 6751-09 (1.9-6.0 mm² s⁻¹). Los datos se acercan a los resultados obtenidos por Prasad *et al.*, (2012) quienes reportan 5.14 mm² s⁻¹. La densidad de las mezclas de biodiésel-diésel tiene un comportamiento lineal que corresponde cada vez más al aumentar porcentualmente la mezcla de diésel y temperatura hasta los 70°C. Gunstone (2004) menciona que la densidad de un aceite disminuye de acuerdo con su peso molecular, pero aumenta por el contenido de ácidos grasos insaturados. La densidad a 15°C de biodiésel obtenido de *J. dioica* (888.8 kg m⁻³) cumple con los estándares establecidos en la normal EN 14214 (860-900 kg m⁻³) para biodiésel facilitando así una forma de manejar diferentes mezclas de biodiésel-diésel.

3.5.3 Perfil de ácidos grasos de *Jatropha dioica* Seseé

En el Cuadro 5 se observan los principales porcentajes obtenidos en el análisis de cromatografía de gases y su comparativa con otras especies oleaginosas. Se encontró un 15.4% de ácidos grasos saturados, 24.36% monoinsaturados y 60% poliinsaturados.

Cuadro 5 Composición de ácidos grasos (%) de *Jatropha dioica* Seseé y otras fuentes naturales.

Ácido graso	Fórmula molecular	Estructura	Porcentaje %		
			<i>Jatropha dioica</i>	<i>Jatropha curcas</i> ^a	<i>Elaeis guineensis</i> ^b
Palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	C16:0	9.30	14.2	44
Estearico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	C18:0	6.10	7.0	4.5
Palmitoleico	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	C16:1	0.50	0.7	
Oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	C18:1	23.86	44.7	39
Linoleico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	C18:2	57.80	32.8	10.1
Linolénico	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	C18:3	0.20	0.2	
Saturados	-	-	15.40	21.6	48.5
Monoinsaturados	-	-	24.36	45.4	39
Poliinsaturados	-	-	60.00	33.0	10.1

^aAkbar *et al.*, (2009).

^bSyamsuddin *et al.*, (2016)

Los ácidos grasos predominantes en las semillas de *J. dioica* son: ácido linoleico (57.80%) seguido del ácido oleico (23.86%) y ácido palmítico (9.30%), estos datos son comparables con los determinados en *J. curcas* por algunos otros investigadores (Akbar *et al.*, 2009; Pradhan *et al.*, 2011). Los ácidos palmitoleico, estearico y linoleico están presentes en pequeñas cantidades. *J. dioica* contiene un mayor porcentaje de ácido linoleico (57.80%) respecto a *J. curcas* (32.8%). Ambas *Jatropha* se componen de una menor cantidad de ácido palmítico respecto al de palma de aceite (*Elaeis guineensis*) (Syamsuddin *et al.*, 2016).

A nivel industrial, una desventaja del biodiésel de *J. dioica* es que contiene altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados (ácido linoleico 57.80%) el cual tiene efectos negativos al disminuir su estabilidad y reducir el número de cetano (Pinzi *et al.*, 2009). Además de ser susceptible a la aparición de olores y sabores indeseables ocasionados por la formación de aldehídos y alcoholes causados por los peróxidos e hidroperóxidos. Sin embargo, una ventaja es que presenta fluidez a bajas temperaturas por el bajo contenido de ácidos grasos saturados (Bahandur *et al.*, 2013) como ácido palmítico (9.31%) y esteárico (6.09%). Por lo tanto, el uso del biodiésel derivado de los aceites de esta especie es potencialmente útil como fuente de energía renovable.

3.6 CONCLUSIONES

Los ácidos grasos predominantes en el aceite de semilla de *J. dioica* son el ácido linoleico, oleico y palmítico. La viscosidad cinemática y densidad del biodiésel obtenido presenta características aceptables dentro de las normas EN 14214 y ASTM D 6751 para la producción de biodiésel y mezclas de biodiésel-diésel.

El contenido de ácidos grasos poliinsaturados son una limitante para su uso en motores de combustión interna, sin embargo, el aceite podría ser utilizado en motores de combustión inversa para producir electricidad en pequeña escala.

3.7 AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de postgrado a JUPP, así como al Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Autónoma Chapingo por las facilidades y recomendaciones hechas durante la fase experimental.

3.8 REFERENCIAS

- Achten, W. M. J., Maes, W. H., Aerts, R., Verchot, L., Trabucco, A., Mathijs, E. and Muys, B. (2010). *Jatropha*: From global hype to local opportunity. *Journal of Arid Environments*, 74: 164–165. DOI:10.1016/j.jaridenv.2009.08.010
- Adebowale, K. O., Adedire, C. O. (2006) Chemical composition and insecticidal properties of the underutilized *Jatropha curcas* seed oil. *African Journal of Biotechnology* 5:901 – 906. Disponible en: http://www.academicjournals.org/app/webroot/article/article1379780991_Adebowale%20and%20Adedire.pdf
- Akbar, E., Yaakob, Z., Kamarudin, S. K., Ismail, M., Salimon, J. (2009). Characteristic and composition of *Jatropha curcas* oil seed from Malaysia and its potential as biodiesel feedstock. *European Journal of Scientific Research* 29: 396–403. Disponible en: https://www.doc-developpement-durable.org/file/Huiles-vegetales-noix/Fiches_plantes/jatropha/Characteristic%20and%20Composition%20of%20Jatropha%20Curcas%20Oil%20Seed_Malaysia.pdf
- Bahadur, B., Sujatha, M., Carels, N. (2013). *Jatropha*, Challenges for a New Energy Crop. Volume 2. *Genetic Improvement and Biotechnology*. New York, Springer
- Betancur-Prisco, J. C., Mira-Hernández, C., París-Londoño, L. S. (2014). Physical and mechanical properties of *Jatropha curcas* seed grown up in Colombia. *Revista de La Facultad de Ingeniería*, Universidad de Antioquia Nicaragua, 73, 187–199. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-62302014000400018&script=sci_arttext&tlng=en
- Bozbas, K. (2008). Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 12(2), 542–552. DOI:10.1016/j.rser.2005.06.001
- Fresnedo-Ramírez, J., Orozco-Ramírez, Q. (2012). Diversity and distribution of genus *Jatropha* in Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60(3), 1087–1104. DOI:10.1007/s10722-012-9906-7

- García M., E. (1981). Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen. UNAM. México D.F. 243 p
- Ganesh-Ram, S., Parthiban, K. T., Senthil Kumar, R., Thiruvengadam, V., Paramathma, M. (2008). Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55: 803-809. DOI:10.1007/s10722-007-9285-7
- Goytia-Jiménez, M. A., Gallegos-Goytia, C. H. and Nuñez-Colín, C. A. (2010). Relationship Among Climatic, Variables with the Morphology and Oil Content of Castor Oil Plant (*Ricinus communis* L.) Seeds from Chiapas. *Revista Chapingo Serie Forestales y del Ambiente*. 17(1): 41-48. DOI:10.5154/r.rchscfa.2010.08.048
- Hammond, E.W. (1993). *Chromatography for the Analysis of Lipids*. CRC Press, Boca Raton, pp. 81 – 85. Consultada en: [https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=dcYeQ8RZiZ0C&oi=fnd&pg=PA1&dq=Hammond+E.W.,+\(1993\).+Chromatography+for+the+Analysis+of+Lipids.&ots=eMT4v-vF93&sig=Zfyx_z3hGnGeyzxF1z7hlcG3ZOw#v=onepage&q=Hammond%20E.W.%2C%20\(1993\).%20Chromatography%20for%20the%20Analysis%20of%20Lipids.&f=false](https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=dcYeQ8RZiZ0C&oi=fnd&pg=PA1&dq=Hammond+E.W.,+(1993).+Chromatography+for+the+Analysis+of+Lipids.&ots=eMT4v-vF93&sig=Zfyx_z3hGnGeyzxF1z7hlcG3ZOw#v=onepage&q=Hammond%20E.W.%2C%20(1993).%20Chromatography%20for%20the%20Analysis%20of%20Lipids.&f=false)
- Knothe, G. (2010). Biodiesel and renewable diesel: a comparison. *Progress in Energy and Combustion Science*, 36(3), 364-373. DOI:10.1016/j.pecs.2009.11.004
- Mosquera A., J. D., Vasco L., J. F., Acosta O., A. A., Hernández R., I., Ventura R., E., Gutiérrez C., E., Rodríguez G., M. (2016). Optimization of castor seed oil extraction process using response surface methodology. *Ingeniería e Investigación*. 36(3):82-88. DOI:10.15446/ing.investig.v36n3.55632
- Pinzi, S., Garcia, I. L., Lopez-Gimenez, F. J., Luque De Castro, M. D., Dorado, G., Dorado, M. P. (2009). The Ideal Vegetable Oil-based Biodiesel Composition: A Review of Social, Economical and Technical Implications. *Energy & Fuels*, 23(5), 2325–2341. DOI:10.1021/ef801098a

