



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

**CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO ETNOBOTÁNICO DE TRES
ESPECIES SILVESTRES DE *Jatropha* spp. EN MÉXICO;
ANÁLISIS MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN DEL
ACEITE DE SUS SEMILLAS**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Presenta:

OSCAR DANIEL BARRERA SÁNCHEZ



Bajo la dirección del: Dr. Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez

Chapingo, Estado de México, junio de 2017



Instituto de Horticultura

**CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO ETNOBOTÁNICO DE TRES ESPECIES
SILVESTRES DE *Jatropha* spp. EN MÉXICO; ANÁLISIS MOLECULAR Y
CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE DE SUS SEMILLAS**

Tesis realizada por **Oscar Daniel Barrera Sánchez** bajo la dirección del comité
indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el
grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESIDENTE:



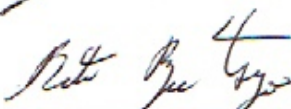
DR. JESÚS AXAYACATL CUEVAS SÁNCHEZ

ASESOR:



DR. BALDOMERO ALARCÓN ZUÑIGA

ASESOR:



DR. BENITO REYES TREJO

ASESOR:



DR. JAIME SAHAGÚN CASTELLANOS

LECTOR EXTERNO:



DRA. DIANA GUERRA RAMÍREZ

CONTENIDO

CONTENIDO.....	iii
LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
DATOS BIOGRÁFICOS.....	vii
RESUMEN GENERAL	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVOS	4
Objetivo General	4
Objetivos Particulares	4
LITERATURA CITADA	5
CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA	6
1.1 Generalidades de las especies estudiadas	7
1.2 <i>Jatropha neopauciflora</i>	9
1.2.1 Descripción Botánica	10
1.3 <i>Jatropha rzedowskii</i>	11
1.3.1 Descripción Botánica	11
1.4 <i>Jatropha pseudocurcas</i>	12
1.4.1 Descripción Botánica	13
1.5 Distribución y medio ecológico.....	13
LITERATURA CITADA	15
CAPITULO II. CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE DE DOS ESPECIES SILVESTRES DE <i>Jatropha</i> spp. ENDÉMICAS DE MÉXICO.....	18
RESUMEN	18
ABSTRACT	19
2.1 Introducción	20

2.2 Materiales y Métodos	22
2.2.1 Lugar de colecta del material.....	22
2.2.2 Caracterización física de las semillas.....	22
2.2.3 Prueba de emergencia.....	22
2.2.4 Extracción del aceite	23
2.2.5 Obtención de biodiésel mediante transesterificación	23
2.2.6 Determinación del perfil de ácidos grasos	24
2.2.7 Determinación de la viscosidad dinámica, viscosidad cinética y densidad a diferentes temperaturas	24
2.2.8 Calor de combustión	24
2.2.9 Determinación de presencia de ésteres de forbol	25
2.3 Resultados y discusión.....	26
2.3.1 Caracterización física de las semillas.....	26
2.3.2 Prueba de emergencia.....	27
2.3.4 Determinación del perfil de ácidos grasos	28
2.3.5 Determinación de la viscosidad dinámica, viscosidad cinética y densidad a diferentes temperaturas	29
2.3.6 Calor de combustión	31
2.3.7 Contenido de ésteres de forbol	32
2.4 Conclusiones	32
2.5 Literatura citada.....	33
CAPÍTULO III. EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF SEEDS OIL FROM <i>Jatropha rzedowskii</i> AND <i>Jatropha pseudocurcas</i>, TWO MEXICAN SPECIES AS POTENTIAL BIOFUEL RESOURCE	36
ABSTRACT	36
3.1 Introduction.....	37
3.2 Materials and Methods	38
3.2.1 Materials.....	38
3.2.2 Oil extraction.....	38
3.2.3 Transesterification	39
3.2.4 Fatty acid methyl ester analysis	39