- Pradhan, S., Naik, S. N., Khan, M. A. I. and Sahoo, P. (2011). Experimental assessment of toxic phytochemicals in *Jatropha curcas*: oil, cake, bio-diesel and glycerol. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, 92(3), 511–519. DOI:10.1002/Jsfa.4599
- Pramanik, K. (2003). Properties and use of *Jatropha curcas* oil and diesel fuel blends in compression ignition engine. *Fuel and Energy Abstracts*, 44(3), 170. DOI:10.1016/s0140-6701(03)81907-0
- Prasad, L., Pradhan, S., Das, L. M., Naik, S. N. (2012). Experimental assessment of toxic phorbol ester in oil, biodiesel and seed cake of *Jatropha curcas* and use of biodiesel in diesel engine. *Applied Energy*, 93, 245–250. DOI:10.1016/j.apenergy.2011.11.076
- Reyes-Trejo, B., Guerra-Ramírez, D., Zuleta-Prada, H., Cuevas-Sánchez, J. A., Reyes, L., Reyes-Chumacero, A., Rodríguez-Salazar, J. A. (2014). *Annona diversifolia* seed oil as a promising non-edible feedstock for biodiesel production. *Industrial Crops and Products*, 52, 400–404. DOI:10.1016/j.indcrop.2013.11.005
- Sharma, H. K., Shukla, A., Kumar, A., Shukla, A., Choudhary, S. B., Jatothu, J. L. (2013). Variability and genetic diversity assessment in physic nut (*Jatropha curcas* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 7: 2380-2391. DOI: 10.5897/JMPR12.1164
- Steinmann, W. V. (2003). Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. *Acta Botánica Mexicana*. 61: 61-93. DOI. org/10.21829/abm61.2002.909
- Syamsuddin, Y., Murat, M. N., Hameed, B. H. (2016). Synthesis of fatty acid methyl ester from the transesterification of high- and low-acid-content crude palm oil (*Elaeis guineensis*) and karanj oil (*Pongamia pinnata*) over a calcium–lanthanum–aluminum mixed-oxides catalyst. *Bioresource Technology*, 214, 248–252. DOI:10.1016/j.biortech.2016.04.083
- The Plant List. 2019. Version 1. Consultada en: <http://www.theplantlist.org/>. [Última consulta: 09 de abril de 2019]

- Vera-Castillo, Y. B., Pritchard, H. W., Frija, Chellattan-Veetil, A. P., Cuevas-Sanchez J. A. Van Damme, P. P., Van-Huylenbroeck, G. (2014). Production viability and farmers' willingness to adopt *Jatropha curcas* L. as a biofuel source in traditional agroecosystems in Totonacapan, Mexico. *Agricultural Systems* 125, 42-49. DOI:10.1016/j.agsy.2013.12.003
- Villarreal, A. M., Dominguez, X. A., Williams, H. J., Scott, A. I., Reibenspies, J. (1988). *Citlaltione*, a New Diterpene from *Jatropha dioica* var. sessiliflora. *Journal of Natural Products*, 51(4), 749–753. DOI:10.1021/np50058a014
- Wong-Paz, J. E., Castillo-Inungary, M. L., López-López, L. I., Contreras-Esquivel, J. C., Nevárez-Moorillon, V., Aguilar, C. N. *Jatropha dioica*: Fuente potencial de agentes antimicrobianos. AQM 2010;2(4). Consultado en: https://www.researchgate.net/profile/Jorge_Wong-Paz/publication/237092367_Jatropha_dioica_FUENTE_POTENCIAL_DE_AGENTES_ANTIMICROBIANOS/links/00b7d51b7ef7ecd42f000000/Jatropha-dioica-FUENTE-POTENCIAL-DE-AGENTES-ANTIMICROBIANOS.pdf
- Ye, J., Hong, Y., Qu, J., Wang, C. (2013). Improvement of *J. curcas* Oil by Genetics Transformation. En Bahadur, Bir., et al., (Ed). *Jatropha*, Challenges for a New Energy Crop. Volume 2. *Genetic Improvement and Biotechnology*. (pp 547-562), New York, Springer

4. CAPÍTULO II

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DE RAÍCES DE *Jatropha dioica* Seseé

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DE RAICES DE *Jatropha dioica* Seseé

4.1 RESUMEN

Jatropha dioica Seseé es una especie vegetal endémica de México que pertenece a la familia Euphorbiaceae, valorada en la medicina tradicional por sus propiedades farmacológicas y curativas en raíces y tallos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* de extractos de raíz obtenidos de diferentes polaridades mediante método de microplaca aplicados en fitopatógenos de jitomate (*Solanum lycopersicum*). El extracto metanólico se obtuvo mediante maceración y a partir de éste se obtuvieron los extractos hexánico y de acetato de etilo por percolación, el extracto hexánico se fraccionó en cromatografía en columna. El efecto antimicrobiano de los extractos se evaluó en *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xv) y posteriormente se calculó la *concentración mínima inhibitoria* (CMI). La supervivencia de las bacterias se evaluó mediante la adición de CTT (Cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio) en medios expuestos a extractos por 24 h de incubación. Los extractos metanólico, hexánico y acetato de etilo, revelaron tener actividad antimicrobiana en los fitopatógenos Cmm, Pst y Xv. El extracto hexánico tuvo una mayor actividad comparado con el resto de los extractos. La CMI del extracto metanólico fue de 5.8 y 2.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Pst y Xv), del extracto hexánico 4.4, 0.5 y 1.7 (Cmm, Pst y Xv) y del extracto de acetato de etilo 2.0, 3.5 y 2.3 (Cmm, Pst y Xv), respectivamente. El compuesto citlaltiriona aislado del extracto hexánico, también presentó actividad antimicrobiana con una CMI de 1.0, 1.0 y 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra las bacterias Cmm, Pst y Xv, respectivamente. Los resultados *in vitro*, posicionan a *Jatropha dioica* Seseé como una especie potencial en el tratamiento de bacterias en el cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum*).

Palabras clave: citlaltiriona, biocontrol, fitopatógenos, *Solanum lycopersicum*, Euphorbiaceae, sangre grado.

Tesis de Doctorado en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Jefferson Uvaldo Pérez Pérez

Director de Tesis: Doctor, Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez

***In vitro* ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Jatropha dioica* Seseé ROOTS**

4.2 ABSTRACT

Jatropha dioica Seseé is a Mexico's endemic plant specie that belongs to the Euphorbiaceae family, valued in traditional medicine for roots and stem's pharmacological and healing properties. The aim of this work was to evaluate *in vitro* antimicrobial potential of root extracts obtained from different polarities by microplate method applied in tomato phytopathogens (*Solanum lycopersicum*). The methanolic extract was obtained by maceration and from this, the hexane and ethyl acetate extracts were obtained by percolation. The hexane extract was fractionated by column chromatography. The antimicrobial effect of the extracts was evaluated in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), *Pseudomonas syringe* pv. *tomato* (Pst), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xv) and subsequently the minimum inhibitory concentration (MIC) was calculated. The survival of the bacteria was evaluated by adding TTC (2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride) in culture exposed to extracts for 24 h of incubation. The results of the methanolic, hexane and ethyl acetate extracts reveal antimicrobial activity in phytopathogens Cmm, Pst and Xv. The hexane extract had a higher activity compared to the rest of the extracts. The MIC of the methanolic extract was 5.8 and 2.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Pst and Xv), the hexane extract 4.4, 0.5 and 1.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Cmm, Pst and Xv) and of the ethyl acetate extract 2.0, 3.5 and 2.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Cmm, Pst and Xv). The compound citlaltiriona isolated from the hexanic extract, also presented antimicrobial activity with a MIC of 1.0, 1.0 and 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Cmm, Pst and Xv respectively. The *in vitro* results position *Jatropha dioica* Seseé as a potential species in the treatment of bacteria in the tomato crop (*Solanum lycopersicum*).

Key words: Citlaltirione, biocontrol, phytopathogenes, *Solanum lycopersicum*, Euphorbiaceae, Sangre Grado.

Tesis de Doctorado en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Jefferson Uvaldo Pérez Pérez

Director de Tesis: Doctor, Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez

4.3 INTRODUCCIÓN

El uso incontrolado de pesticidas químicos ha traído consigo erosión de suelos, resistencia de cepas bacterianas, fúngicas y tolerancia de algunos insectos, además de los problemas que conlleva las sustancias tóxicas en la salud humana. El control biológico ofrece una fuerte alternativa sustituyendo así el uso de pesticidas sintéticos, además, los microorganismos o compuestos colaboran en la restauración del balance natural de los ecosistemas que se va perdiendo en una situación de cultivos intensivos (Reino, 2007). El uso de metabolitos secundarios suprime enfermedades para ofrecer salud vegetal (Handelsman, 1996). Por lo que el uso de estos compuestos ha sido de gran interés para el tratamiento de enfermedades vegetales.

J. dioica es una especie que pertenece a la familia Euphorbiaceae, es una de las 199 especies hasta ahora registradas en el mundo (The Plant List, 2019) y una de las 48 especies endémicas de México (Steinmann, 2003). *J. dioica* es una planta que crece en zonas áridas del noreste de México y es empleada en la medicina tradicional preparada como decocción para el control de caída de cabello, dolor de riñones y problemas de digestión (Manzanero-Medina *et al.*, 2009). Se tienen registros de su actividad antiviral (Silva-Mares *et al.*, 2013) y antimicrobial (Silva-Belmares *et al.*, 2014) en patógenos humanos, además, se ha realizado la evaluación de su actividad antioxidante y quimioprotectante (Martínez *et al.*, 2014). Actualmente se han identificado tres diterpenos; riolozatriona (Domínguez *et al.*, 1980), citlaltiriona y jatrophona (Villareal *et al.*, 1988) pertenecientes al género *Jatropha*. Además, algunos compuestos como metabolitos secundarios propios de la planta como flavonoides (Montenegro *et al.*, 2009), polifenoles (Belmares *et al.*, 2009, Castillo *et al.*, 2010) que posiblemente son los responsables de las propiedades curativas de la planta. Sin embargo, para el caso del diterpeno citlaltiriona, no se ha evaluado su bioactividad.

El objetivo de este trabajo fue evaluar mediante el método de microplaca la actividad antimicrobiana de extractos de raíz de *Jatropha dioica* Seseé de diferentes polaridades y del compuesto aislado citlaltiriona del extracto hexánico contra las cepas bacterianas *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), *Pseudomonas syringe* pv. *tomato* (Pst), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xv).

4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1 Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas fueron proporcionadas por el instituto de fitosanidad-fitopatología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México. Se obtuvieron subcultivos de los patógenos para el crecimiento de la bacteria por 24 h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en medio de cultivo agar caldo nutritivo (extracto de carne 3 g L^{-1} , peptona de carne 5 g L^{-1} y agar 20 g L^{-1}). Se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su procesamiento.

4.4.2 Material Vegetal

Las raíces de 3 plantas de *J. dioica* fueron colectadas en la localidad de Buenavistilla, Municipio de San José Iturbide, Guanajuato, México en junio-julio 2017. El ejemplar fue identificado y depositado en el Herbario-Hortorio "Jorge Espinoza Salas" de departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. Las raíces se dejaron secar a la sombra, después se cubrieron y resguardaron a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

4.4.3 Medios de cultivo para incubación microbiana

Para la inoculación, multiplicación y resiembras de las suspensiones bacterianas, se prepararon medios de cultivo, caldo nutritivo (3 g/L extracto de carne, 5 g/L peptona de carne, aforado a 1 L) y agar caldo nutritivo (BIOXON®), ambos medios de cultivo se ajustaron a un pH de 7.0 ± 0.2 .

4.4.4 Preparación de extractos y particiones de raíces de *Jatropha dioica* Seseé

Las raíces de *J. dioica* previamente secas y molidas (9 kg) se sometieron a maceración en metanol por 120 h con agitación cada 24 h. El extracto metanólico se concentró en un rota evaporador marca Buchi modelo R-210 a una temperatura de 50°C . Ésta se disolvió en agua ($1:20$; p/p) y particionó con *n*-hexano y acetato de etilo en la misma proporción. Los disolventes se evaporaron y se calcularon rendimientos.

Una porción de la partición de hexano (8.6 g), se analizó por cromatografía en columna, empacado con sílice gel y se utilizaron 300 mL (3x100 mL) de cada gradiente de polaridad de hexano, hexano-AcOEt (9:1, 8:2, 5:5, 0:10) y se utilizó metanol como eluyente final, se colectaron 49 fracciones de 6 mL cada uno. Se seleccionaron ocho fracciones por mostrar sólidos blanquecinos a los que se les analizó en cromatografía en capa delgada (TLC), para comprobar su identidad se comparó con un estándar de β -sitoesterol, posteriormente se evaluó su actividad antimicrobiana contra las tres cepas bacterianas. Para las pruebas antimicrobianas, se disolvieron 0.1 g de las particiones en 20 mL de dimetilsulfoxido (DSMO, 10%) para dar una concentración final de $5,000 \mu\text{g mL}^{-1}$, las fracciones se disolvieron. Todas las disoluciones se esterilizaron con filtros para jeringa de $0.45 \mu\text{m}$ y se resguardaron en frascos ámbar a 4°C hasta su procesamiento.

4.4.5 Evaluación antimicrobiana por método de microplaca.

Las bacterias Cmm, Pst, Xv se incubaron en medio líquido, caldo nutritivo a 37°C , 110 rpm por 24 h. En una longitud de onda de 600 nm se ajustó la absorbancia del medio de cultivo a 0.5, quedando una concentración bacteriana final de 1×10^6 ufc/mL. En placas de 96 pozos, se adicionaron 50 μL de suspensión bacteriana fitopatógena y diluciones seriadas de 200 a 175 μL (escala de -5 μL) de extractos vegetales, además se adicionaron de 0 a 25 μL (escala de +5 μL) de medio de cultivo estéril, dando un total de 250 μL en cada pozo. La concentración final de los extractos fue de 3,750, 3,000, 2,250, 1,500 y 750 ppm. Como control negativo (0% inhibición) se utilizó 200 μL medio de cultivo y 50 μL suspensión bacteriana y como control positivo (100% inhibición) se utilizó 150 μL medio de cultivo, 50 μL suspensión bacteriana y 50 μL etanol al 99%.

En el bioensayo se consideraron 8 repeticiones para cada una de las cepas de bacterias y se incubaron a 37°C por 24 h. Después, se adicionó 20 μL de 2,3,5-cloruro de tetrazolio (CTT) al 2% como indicador de metabolismo bacteriano, se incubó a 37°C , 110 rpm por 60 minutos. Se midió la absorbancia de los pozos en un lector de microplacas BioTek Sinergy 2 en modo de absorbancia a 600 nm, controlado por una interfaz de análisis de datos Gen5, a temperatura ambiente. Se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) con un diseño experimental de un factor (A=fitopatógeno y B= Extracto) para conocer cuál de los extractos (metanólico, hexánico y acetato de etilo) comparado con cada una de las

bacterias (Cmm, Pst y Xv) individualmente, tiene mayor actividad antimicrobiana. Posteriormente, se calculó el porcentaje de inhibición bacteriana mediante la Ecuación 4 y se graficó las concentraciones de extracto contra el porcentaje de inhibición bacteriana obteniendo así una ecuación de la recta mediante una regresión lineal.

$$\text{Inhibición bacteriana (\%)} = \frac{(Ac - Am)}{Ac} \times 100 \dots \dots \dots (4)$$

Ac es la absorbancia del control

Am es la absorbancia de la muestra.

Para conocer la absorbancia real de la inhibición bacteriana de los extractos, se midió y resto la absorbancia del medio de cultivo (200 µL) más extracto vegetal (50 µL) en ausencia de bacteria.

4.4.6 Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se prepararon diluciones seriadas de 750 a 3750 µL de extracto contra el porcentaje de inhibición bacteriana y se calculó una regresión lineal de los datos. Posteriormente la determinación de la CMI se obtuvo al 50% mediante la ecuación de regresión y se consideraron coeficientes de determinación (R^2) mayores a 0.91.

4.4.7 Análisis estadístico

Se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) en software Minitab® V.18 (Minitab, Satate Collage, PA, USA) sobre los factores establecidos en el diseño experimental, a saber: factor A (bacteria), factor B (extracto). Los niveles de cada uno de los factores fueron los siguientes: Para factor A (1= Cmm, 2= Pst, 3=Xv) mientras que para el factor B (1=extracto metanólico, 2=extracto hexánico y 3=extracto de acetato de etilo).

Para determinar el tipo de extracto con la mayor actividad antimicrobiana se aplicó un análisis de varianza de un factor para cada una de las bacterias y posteriormente se aplicó una prueba de Tukey.

4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El rendimiento de los extractos hexánico y de acetato de etilo fue de 0.07 % para ambos casos, mientras que el rendimiento del extracto metanólico fue del 2.5% del peso total. Los resultados de valor promedio de los extractos comparados con cada uno de los fitopatógenos se muestran en la Cuadro 6.

Cuadro 6 Prueba de medias de absorbancia de extractos de raíz de *Jatropha dioica* Seseé

Bacterias	Extractos		
	MeOH	Hexáno	AcEOt
Cmm	0.00 _c	1.8637 _a	0.854 _b
Pst	2.616 _a	0.6304 _b	2.291 _a
Xv	2.005 _a	1.839 _a	1.975 _a

Letras diferentes en una misma hilera indican diferencias estadísticas de acuerdo con la prueba de Tukey; $p \leq 0.05$, Cmm *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Pst *Pseudomonas syringe* pv. *tomato*, Vx *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Para Cmm, el análisis de varianza evidenció diferencias entre la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos ($p=0.00$), de acuerdo con la prueba de Tukey, el extracto hexánico muestra mayor actividad. Por otro lado, para Pst también se presentó diferencia estadística entre los extractos ($p=0.00$), en la prueba de Tukey, tanto para los extractos metanólicos como de acetato de etilo presentaron una mayor actividad antimicrobiana comparado con el extracto hexánico. En el caso de Xv, no hubo diferencia entre los tratamientos ($p=0.658$).