3.2.5 Oil and biodiesel properties.....	40
3.3 Results and Discussion	40
3.3.1 Oil properties of <i>Jatropha rzedowskii</i> and <i>Jatropha pseudocurcas</i>	40
3.3.2 Fatty acid composition	43
3.3.3 Biodiesel properties of <i>Jatropha rzedowskii</i> and <i>Jatropha pseudocurcas</i>	44
3.4. Conclusions	47
3.5. Acknowledgements	47
3.6. References	48
CAPÍTULO IV. DIVERSIDAD GENÉTICA DE TRES ESPECIES ENDÉMICAS DE <i>Jatropha</i>. spp. EN MEXICO MEDIANTE EL USO DE MARCADORES AFLP	50
RESUMEN	50
ABSTRACT	51
4.1 Introducción	52
4.2 Materiales y Métodos	53
4.2.1 Material vegetal.....	53
4.2.2 Extracción de ADN	54
4.2.3 Análisis molecular.....	54
4.2.4 Análisis estadístico	55
4.3 Resultados y Discusión	56
4.3.1 Análisis de Coordenadas Principales	58
4.4 Conclusiones	60
4.5 Literatura Consultada.....	61

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Comparación de tamaños de semillas con testa de cuatro especies de <i>Jatropha</i> endémicas de México.	26
Cuadro 2. Emergencia de semillas de tres especies de <i>Jatropha</i>	27
Cuadro 3. Perfil de ácidos grasos de especies de <i>Jatropha</i>	28
Chart 4. Properties of <i>J. rzedowskii</i> and <i>J. pseudocurcas</i> oil in comparison with other oils	42
Chart 5. Properties of <i>Jatropha rzedowskii</i> and <i>J. pseudocurcas</i> biodiesel in comparison with other oil.	43
Chart 6. Fatty acid methyl esters composition (%) of <i>J. rzedowskii</i> and <i>J. pseudocurcas</i> oil.	43
Chart 7. Density, viscosity and gross heating value for <i>Jatropha pseudocurcas</i> mixed in different percentages with diesel.	45
Chart 8. Density, viscosity and gross heating value for <i>Jatropha rzedowskii</i> mixed in different percentages with diesel.	46
Cuadro 9. Número de alelos efectivos, número y porcentaje de loci polimórficos de tres especies de <i>Jatropha</i>	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Jatropha neopauciflora</i> en Valle de Cuicatlán	11
Figura 2. <i>Jatropha rzedowskii</i> en Valle de Cuicatlán.....	12
Figura 3. <i>Jatropha pseudocurcas</i> en Huajolotitlán, Oaxaca	13
Figura 4. <i>Jatropha neopauciflora</i> y <i>J. rzedowskii</i> creciendo juntas en el Valle de Cuicatlán	14
Figura 5. Viscosidad cinemática <i>J. rzedowskii</i>	29
Figura 6. Viscosidad cinemática <i>J. pseudocurcas</i>	29
Figura 7. Viscosidad dinámica de <i>J. rzedowskii</i>	29
Figura 8. Viscosidad dinámica de <i>J. pseudocurcas</i>	29
Figura 9. Densidad de <i>J. rzedowskii</i>	30
Figura 10. Densidad de <i>J. pseudocurcas</i>	30
Figura 11. Calor de combustión de mezclas biodiésel de <i>J. rzedowskii</i> con diésel comercial.....	31
Figura 12. Calor de combustión de mezclas biodiésel de <i>J. pseudocurcas</i> con diésel comercial.....	31
Figure 13. Nuclear Magnetic Resonance spectrum of <i>Jatropha rzedowskii</i> seeds oil at 400 MHz (CDCl ₃ , TMS)	41
Figure 14. Nuclear Magnetic Resonance spectrum of <i>Jatropha pseudocurcas</i> seeds oil at 400 MHz (CDCl ₃ , TMS)	41
Figure 15. Nuclear Magnetic Resonance spectrum of <i>Jatropha rzedowskii</i> biodiesel at 400 MHz (CDCl ₃ , TMS)	45
Figure 16. Nuclear Magnetic Resonance spectrum of <i>Jatropha pseudocurcas</i> biodiesel at 400 MHz (CDCl ₃ , TMS)	45
Figura 17. Dendograma de similitud de Dice de tres especies del género <i>Jatropha</i> , donde A: <i>J. rzedowskii</i> , B: <i>J. neopauciflora</i> y C: <i>J. pseudocurcas</i>	57
Figura 18. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) de tres especies de <i>Jatropha</i> , donde A: <i>J. rzedowskii</i> , B: <i>J. neopauciflora</i> y C: <i>J. pseudocurcas</i>	59

DEDICATORIA

Al pueblo de México, la Universidad Autónoma Chapingo, porque con los impuestos y la fe puesta en nosotros, hacen posible que personas como yo, puedan estudiar y prepararse para una mejor calidad de vida, tanto personal como de todos aquellos en los que podamos incidir.