Los valores de CMI de los extractos expuestos a Cmm, Pst y Xv se muestran en el Cuadro 7. El extracto hexánico y de acetato de etilo, muestran actividad antimicrobiana contra las tres cepas evaluadas, no así para el extracto metanólico que sólo tuvo respuesta para Pst y Xv. La mejor respuesta antimicrobiana fue usando extracto hexánico contra Pst y Xv (0.5 y 1.7 respectivamente) y usando extracto acetato de etilo contra Cmm (2.0).

Cuadro 7 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de la actividad antimicrobiana de extractos vegetales de *Jatropha dioica* Seseé contra bacterias fitopatógenas expresado en $\mu\text{g mL}^{-1}$

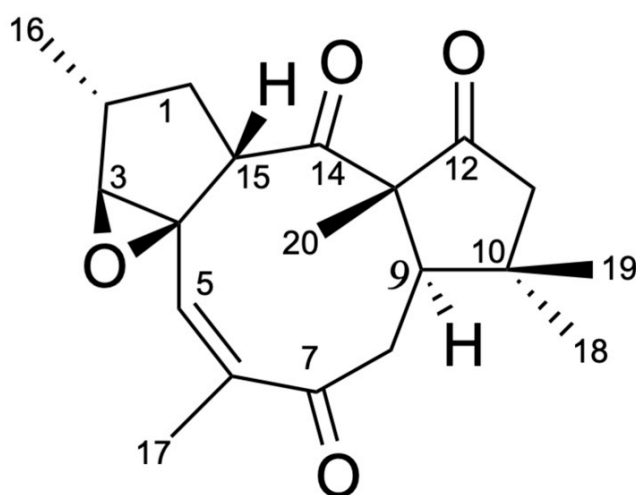
Extracto	CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	Cmm	Pst	Xv
MeOH	-	5.8	2.9
Hexano	4.4	0.5	1.7
AcOEt	2.0	3.5	2.3

- Sin actividad antimicrobiana, Cmm *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Pst *Pseudomonas syringe* pv. *tomato*, Vx *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Estudios antimicrobianos, revelan que el extracto metanólico de *J. dioica* tiene actividad antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Serrano-Gallardo *et al.*, 2017), *Porphyromonas gingivalis* (Waizel-Bucay y Martínez, 2011), *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi*, *Candida labicans* (Silva-Belmares *et al.*, 2014) y antiviral (Silva-Mares *et al.*, 2013); coincidiendo en la participación de terpenos, esteroides y metilesteroides como compuestos activos.

El extracto hexánico mostró la mayor efectividad antimicrobiana contra Pst y Xv con valores de CMI en 0.5 y $1.7 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. La efectividad del extracto es similar a la de estudios antivirales realizados previamente (Silva-Mares *et al.*, 2013) contra Herpes simplex HSV-1 y HSV-2. Por lo anterior, el extracto hexánico se analizó por cromatografía en columna utilizando 300 mL de *n*-hexano, acetato de etilo y metanol (tres volúmenes de cambio de 100 mL cada uno) de las cuales se obtuvieron 42 fracciones. En dichas fracciones se observaron cristales sólidos blanquecinos, mismos que se mezclaron y se identificó uno de ellos al compararlo en placa cromatográfica con una muestra auténtica de β -sitosterol. Otros metabolitos fueron observados en la mezcla mencionada y se repurificaron por cromatografía en columna, se aisló una sustancia cristalina de punto de fusión $201-203^{\circ}\text{C}$ identificada como citralitrona cuyo espectro de infrarrojo mostró bandas en 1746, 1692, 1446, 1388.5, 1347, 1276.6, 1229.5, 1156.9, 1038.7, 931.7, 895.2, 830.5, 571.3 y 494.8 cm^{-1} , además, en su espectro de resonancia magnética nuclear de ^{13}C se observaron 20 señales $\delta = 217$ (C-12), 215.3 (C-14), 208.2 (C-7), 145.4 (C-6), 128.2

(C-5), 77.2 (C-3), 67.5 (C-4), 65.6 (C-13), 55.4 (C-11), 52.8 (C-9), 46.5 (C-15), 37.9 (C-8), 37.5 (C-10), 34.8 (C-1), 33.7 (C-2), 28.2 (C-18), 23.6 (C-19), 20.4 (C-17), 16.0 (C-16) y 14.5 (C-20) ppm; éstos datos corresponden con la estructura molecular de este metabolito secundario (Melchor-Martínez *et al.*, 2017). Este diterpeno es característico de *J. dioica*, sin embargo, su actividad antimicrobiana no ha sido evaluada contra bacterias fitopatógenas de jitomate Cmm, Pst y Vx en el cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum*).



Esquema 2 Estructura molecular de citlalitriona

Cuadro 8 Concentración mínima inhibitoria de la actividad antimicrobiana de fracciones hexánicas de *Jatropha dioica* Seseé contra bacterias fitopatógenas expresado en $\mu\text{g mL}^{-1}$

Fracción	CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	Cmm	Pst	Xv
F1'	0.9	1.0	0.6
F2'	1.0	1.0	1.1
F3'	1.2	1.1	0.7

F1' agua madre hexano-acetato 8:2, F2' solido cristalino citlalitrona 8:2, F3' hexano-acetato 5:5, Cmm *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Pst *Pseudomonas syringe* pv. *tomato*, Vx *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Los resultados obtenidos sugieren que los extractos no son selectivos a bacterias gram negativo y positivo. La actividad antimicrobiana del extracto hexánico y del compuesto *citlaltiriona* puede ser atribuida a la presencia de terpenoides. Estos resultados dan soporte científico y abren la posibilidad para el uso de *J. dioica* en programas de biocontrol en cultivos dañados por fitopatógenos Cmm, Pst y Xv.

4.6 CONCLUSIONES

El extracto hexánico mostró mayor actividad antimicrobiana contra Pst y Xv y el extracto de acetato de etilo contra Cmm.

El extracto hexánico y el compuesto aislado *citlaltiriona* son una alternativa segura en la investigación de nuevos compuestos antimicrobianos, especialmente considerando las continuas mutaciones bacterianas que generan resistencia química en el control de enfermedades del cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum*).

4.7 AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de postgrado a JUPP, así como al Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Autónoma Chapingo por las facilidades y recomendaciones hechas durante la fase experimental.

4.8 REFERENCIAS

- Domínguez, X. A., Cano, G., Franco, R., Villarreal, A. M., Watson, W. H., Zabel, V. (1980). *Riolozatrione*, a new class of diterpene from *Jatropha dioica* var. *Sessiliflora*. *Phytochemistry*, 19(11), 2478. DOI:10.1016/s0031-9422(00)91059-8
- Handelsman, J., V.-Stabb, E. (1996). Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. *The Plant Cell*. 8 1855-1869. Consultado en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC161320/pdf/081855.pdf>
- Manzanero-Medina, G. I., Flores-Martínez, A., Sandoval-Zapotitla, E., Bye- Boettler, R. (2009). Etnobotánica de siete raíces medicinales en el Mercado de Sonora de la Ciudad de México. *Polibotánica*, 27: 191-228
- Martínez, N., Almaguer, G., Vásquez, P., Figueroa, A., Zúñiga, C., Hernández, A., (2014). Análisis fitoquímico de *Jatropha dioica* y determinación de su efecto antioxidante y quimioprotector sobre el potencial genotóxico de Ciclofosfamida, Daunorrubicina y Metilmetanosulfonato evaluado mediante el ensayo Cometa. *Bol. Latinoam. Caribe Plant Med. Aromat.* 13, 5
- Melchor-Martínez, E. M., Silva-Mares, D. A., Torres-López, E., Waksman-Minsky, N., Shao-NongChen, G. P., Niemitz, M., Sánchez-Castellanos, M., Toscano, A., Cuevas, G., Rivas-Galindo, V. (2017). Stereochemistry of a Second Riolozone and Other Diterpenoids from *Jatropha dioica*. *Journal of Natural Products*. 80, 2252–2262. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00193
- Reino, J. L., Guerrero, R. F., Hernández-Galán, R., Collado, I. G. (2007). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, 7(1), 89–123. DOI:10.1007/s11101-006-9032-2
- Serrano-Gallardo, L. B., Castillo-Maldonado I., Borjón-Ríos C. G., Rivera-Guillén M. A., Morán-Martínez J. ... Vega-Menchaca M. del C. (2017). Antimicrobial activity and toxicity of plants from northern Mexico. *Indian Journal of Tradicional Knowledge*. 16 (2) 203-207. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/lrais_Castillo_Maldonado/publication/322901

561_Antimicrobial_activity_and_toxicity_of_plants_from_northern_Mexico/links/5a74f3da45851541ce5663a4/Antimicrobial-activity-and-toxicity-of-plants-from-northern-Mexico.pdf

Silva-Belmares, Y., Rivas-Morales, C., Viveros-Valdez, E., de la Cruz-Galicia, M. G., Carranza-Rosales, P. (2014). Antimicrobial and Cytotoxic activities from *Jatropha dioica* Roots. *Pak. J. Biol. Sci.* 17(5), 478. Consultado en: <https://scialert.net/abstract/?doi=pjbs.2014.748.750>

Silva-Mares, D., Torres-López, E., Rivas-Estilla, A. M., Cordero-Pérez, P., Waksman-Minsky, N., Rivas-Galindo, V. M. (2013). Plants from Northeast Mexico with Anti-HSV Activity. *Natural Product Communications*, 8(3), 1934578X1300800. DOI:10.1177/1934578x1300800305

Villarreal, A. M., Domínguez, X. A., Williams, H. J., Scott, A. I., Reibenspies, J. (1988). *Citlaltirione*, a new diterpene from *Jatropha dioica* var. sessiliflora. *J. Nat. Prod.* 51 (4), 749e 753

Waizel-Bucay, J., Martínez, I. (2011). Algunas plantas usadas en México en padecimientos periodontales. *Revista Asociación Dental Mexicana*. 68(2): 73-88

5. DISCUSIÓN GENERAL

A pesar de que México cuenta con el 1.3% de la superficie terrestre del Planeta, es considerado como uno de los países con mayor biodiversidad. De acuerdo con Villaseñor (2016) en México existen: 297 familias, 73 órdenes, 2 854 géneros (7.8% (219) son endémicos), 23 314 especies, 22 126 angiospermas, 1 039 helechos y plantas a fines y 149 gimnospermas; sin considerar especies no vasculares. Estos datos son relevantes en la valoración de los recursos fitogenéticos y su clasificación por su grado de manejo, de las cuales en México solo son utilizadas 125 de las 23 314 especies contenidas en el territorio mexicano (Cuevas, comunicación personal).