A mi familia, mi madre Celia Barrera, mis hermanas; Jimena y Jennifer, mis abuelos Donaciano y Carlota, a mi tía Josefina y su familia, mi novia María, a todos aquellos que creyeron en mi desde el inicio de esta etapa de mi vida y que de alguna manera padecieron mi ausencia en los momentos importantes que no estuve presente, pero que nunca dejaron de apoyarme en cada idea y cada proyecto.

A mis amigos, compañeros y aquellas personas que me dieron palabras de aliento y ánimo de seguir, incluso cuando más cansado estuve de todas aquellas cosas que decidí emprender durante este tiempo.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por la beca otorgada sin la cual no hubiera sido posible continuar con mi formación profesional.

A la **Universidad Autónoma Chapingo**, por haberme formado de manera integral no solo como profesional sino como persona.

Al **Dr. Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez**, quien desde que nos conocemos me ha enseñado filosofía de vida con el ejemplo y me ha guiado en el camino durante mi formación profesional, brindándome los conocimientos y valores necesarios para ejercer con responsabilidad, humildad y profesionalismo.

A mi comité asesor, los doctores **Baldomero Alarcón, Benito Reyes, Jaime Sahagún**, la **Dra. Diana Guerra** y el **Dr. Holber Zuleta**, así como la M. En C. **Anallely Yerena** y la M. En C. **Itzel Villegas**, quienes siempre me apoyaron y facilitaron todo lo posible para poder desarrollar mi investigación de tesis, así como por las enseñanzas transmitidas durante mi formación profesional.

A **Martín López y Héctor Cervantes** quienes nos apoyaron incondicionalmente para las colectas de plantas y semillas con las que pudimos realizar esta investigación.

A la comunidad de Coxcatlán por permitirnos el paso a la reserva de la Biosfera para las colectas y por su hospitalidad.

DATOS BIOGRÁFICOS



Oscar Daniel Barrera Sánchez nació en la comunidad de San Miguel Coatlinchan, municipio de Texcoco en el Estado de México, donde estudio hasta la secundaria. En el municipio de Texcoco estudió en la Preparatoria Oficial Número 100 y se graduó de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia, en la Universidad Autónoma Chapingo.

En la misma universidad, cursó la Maestría en Ciencias en Protección Vegetal y el Doctorado en Ciencias en Horticultura. Inició su carrera laboral en México en la conservación de recursos fitogenéticos. Sin embargo, la mayor parte la desarrolló en la República de Panamá como especialista en agricultura protegida.

RESUMEN GENERAL

CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO ETNOBOTÁNICO DE TRES ESPECIES SILVESTRES DE *Jatropha* spp. EN MÉXICO; ANÁLISIS MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE DE SUS SEMILLAS¹

El aumento de la población humana ha propiciado la pérdida de biodiversidad, contaminación ambiental y la búsqueda de fuentes alternativas de energía. Por lo anterior, desarrollar biocombustibles a partir de especies silvestres es una opción viable. Los objetivos de esta investigación fueron estudiar la diversidad genética de *Jatropha neopauciflora*, *J. rzedowskii* y *J. pseudocurcas* y evaluar las propiedades fisicoquímicas del biodiesel (y sus mezclas con diesel) derivado del aceite contenido en las semillas de *J. rzedowskii* y *J. pseudocurcas*. La diversidad genética se determinó mediante el uso de marcadores moleculares tipo AFLP. El aceite, extraído con hexano, se transesterificó con metanol para obtener los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, por sus siglas en inglés), los cuales fueron analizados por cromatografía de gases. La toxicidad de las semillas fue evaluada mediante la detección de ésteres de forbol por HPLC. Mediante el análisis de coordenadas principales se agruparon los individuos de cada especie con un índice de Shannon de 0.42 y una distancia genética mayor a 0.26. Las semillas de *Jatropha rzedowskii* tuvieron el mayor contenido de aceite (56.4%). En la mezcla de FAME, predominan los insaturados, de los cuales el linoleico estuvo en mayor cantidad (49.97 y 59.94 % para *J. rzedowskii* y *J. pseudocurcas*, respectivamente). El calor de combustión, la densidad y las viscosidades dinámica y cinemática del biodiesel y sus mezclas con diésel, se encuentran dentro de los parámetros internacionales establecidos en las normas europeas EN 590 y EN 14214. En ninguna especie se detectaron ésteres de forbol. De acuerdo con los resultados se concluye que las especies estudiadas tienen una gran diversidad genética, además, se demostró que las semillas no son tóxicas y por lo tanto el aceite puede utilizarse, tanto para consumo humano o animal, como para la obtención de biodiesel.

Palabras clave: Biodiesel, *Jatropha rzedowskii*, *Jatropha pseudocurcas*, ésteres de forbol.

¹ Tesis de Doctorado, Doctorado en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo.
Oscar Daniel Barrera Sánchez - Autor
Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez - Director

CONTRIBUTION TO THE ETHNOBOTANICAL STUDY OF THREE WILD SPECIES OF *Jatropha* spp. IN MEXICO; MOLECULAR ANALYSIS AND CHARACTERIZATION OF SEED OIL COMPOSITION

ABSTRACT

The increase in human population has caused the loss of biodiversity, pollution of the environment and the search for alternative sources of energy. Therefore, development of biofuels from wild species is a suitable option. The objectives of this research were to study the genetic diversity of *Jatropha neopauciflora*, *J. rzedowskii* and *J. pseudocurcas* and to evaluate the physico-chemical properties of biodiesel-diesel blends derived from *J. rzedowskii* and *J. pseudocurcas* seeds oil. Genetic diversity was determined using AFLP's molecular markers. The oil extracted with hexane was transesterified with methanol to obtain the fatty acid methyl esters (FAME) and were analyzed by gas chromatography. The toxicity of seeds was evaluated by detection of phorbol esters using HPLC. By Principal Coordinate Analysis, the individuals per species were clustered with a Shannon index of 0.42 and the genetic distance among species was greater than 0.26. The seeds of *J. rzedowskii* has the highest oil content (56.4 %). Prevalent FAME was linolenic (49.977 % and 59.94 % for *J. rzedowskii* and *J. pseudocurcas*, respectively). Gross heating value, density and dynamic and kinematic viscosities of biodiesel-diesel blends are within the international parameters established in European Standards EN 590 and EN 14214. Phorbol esters were not detected for any of the studied species. According with the results obtained, the species evaluated has a greater genetic diversity in addition, the seeds are non-toxic was demonstrated thus its oil can be used for human or animal consumption as well for obtaining biodiesel.

Keywords: Biodiesel, *Jatropha rzedowskii*, *Jatropha pseudocurcas*, phorbol ester.

Thesis of Doctoral Program; Universidad Autónoma Chapingo.
Oscar Daniel Barrera Sánchez - Author
Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez – Advisor

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, uno de los mayores problemas es la dependencia de los combustibles derivados del petróleo al igual que la rápida pérdida de la biodiversidad. El consumo de combustibles fósiles está en constante aumento (7 % anual) sin embargo, las reservas mundiales son limitadas y el consumo energético mundial depende del petróleo y sus derivados como el gas natural (van Eijck, J and Romijn, 2008). Debido a lo anterior, el desarrollo de fuentes de energía alternas como el biogás, bioetanol y biodiesel adquieren más importancia (Pinzi *et al.*, 2009). El aceite de especies como el algodón, palma aceitera, girasol, higuera, *Jatropha curcas* o de cultivos no convencionales y que no son usados para la alimentación humana se han estudiado como fuente de materia prima para la obtención de biodiesel, mientras que cultivos de rápido crecimiento como caña de azúcar son fuente de bioetanol (Sharma *et al.*, 2008).

El uso de recursos vegetales silvestres crea la necesidad de realizar estudios a profundidad, asegurando de manera indispensable, su conservación responsable antes que su utilización, por lo que el estudio de la diversidad genética para la conservación *Ex situ* e *In situ*, de recursos vegetales de interés se vuelve totalmente necesaria.