Muchos de los conocimientos adquiridos por grupos indígenas relevantes al cuidado y manejo de plantas comestibles y medicinales han ido perdiendo interés debido al incremento progresivo de la llamada Frontera Agrícola, por lo que la erosión genética y la pérdida de biodiversidad mediante estas prácticas pone en riesgo a *Jatropha dioica* Seseé y otras especies vegetales endémicas de la región, así como a animales y otros *taxa* como hongos, bacterias y micorrizas.

El objetivo de este estudio fue generar datos útiles mediante el análisis de las características físicas del aceite de semillas y su transesterificación en ésteres metílicos de ácidos grasos para su posible uso como biocombustible, de la mano a estándares internacionales de la Unión Europea (EN 14214) para la producción de biodiésel, la norma (ASTM D 6751) para la producción de mezclas de biodiésel-diésel, incluso, para el uso del aceite como un biocombustible empleado directamente en máquinas de combustión inversa. Además, la evaluación del potencial antimicrobiano de extractos de raíz obtenidos de diferentes polaridades sometidos a prueba contra fitopatógenos comunes del cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum*) hará posible la postulación de *Jatropha dioica* Seseé, como un recurso potencialmente útil como bioenergéticos y para el control de plagas y enfermedades de cultivos de interés económico.

Steimann (2003) menciona que en México existen 48 especies endémicas y es posible que más especies de género *Jatropha* contengan características similares e incluso superiores a las que ya se ha estudiado como *Jatropha curcas* Mull. Arg., debido a su uso como recurso vegetal. Sin embargo, no existen suficientes investigaciones que cubran

otras especies silvestres o semidomesticadas. Por eso que es necesario realizar estudios relevantes a la cantidad y calidad de aceites presentes en semillas, grado de toxicidad, tipos de compuestos activos, entre otros, para comprender en mayor o menor medida el grado de domesticación que tienen dichas especies vegetales.

En la tarea conducente a proponer programas de conservación, clasificación, selección y dispersión de especies vegetales con potencial a ser un recurso fitogenético, es de vital importancia conocer y entender los factores culturales relacionados en la concepción de ésta como un elemento útil para la naturaleza.

6. CONCLUSIONES GENERALES

El análisis de las características físicas y el contenido de ésteres metílicos de ácidos grasos de aceite de semillas de *Jatropha dioica* Seseé fue útil en la determinación de la especie potencialmente útil en la producción de biocombustibles.

El efecto antimicrobiano de los extractos de diferentes polaridades y el compuesto *citalitriona* aplicados en fitopatógenos *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringe* pv. *tomato* y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, son una alternativa en el biocontrol del cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum*).

La población de *Jatropha dioica* Seseé natural existente en San José Iturbide, Guanajuato, es considerada como un recurso fitogenético.

7. CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achicanoy-López, H. (2001). Estrategias integradas para el control de enfermedades de las plantas. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 54(1 y 2), 1251-1273. Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/24365>
- Achten, W. M. J., Maes, W. H., Aerts, R., Verchot, L., Trabucco, A., Mathijs, E. and Muys, B. (2010). *Jatropha*: From global hype to local opportunity. *Journal of Arid Environments*, 74: 164–165. DOI:10.1016/j.jaridenv.2009.08.010
- Adebawale, K. O., Adedire, C. O. (2006) Chemical composition and insecticidal properties of the underutilized *Jatropha curcas* seed oil. *Afr J Biotechnol* 5:901 – 906. Disponible en: http://www.academicjournals.org/app/webroot/article/article1379780991_Adebawale%20and%20Adedire.pdf
- Akbar, E., Yaakob, Z., Kamarudin, S. K., Ismail, M., Salimon, J. (2009). Characteristic and composition of *Jatropha curcas* oil seed from Malaysia and its potential as biodiesel feedstock. *Eur J Sci Res* 29: 396–403. Disponible en: https://www.doc-developpement-durable.org/file/Huiles-vegetales-noix/Fiches_plantes/jatropha/Characteristic%20and%20Composition%20of%20Jatropha%20Curcas%20Oil%20Seed_Malaysia.pdf
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J. Y., Wakabayashi, H., Oyaizu, H. (2000). Phylogenetic affiliation of the *pseudomonads* based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(4), 1563–1589. doi:10.1099/00207713-50-4-1563
- Bahadur, B., Sujatha, M., Carels, N. (2013). *Jatropha, Challenges for a New Energy Crop*. Volume 2. *Genetic Improvement and Biotechnology*. New York, Springer
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibensouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005

- Betancur-Prisco, J. C., Mira-Hernández, C., París-Londoño, L. S. (2014). Physical and mechanical properties of *Jatropha curcas* seed grown up in Colombia. *Revista de La Facultad de Ingeniería*, Universidad de Antioquia Nicaragua, 73, 187–199. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-62302014000400018&script=sci_arttext&tlng=en
- Berchmans, H. J., Hirata, S. (2008). Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids. *Bioresource Technology*, 99(6), 1716–1721. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.03.051>
- Bozbas, K. (2008). Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 12(2), 542–552. DOI:10.1016/j.rser.2005.06.001
- Camps, M., Marcos, M. (2008). Los biocombustibles. Madrid: Ediciones Mundi Prensa
- CLSI, (2012). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard, 7th ed., CLSI document M02-A11. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA
- Díaz, S. Á. A. (2011). Determinación de la factibilidad técnica y económica del cultivo de *Jatropha curcas* L. en una área de la zona citrícola de Nuevo León, México. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
- Domínguez, X. A., Cano, G., Franco, R., Villarreal, A. M., Watson, W. H., Zabel, V. (1980). *Riolozatrione*, a new class of diterpene from *Jatropha dioica* var. *Sessiliflora*. *Phytochemistry*, 19(11), 2478. DOI:10.1016/s0031-9422(00)91059-8
- Dreier, J., Bermpohl, A., Eichenlaub, R. (1995). Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*. 85:462- 468
- Dreier, J., Meletzus, D., Eichenlaub, R. (1997). Characterization of the plasmid encoded virulence region pat-1 of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Mol. Plant Microbe Intelect*. (102):195-206

- Eichenlaub, R. Gartemann K. H. (2011). The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens. Department of Genetechnology, Microbiology, Faculty of Biology, University of Bielefeld, Germany. Annu. Rev. Phytopathol. 49:445-464
- Franken, A. A. J. M., Kamminga, G. C., Snijders, W., Van Der Zouwen, P. S., Birnbaun, Y. E. (1993). Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds by immunofluorescence microscopy and dilution plate. Neth. J. Plant Pathol. 99(3):125-137
- Fresnedo-Ramírez, J., Orozco-Ramírez, Q. (2012). Diversity and distribution of genus *Jatropha* in Mexico. Genetic Resources and Crop Evolution, 60(3), 1087–1104. DOI:10.1007/s10722-012-9906-7
- García M., E. (1981). Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen. UNAM. México D.F. 243 p
- Ganesh-Ram, S., Parthiban, K. T., Senthil Kumar, R., Thiruvengadam, V., Paramathma, M. (2008). Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 55: 803-809. DOI:10.1007/s10722-007-9285-7
- Gomez-Lopez, A., Aberkane, A., Petrikkou, E., Mellado, E., Rodriguez-Tudela, J. L., Cuenca-Estrella, M. (2005). Analysis of the influence of tween concentration, inoculum size, assay medium, and reading time on susceptibility testing of *Aspergillus* spp, J. Clin. Microbiol. 43 (2005) 1251–1255
- Goytia-Jiménez, M. A., Gallegos-Goytia, C. H. and Nuñez-Colín, C. A. (2010). Relationship Among Climatic, Variables with the Morphology and Oil Content of Castor Oil Plant (*Ricinus communis* L.) Seeds from Chiapas. Revista Chapingo Serie Forestales y del Ambiente. 17(1): 41-48. DOI:10.5154/r.rchscfa.2010.08.048
- Hammond, E.W. (1993). Chromatography for the Analysis of Lipids. CRC Press, Boca Raton, pp. 81 – 85. Consultada en: <https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=dcYeQ8RZiZ0C&oi=fnd&pg=P>