El uso de marcadores moleculares de ADN para el análisis de la diversidad genética en especies animales y vegetales es una herramienta en constante desarrollo (Odong *et al.*, 2013, Sivalingam *et al.*, 2014). En el caso del género *Jatropha*, marcadores tipo RAPD's, I-SSR's, SNP's y AFLP's, son muy efectivos para estimar la variabilidad genética de sus colecciones núcleo (Montes *et al.*, 2014; Sinha *et al.*, 2016).

Actualmente se han descrito 200 especies pertenecientes al género *Jatropha* (The Plant List, 2017), existiendo en México 48 especies, de las cuales 39 son endémicas (Steinman, 2002).

Dentro de éste último grupo se encuentran *Jatropha rzedowski*, *J. neopauciflora*

y *J. pseudocurcas*, existiendo reportes de uso alimenticio y medicinal por lo que se propone la siguiente investigación para explorar otros potenciales de uso, la cual tiene por objetivos:

OBJETIVOS

Objetivo General

Contribuir al estudio etnobotánico de especies silvestres del género *Jatropha* como fuentes alternativas de biocombustible y alimento en México.

Objetivos Particulares

Analizar la diversidad genética de *Jatropha rzedowski*, *J. neopauciflora* y *J. pseudocurcas*, mediante el uso de marcadores moleculares tipo AFLP.

Caracterizar física y químicamente el aceite extraído de semillas de *Jatropha rzedowskii* y *J. pseudocurcas* para determinar su potencial como biocombustible.

Detectar la presencia y concentración de ésteres de forbol de semillas de *Jatropha rzedowskii* y *J. pseudocurcas*, para determinar su uso potencial alimenticio.

LITERATURA CITADA

- Montes J, M., Technow F., Martin M. and Becker K. (2014). Genetic diversity in *Jatropha curcas* L. assessed with SSR and SNP markers. *Diversity*, 6: 551-566.
- Odong T.L., Jansen J., van Eeuwijk F.A. and van Hintum T.J.L. (2013). Quality of core collections for effective utilization of genetic resources review, discussion and interpretation. *Theoretical Applied Genetic*, 126: 289-305.
- Pinzi S., García I. L., López-Giménez F. J., Luque de Castro M. D., Dorado G., and Dorado M. P. (2009). The ideal vegetable oil-based biodiesel composition: a review of social, economical and technical implications. *Energy Fuels*, 23: 2325-2341.
- Sharma Y.C., Singh B., and Upadhyay S.N. (2008). Advancements in development and characterization of biodiesel: a review. *Fuel*, 87: 2355–2373.
- Sihna P., Islam M.A., Negi M.S. and Tripathi S.B., (2016). First identification of core accessions of *Jatropha curcas* from India based on molecular genetic diversity. *Plant Genetic Resources*, 14 (1): 77-80.
- Sivalingam P. N., Singh D., Chauhan S., Chandal H. K., Bhan C., Mohapatra T., More T. A. and Sharma S.K. (2014). Establishment of the core collection of *Ziziphus mauritiana* Lam. from India. *Plant Genetic Resources*, 12 (1): 140-142.
- Steinmann V.W., (2002). Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en Mexico. *Acta Botánica Mexicana*, 61: 61–93.
- Van Eijck and J. Romijn H. (2008). Prospects for *Jatropha* biofuels in Tanzania: an analysis with strategic niche management. *Energy Policy*, 36 (1): 311-325.

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

Uno de los mayores problemas a nivel mundial, es la dependencia de los combustibles y derivados del petróleo, así como la rápida pérdida de la biodiversidad. La producción y consumo de combustibles de origen fósil están en constante aumento (7 % anual) debido a que las reservas mundiales son limitadas, y que a nivel global el consumo de energético depende un 36 % del petróleo y derivados y en un 22 % del gas natural (van Eijck, J y Romijn, 2008). Esto ha originado que fuentes alternas de energía tales como el biogás, bioetanol y biodiesel, se encuentren en continuo desarrollo cobrando cada vez más importancia (Pinzi *et al.*, 2009). Algunos estudios acerca del aprovechamiento de la biomasa para la obtención de biocombustibles, han demostrado que los cultivos no convencionales o que no son usados para la alimentación humana son de vital importancia, tal es el caso del algodón, la palma aceitera, la copra y *Jatropha curcas* L., e incluso de aquellos de rápido crecimiento como caña de azúcar para el caso de bioetanol (Sharma *et al.*, 2008). En otro sentido, el biodiesel, en algunos países, se ha vuelto de vital importancia debido a que es un combustible renovable y a sus beneficios ambientales, por lo que se utiliza eficientemente mezclado con diésel comercial en vehículos de carga o transporte público. El incremento de la demanda de biodiesel obtenido a partir de las semillas de oleaginosas, ha traído como consecuencia la necesidad de buscar nuevos cultivos.