A1&dq=Hammond+E.W.,+(1993).+Chromatography+for+the+Analysis+of+Lipids.&ots=eMT4v-vF93&sig=Zfyx_z3hGnGeyzxF1z7hlcG3ZOw#v=onepage&q=Hammond%20E.W.%2C%20(1993).%20Chromatography%20for%20the%20Analysis%20of%20Lipids.&f=false

Handelsman, J., V.-Stabb, E. (1996). Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. *The Plant Cell*. 8 1855-1869. Consultado en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC161320/pdf/081855.pdf>

Hausdorfer, J., Sompek, E., Allerberger, F. (1988). E-test for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*, *Int. J. Tuberc. Ung Dis.* 2, 751-755

Hoekman, S. K., Broch, a., Robbins, C., Cisneros, E., Natarajan, M. (2012). Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 143-169

Jiménez-Ramírez, J., Martínez, G. M. (1994). Descripción de *Jatropha andrieuxii* Muell. Arg. (euphorbiaceae), una especie endémica del sur de México. *Acta Botánica Mexicana*, 26: 27-32

Jorgensen, J. H., Ferraro, M, J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin. Infect. Disc.* 49 1749-1755

Knothe, G. (2010). Biodiesel and renewable diesel: a comparison. *Progress in Energy and Combustion Science*, 36(3), 364-373. DOI:10.1016/j.pecs.2009.11.00

Macías-Macías, A. (2003). Enclaves agrícolas modernos: el caso del jitomate mexicano en los mercados internacionales. *Región y sociedad*, 15(26), 104-151. Recuperado en 20 de mayo de 2019, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-39252003000100004&lng=es&tlng=es

- Manzanero-Medina, G. I., Flores-Martínez, A., Sandoval-Zapotitla, E., Bye- Boettler, R. (2009). Etnobotánica de siete raíces medicinales en el Mercado de Sonora de la Ciudad de México. *Polibotánica*, 27: 191-228
- Marchetti, J. M., & Errazu, A. F. (2008). Esterification of free fatty acids using sulfuric acid as catalyst in the presence of triglycerides. *Biomass and Bioenergy*, 32(9), 892–895. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2008.01.001>
- Martínez, N., Almaguer, G., Vásquez, P., Figueroa, A., Zúñiga, C., Hernández, A., (2014). Análisis fitoquímico de *Jatropha dioica* y determinación de su efecto antioxidante y quimioprotector sobre el potencial genotóxico de Ciclofosfamida, Daunorrubicina y Metilmetanosulfonato evaluado mediante el ensayo Cometa. *Bol. Latinoam. Caribe Plant Med. Aromat.* 13, 5
- Melchor-Martínez, E. M., Silva-Mares, D. A., Torres-López, E., Waksman-Minsky, N., Shao-NongChen, G. P., Niemitz, M., Sánchez-Castellanos, M., Toscano, A., Cuevas, G., Rivas-Galindo, V. (2017). Stereochemistry of a Second Riolozone and Other Diterpenoids from *Jatropha dioica*. *Journal of Natural Products*. 80, 2252–2262. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00193
- Milijašević, S., Todorović, B., Rekanović, E., Potoćnik, I., Gavrilović, V. (2009). Races and Hosts of *Pseudomonas syringae* pv *tomato* in Serbia. *Arch. Biol.Sci. Belgrade* 60 (1), 93-102. DOI: 10.2298/ABS0901093M
- Minitab 18 Statistical Software (2018). [Comuter Software]. State Collage, PA: Minitab, Inc.
- Mosquera A., J. D., Vasco L., J. F., Acosta O., A. A., Hernández R., I., Ventura R., E., Gutiérrez C., E., Rodríguez G., M. (2016). Optimization of castor seed oil extraction process using response surface methodology. *Ingeniería e Investigación*. 36(3):82-88. DOI:10.15446/ing.investig.v36n3.55632
- Pinzi, S., Garcia, I. L., Lopez-Gimenez, F. J., Luque De Castro, M. D., Dorado, G., Dorado, M. P. (2009). The Ideal Vegetable Oil-based Biodiesel Composition: A Review of Social, Economical and Technical Implications. *Energy & Fuels*, 23(5), 2325–2341. DOI:10.1021/ef801098a

- Porras, F., Madrid, J. L. C., Romero, M. V., Peña, P. S., España, R. G. L., Terrazas, S. P., Verdugo, S. H. (2008). Variación fenotípica entre y dentro de poblaciones silvestres de chile del noroeste de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, pp. 31
- Pradhan, S., Naik, S. N., Khan, M. A. I. and Sahoo, P. (2011). Experimental assessment of toxic phytochemicals in *Jatropha curcas*: oil, cake, bio-diesel and glycerol. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, 92(3), 511–519. DOI:10.1002/Jsfa.4599
- Pramanik, K. (2003). Properties and use of *Jatropha curcas* oil and diesel fuel blends in compression ignition engine. *Fuel and Energy Abstracts*, 44(3), 170. DOI:10.1016/s0140-6701(03)81907-0
- Prasad, L., Pradhan, S., Das, L. M., Naik, S. N. (2012). Experimental assessment of toxic phorbol ester in oil, biodiesel and seed cake of *Jatropha curcas* and use of biodiesel in diesel engine. *Applied Energy*, 93, 245–250. DOI:10.1016/j.apenergy.2011.11.076
- Ramírez, V., Sáinz, R. (2006). Enfermedades fungosas aéreas. En: Manejo integrado del tomate. Ramírez, v. J., Sáinz, R. R. A. Primera edición. México. pp 152-156
- Reino, J. L., Guerrero, R. F., Hernández-Galán, R., Collado, I. G. (2007). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, 7(1), 89–123. DOI:10.1007/s11101-006-9032-2
- Reyes-Trejo, B., Guerra-Ramírez, D., Zuleta-Prada, H., Cuevas-Sánchez, J. A., Reyes, L., Reyes-Chumacero, A., Rodríguez-Salazar, J. A. (2014). *Annona diversifolia* seed oil as a promising non-edible feedstock for biodiesel production. *Industrial Crops and Products*, 52, 400–404. DOI:10.1016/j.indcrop.2013.11.005
- Riley, I. T. (1987). Serological relationships between strains of coryneform bacteria responsible for annual ryegrass toxicity and other plants pathogenic corynebacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:153-159
- Sánchez-del Castillo, F., Moreno-Pérez, E. del C., Cruz-Arellanes, E. L.. (2009). Producción de jitomate hidropónico bajo invernadero en un sistema de dosel en

- forma de escalera. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 15(1), 67-73. Recuperado en 20 de mayo de 2019, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2009000100010&lng=es&tlng=es
- Scholz-Schroeder, B. K., Soule, J. D., Lu, S.-E., Grgurina, I., Gross, D. C. (2001). A Physical Map of the Syringomycin and Syringopeptin Gene Clusters Localized to an Approximately 145-kb DNA Region of *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* Strain B301D. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(12), 1426–1435. doi:10.1094/mpmi.2001.14.12.1426
- SENER. (2008). Prospectiva del mercado del Petróleo crudo 2008-2017. Secretaría de Energía
- SENER. (2013). Estadísticas destacadas del sector energético, junio 2013. Consultado en: <http://www.gob.mx/sener/documentos/pronutario-del-sector-energetico>
- Serrano-Gallardo, L. B., Castillo-Maldonado I., Borjón-Ríos C. G., Rivera-Guillén M. A., Morán-Martínez J. Vega-Menchaca M. del C. (2017). Antimicrobial activity and toxicity of plants from northern Mexico. *Indian Journal of Tradicional Knowledge*. 16 (2) 203-207. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Irais_Castillo_Maldonado/publication/322901561_Antimicrobial_activity_and_toxicity_of_plants_from_northern_Mexico/links/5a74f3da45851541ce5663a4/Antimicrobial-activity-and-toxicity-of-plants-from-northern-Mexico.pdf
- SIAP, (2019). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Consultada en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Sharma, H. K., Shukla, A., Kumar, A., Shukla, A., Choudhary, S. B., Jatothu, J. L. (2013). Variability and genetic diversity assessment in physic nut (*Jatropha curcas* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 7: 2380-2391. DOI: 10.5897/JMPR12.1164
- Silva-Belmares, Y., Rivas-Morales, C., Viveros-Valdez, E., de la Cruz-Galicia, M. G., Carranza-Rosales, P. (2014). Antimicrobial and Cytotoxic activities from *Jatropha*