Para el 2008, se estimaba que a nivel mundial existían más de un millón de especies vegetales, de las cuales 44,838 especies han sido descritas y 16,928 de éstas (38 %), se consideraban amenazadas debido a factores como la colecta ilegal con fines comerciales, la expansión de la frontera agrícola y el crecimiento de áreas urbanas (Baena, 2008). Para el caso de México, hasta el 2004 existían 23,424 especies integradas a 2,804 géneros, distribuidos en 304 familias (Villaseñor, 2004), dentro de las cuales se encuentra *Jatropha curcas*, especie cultivada en diversas partes del mundo para la elaboración de biodiesel

a partir del aceite extraído de sus semillas. El interés por *J. curcas* ha propiciado su estudio en diversos campos, incluyendo aspectos agronómicos, de mejoramiento genético, adaptación ambiental, así como su potencial alimenticio y otros usos secundarios como elaboración de productos medicinales e incluso con fines de control de plagas en cultivos.

1.1 Generalidades de las especies estudiadas

Actualmente se han descrito 200 especies pertenecientes al género *Jatropha* (The Plant List, 2017), de las cuales 48 especies se encuentran en México y al menos 39 son endémicas (Steinman, 2002). Dentro de este último grupo, se encuentran; *Jatropha rzedowski*, *J. neopauciflora* y *J. pseudocurcas*, las cuales han sido poco estudiadas, pero es posible que cuenten con un potencial alimenticio, biocombustible y medicinal.

A pesar de esta importante diversidad del género, los estudios a nivel mundial y nacional se han enfocado principalmente en una sola especie, *Jatropha curcas* L. también llamada piñón de cerro. Lo anterior se debe a que el aceite extraído de sus semillas se usa para la generación de biodiesel mediante el proceso conocido como transesterificación (Suárez *et al.*, 2011). Muchos estudios han reportado que esta especie crece en zonas semiáridas, áridas y en regiones cálido-húmedas con precipitaciones mayores a los 3,000 mm anuales, lo cual muestra un amplio rango de adaptación a la elevación que va desde el nivel del mar hasta mayores a los 1,800 msnm y temperaturas promedio anuales de 18 a 28 °C; aunque se desarrolla también en sitios con temperaturas de hasta 34 °C y no requiere de un tipo de suelo especial (Jongschaap *et al.*, 2007; Achthen *et al.*, 2008; Toral *et al.*, 2008; Achthen *et al.*, 2010).

En México, los usos del piñón de cerro son diversos; como alimento humano, animales de traspatio y peces, como medicinal y como cerca viva (Makkar y Becker, 1999), inclusive evita la erosión de suelo (Heller, 1996). De igual forma, existen reportes de otras especies del mismo género que tienen potencial para ser considerados como recursos importantes en el aspecto medicinal,

alimenticio, de control de plagas y enfermedades agrícolas, entre otros. Por ejemplo, *Jatropha multifida* cuyas raíces inhiben el crecimiento de bacterias gram-positivas. De igual manera, los extractos de metanol, hexano y cloroformo de la corteza y raíz de *J. podagrica* tienen efecto antifúngico contra *Candida albicans*. (Aiyelaagbe, 2000). Las propiedades antibacterianas de *J. gossypifolia* son atribuidas a un diterpeno macrocíclico (Ravindranath *et al.*, 2003). Asimismo, se ha encontrado actividad antibacteriana y antifúngica significativa en *Jatropha unicostata* (Mothana y Lindequist, 2005). Baraguey *et al.* (2000), aislaron de *Jatropha mahafalensis* un compuesto denominado mahafacyclin B, que es un heptapéptido cíclico con actividad antimalárica.

La toxicidad de algunas especies de *Jatropha* han sido aprovechadas para desarrollar bioinsecticidas. Aiyelaagbe y Gloer (2008), aislaron de la raíz de *Jatropha podagrica* el ácido japódico el cual mostró actividad inhibidora del crecimiento de insectos (*Helicoverpa zea*) al igual que actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, mientras que, extracto de acetato de etilo y ricinina de hojas senescentes de *Jatropha gossypifolia* presentan toxicidad contra *Spodoptera exigua* (Bullangpoti *et al.*, 2011).

A pesar de los esfuerzos realizados hasta el momento por ampliar los estudios en especies silvestres, falta mucho por hacer, y es necesario encaminar las investigaciones hacia la ampliación de conocimiento, conservación y aprovechamiento sustentable, no solo de las especies de *Jatropha*, sino en general de los recursos fitogenéticos que aún no han sido estudiados.

De las 48 especies pertenecientes al género *Jatropha* existentes en la República Mexicana, al menos 11 se encuentran presentes en el Estado de Puebla, de las cuales todas son endémicas excepto *Jatropha curcas*, la cual se encuentra ampliamente distribuida en Centroamérica. Dentro de dicho Estado, se encuentra parte de la región de la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán, la cual cuenta con 12 especies de *Jatropha*.

Al respecto, dicha reserva se encuentra en el Sureste del Estado de Puebla y Noreste de Oaxaca, entre los paralelos 17° 32' 24.00" y 18° 52' 55.20" de latitud Norte y los meridianos 96° 59' 24.00" y 97° 48' 43.20" de longitud Oeste, a una altitud de 200 a 3500 msnm, donde predomina un ambiente semiárido, con presencia de matorrales xerófilos y selva baja caducifolia, bosque espinoso, bosque de encino, bosque de pino-encino y pastizal. De acuerdo con la clasificación de Köppen, modificada por García (1998), el clima es cálido semi-desértico BS₀hw" (w)(e)(g), con temperatura y precipitación media anual de 21 °C y 380 mm anuales.

La reserva pertenece a las Regiones Terrestres Prioritarias de México (RTP) determinadas por la CONABIO e identificada con el número 121, presenta un alto grado de conservación y riqueza biológica, ecológica y genética (Granados *et al.*, 2010). Aquí se encuentran al menos 12 especies de *Jatropha* (Cordova-Téllez *et al.*, 2015), entre las que destacan; *Jatropha rzedoswkii*, *J. neopauciflora* y *J. pseudocurcas*, las dos primeras son especies que forman parte del tipo de vegetación existente.

Los habitantes de dicha reserva extraen el látex de *J. neopauciflora*, haciendo una herida a la planta, y la utilizan poniéndola directamente sobre la parte del cuerpo afectada para el tratamiento de herpes bucal, infección de heridas y dolor de dientes (Von Thaden, 2014). Además, se han demostrado sus propiedades actividad citotóxicas contra ciertas células tumorales (García y Delgado, 2006) y actividad antibacterial (Canales *et al.*, 2005).

1.2 *Jatropha neopauciflora*

Es una especie endémica del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Puebla y Oaxaca), que crece entre los 1,140 y 1,900 msnm en clima semiseco a templado subhúmedo con estación seca mediana a larga, en suelo derivado de lutitas, arenisca, conglomerado y calizas. Se asocia con plantas como *Bursera arida*, *B. galleotiana*, *Cephalocereus columna-trajani*, *Echinocactus platyacanthus*, *Manihot pauciora*, *Beaucarnea gracilis*, *Castela tortuosa*, *Hechtia sp.*, *Agave*

sp., *Opuntia* sp., *Fouquieria* sp., *Mammillaria* sp. y *Coryphantha* sp.