- dioica* Roots. *Pak. J. Biol. Sci.* 17(5), 478. Consultado en: <https://scialert.net/abstract/?doi=pjbs.2014.748.750>
- Silva-Mares, D., Torres-López, E., Rivas-Estilla, A. M., Cordero-Pérez, P., Waksman-Minsky, N., Rivas-Galindo, V. M. (2013). Plants from Northeast Mexico with Anti-HSV Activity. *Natural Product Communications*, 8(3), 1934578X1300800. DOI:10.1177/1934578x1300800305
- Solomon-Raju, A. J., Ezradanam, B. (2002). Flowering phenology and sexual system in *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). *Proc. AP Acad. Sci.*, pp. 203-206
- Steinmann, W. V. (2003). Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. *Acta Botánica Mexicana*. 61: 61-93. DOI. org/10.21829/abm61.2002.909
- SRE. (2013). México : País Megadiverso. NOTISEM, p. 2013. DF, México. Consultado en: <https://embamex.sre.gob.mx/dinamarca/images/pdf/meganota.pdf>
- Syamsuddin, Y., Murat, M. N., Hameed, B. H. (2016). Synthesis of fatty acid methyl ester from the transesterification of high- and low-acid-content crude palm oil (*Elaeis guineensis*) and karanj oil (*Pongamia pinnata*) over a calcium–lanthanum–aluminum mixed-oxides catalyst. *Bioresource Technology*, 214, 248–252. DOI:10.1016/j.biortech.2016.04.083
- The Plant List. 2019. Version 1. Consultada en: <http://www.theplantlist.org/>. [Última consulta: 09 de abril de 2019]
- Vera-Castillo, Y. B., Pritchard, H. W., Frija, Chellattan-Veetil, A. P., Cuevas-Sanchez J. A. Van Damme, P. P., Van-Huylenbroeck, G. (2014). Production viability and farmers' willingness to adopt *Jatropha curcas* L.as a biofuel source in traditional agroecosystems in Totonacapan, Mexico. *Agricultural Systems* 125, 42-49. DOI:10.1016/j.agsy.2013.12.003
- Villarreal, A. M., Domínguez, X. A., Williams, H. J., Scott, A. I., Reibenspies, J. (1988). *Citlaltirione*, a new diterpene from *Jatropha dioica* var. sessiliflora. *J. Nat. Prod.* 51 (4), 749e 753

- Villaseñor, J. L., (2016). Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 87 (2016) 559–902
- Waizel-Bucay, J., Martínez, I. (2011). Algunas plantas usadas en México en padecimientos periodontales. *Revista Asociación Dental Mexicana*. 68(2): 73-88
- Watson, L., Dallwitz, M. J. (1991). The families of angiosperms: automated descriptions, with interactive identification and information retrieval. *Australian Systematic Botany*, 4: 681-695
- Wong-Paz, J. E., Castillo-Inungary, M. L., López-López, L. I., Contreras-Esquivel, J. C., Nevárez-Moorillon, V., Aguilar, C. N. *Jatropha dioica*: Fuente potencial de agentes antimicrobianos. *AQM* 2010;2(4). Consultado en: https://www.researchgate.net/profile/Jorge_Wong-Paz/publication/237092367_Jatropha_dioica_FUENTE_POTENCIAL_DE_AGENTES_ANTIMICROBIANOS/links/00b7d51b7ef7ecd42f000000/Jatropha-dioica-FUENTE-POTENCIAL-DE-AGENTES-ANTIMICROBIANOS.pdf
- Ye, J., Hong, Y., Qu, J., Wang, C. (2013). Improvement of J. curcas Oil by Genetics Transformation. En Bahadur, Bir., et al., (Ed). *Jatropha*, Challenges for a New Energy Crop. Volume 2. *Genetic Improvement and Biotechnology*. (pp 547-562), New York, Springer

8. ANEXOS

8.1 Salida data Minitab

8.1.1 Para *Clavibacter michiganensis* subesp. *michiganensis*

ANOVA unidireccional: Absorbancia vs. Tratamiento

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamiento	3	1, 2, 3

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	2	69.63	34.8131	195.62	0.000
Error	117	20.82	0.1780		
Total	119	90.45			

Resumen del modelo

	R-cuad.	R-cuad.
S	R-cuad. (ajustado)	(pred)
0.421857	76.98%	76.59% 75.78%

Medias

Tratamiento	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1	40	0.000000	0.000000	(-0.132099, 0.132099)
2	40	1.8637	0.2789	(1.7316, 1.9957)
3	40	0.854	0.675	(0.722, 0.986)

Desv.Est. agrupada = 0.421857

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
2	40	1.8637	A
3	40	0.854	B
1	40	0.000000	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

8.1.2 Para *Pseudomonas siringe* pv *tomato*

ANOVA unidireccional: Absorbancia vs. Tratamiento

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
 Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamiento	3	AcOEt, Hexano, MeOH

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	2	90.76	45.3823	98.49	0.000
Error	117	53.91	0.4608		
Total	119	144.68			

Resumen del modelo

	R-cuad.	R-cuad.
S	R-cuad. (ajustado)	(pred)
0.678823	62.74%	62.10% 60.80%

Medias

Tratamiento	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
-------------	---	-------	-----------	-----------

AcOEt	40	2.291	0.832 (2.078, 2.503)
Hexano	40	0.6304	0.1960 (0.4178, 0.8429)
MeOH	40	2.616	0.807 (2.404, 2.829)

Desv.Est. agrupada = 0.678823

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
MeOH	40	2.616	A
AcOEt	40	2.291	A
Hexano	40	0.6304	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

8.1.3 Para *Xanthomonas campestris* pv *vesictoria*

ANOVA unidireccional: Absorbancia vs. Tratamiento

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamiento	3	AcOEt, Hexano, MeOH

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	2	0.6273	0.3136	0.42	0.658
Error	117	87.2067	0.7454		
Total	119	87.8340			

Resumen del modelo

R-cuad. R-cuad.

S R-cuad. (ajustado) (pred)
 0.863340 0.71% 0.00% 0.00%

Medias

Tratamiento	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
AcOEt	40	1.975	0.701	(1.705, 2.245)
Hexano	40	1.839	0.770	(1.568, 2.109)
MeOH	40	2.005	1.074	(1.734, 2.275)

Desv.Est. agrupada = 0.863340

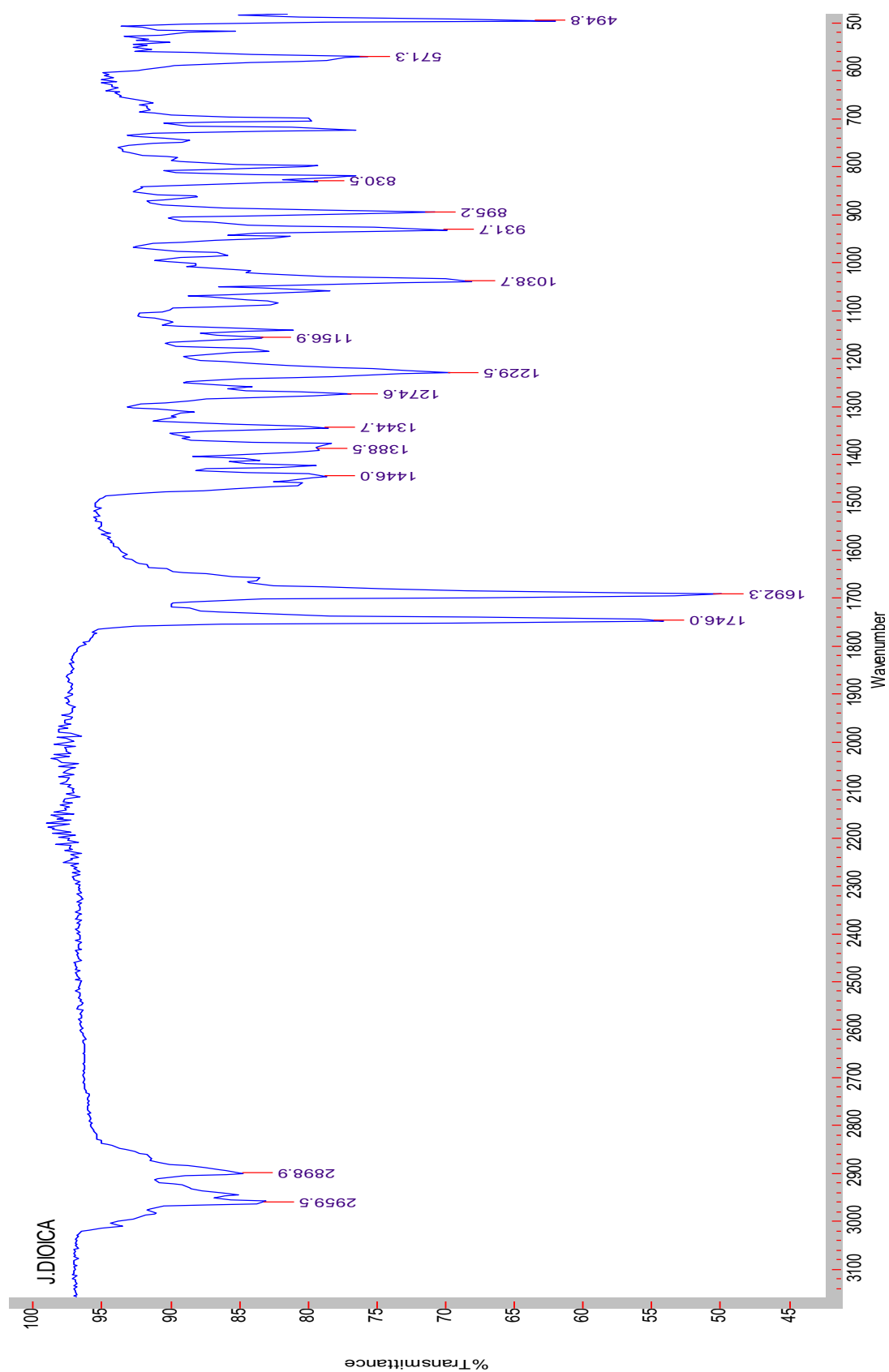
Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

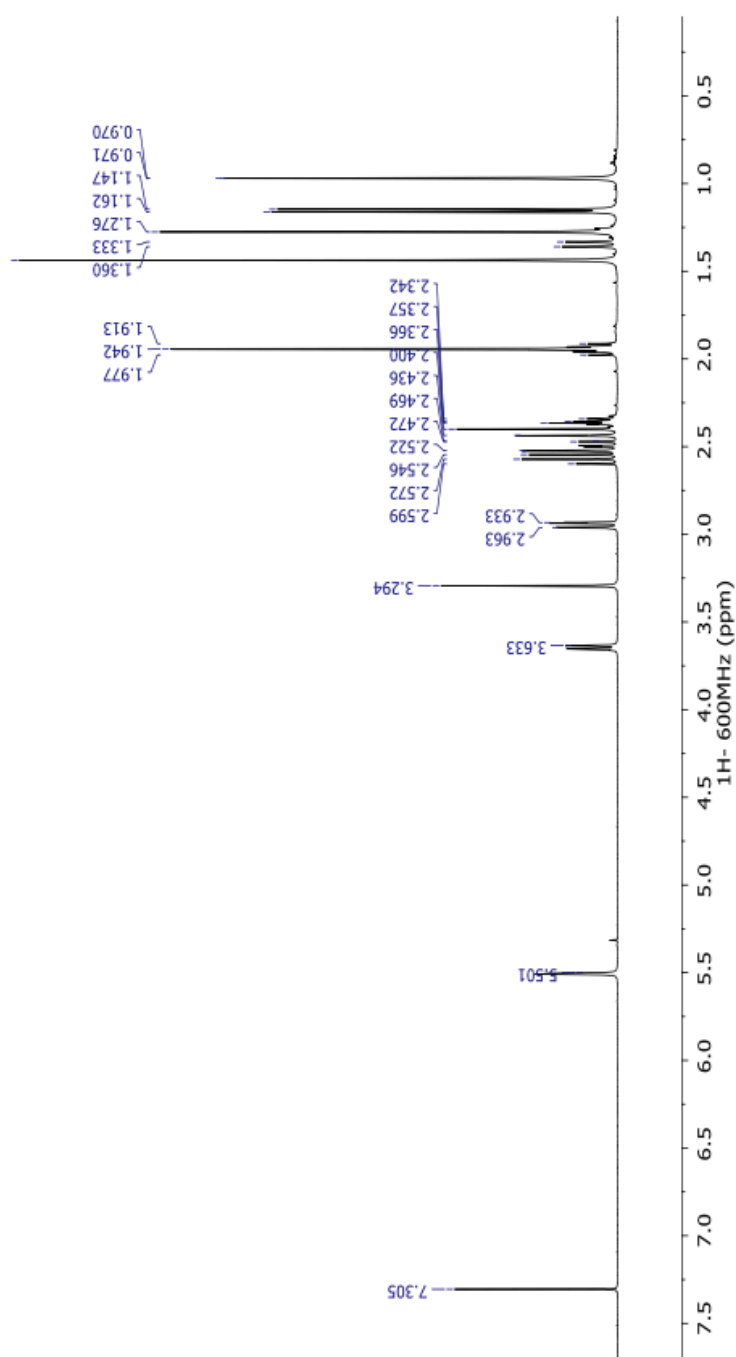
Tratamiento	N	Media	Agrupación
MeOH	40	2.005	A
AcOEt	40	1.975	A
Hexano	40	1.839	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

8.2 Espectro Infrarrojo del compuesto citlalitriona

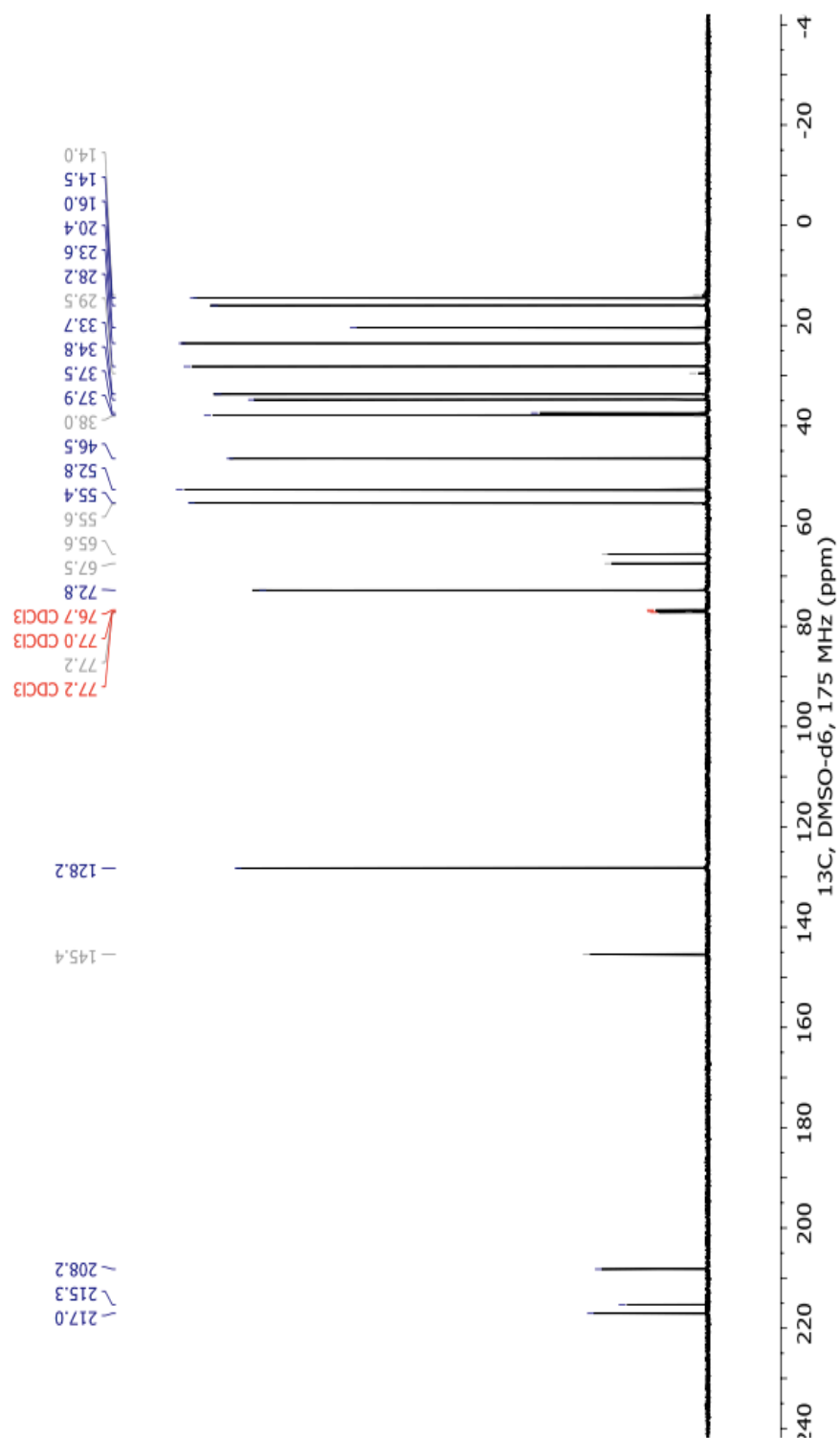


8.3 Espectro RMN ^1H



^1H NMR (Chloroform- d , 500 MHz) δ 7.31 (1H, s), 5.51 (4H, d, $J=1.8$ Hz), 3.67 – 3.62 (4H, m), 3.29 (4H, s), 2.96 (2H, d, $J=2.0$ Hz), 2.94 (2H, d, $J=2.0$ Hz), 2.60 (1H, s), 2.56 (3H, d, $J=13.0$ Hz), 2.52 (3H, d, $J=2.0$ Hz), 2.44 (3H, d, $J=0.9$ Hz), 2.50 (1H, d, $J=2.0$ Hz), 2.47 (1H, q, $J=0.8$ Hz), 2.40 (3H, s), 2.38 – 2.32 (5H, m), 1.94 (11H, d, $J=1.7$ Hz), 1.44 (12H, s), 1.35 (4H, dt, $J=13.7, 1.6$ Hz), 1.28 (12H, s), 1.15 (12H, d, $J=7.5$ Hz), 0.97 (12H, s)

8.4 Espectro RMN ^{13}C



^{13}C NMR (CDCl₃, 126 MHz) δ 14.5, 16.0, 20.4, 23.6, 28.2, 33.7, 34.8, 37.5, 37.9, 46.5, 52.8, 55.4, 65.6, 67.5, 77.2, 128.2, 145.4, 208.2, 215.3, 217.0