1.2.1 Descripción Botánica

Las plantas de *J. neopauciflora*, son arbustos de 1 a 3.5 m alto, dioicos. Tallos carnosos, corteza exfoliante con tiras papiráceas doradas, braquiblastos abundantes, látex abundante. Hojas caducas, surgen principalmente sobre braquiblastos; estípulas 6 a 10 mm largo, persistentes, abundantes en los braquiblastos, rojizas u oscuras, setosas; peciolo muy corto; láminas 1 a 4 cm largo, 1 a 2.5 (-4) cm ancho, obovadas, rara vez trilobadas, base cuneada, margen entero, ápice redondo, venación pinnada, haz y envés pubescente. *Inflorescencias*: surgen sobre los braquiblastos, las cimas masculinas muy cortas con pedúnculos de 1 a 2 mm o flores solitarias, brácteas inconspicuas, pedicelos 1 a 2 mm, flores pistiladas solitarias. Flores estaminadas rosadas o rojas: sépalos 4 a 5 mm largo, 0.9 a 1 mm ancho, ovados a obovados, márgenes enteros, ápice agudo, tomentosos interna y externamente; corola 7 a 8 mm largo, connada 3/4 de su longitud, urceolado-tubular, pubescente en toda su superficie; estambres 10, filamentos connados en la base, serie externa 3.5 a 4 mm, interna 4 a 5 mm, anteras de aproximadamente 2 mm de largo. Flores pistiladas rojas; sépalos 3 a 5 mm largo, 1 a 1.2 mm ancho, ovado-lanceolados; corola 8 a 10 mm largo, urceolada, connada 3/4 de su longitud; gineceo 2(-1) carpelos, estilo 1, estigmas 2(-1). Frutos 2.3 a 2.5 cm largo, 1.5 a 1.7 cm ancho, elípticas, biloculares, rara vez uniloculares; semillas 1.3 cm largo, esféricas, pardas con marcas oscuras, carúncula vestigial.

Distribución: endémica al Valle de Tehuacán-Cuicatlán en Puebla y Oaxaca.

Hábitat: matorrales xerófilos, bosque tropical caducifolio, 950 a 1900 m de altitud. *Fenología*: floración (marzo) mayo a agosto. Fructificación, septiembre a octubre.



Figura 1. *Jatropha neopauciflora* en Valle de Cuicatlán

1.3 *Jatropha rzedowskii*

Es endémica del valle de Tehuacán-Cuicatlán (Puebla y Oaxaca), pero ésta se encuentra entre los 900 y 1000 msnm. Algunas especies asociadas son: *Ceiba parvifolia*, *Polaskia chichipe*, *Bursera* spp., *Hechtia* spp., *Manihot pauciora*, *Opuntia depressa* y *Cnidoscolus tehuacanensis*.

1.3.1 Descripción Botánica

Las plantas de *J. rzedowskii* son arbustos 0.5 a 3 m altura, dioicos. Tallos con corteza gris y opaca, leñosos, solamente los más jóvenes son ligeramente carnosos, las ramas jóvenes forman frecuentemente ángulos de 90° (es la única especie del género que presenta esta característica en el Valle de Tehuacán). Hojas caducas; estípulas 0.5 a 0.6 mm largo, triangulares y glabras: láminas 1 a 2.1 cm largo, 2 a 3 cm ancho, cuneiformes o angostamente trilobadas, base redondeada o estrechamente decurrente, ápice obtuso, haz y envés glabro, venación pinnada. Flores estaminadas agrupadas, pero surgen independientes sin formar inflorescencias; las femeninas solitarias, el pedicelo de 3 a 4 mm de largo. Flores masculinas blancas; sépalos 2 a 2.3 mm largo, 0.7 a 0.9 mm ancho, ovado-triangulares, ápice largamente acuminado (1/5 a 1/4 de la longitud total), corola polipétala, a simple vista parece tubular, pétalos 4 a 5.6 mm largo, 0.6 a 0.9 mm ancho, cuneiformes (muy estrechamente obovados), base cuneada (se estrecha abruptamente en la base), pilosos en toda su superficie; estambres 7 a 10, 4.5 a 5.8 mm largo, filamentos connados 1/2 de su longitud, anteras largamente triangulares, 1 a 1.3 mm largo. Flores pistiladas

blancas; sépalos 2.8 a 4 mm largo, 0.5 a 0.7 mm ancho, oblongo-lanceolados, pubérulos interna y externamente; corola polipétala, aunque parece tubular a simple vista, pétalos de 3-4 mm de largo por 0.4 a 0.6 mm de ancho, cuneiformes; gineceo 1(-2) carpelos, estilo 1, estigma 1(-2) triangular y carnosos. Frutos 1.4 a 1.5 cm largo, 0.9 a 1 cm ancho, uniloculares, rara vez biloculares; semillas 1 a 1.5 cm largo, 0.85 a 0.95 cm ancho, ovoide, de color pardo oscuro, carúncula vestigial.

Distribución: endémica al Valle de Tehuacán-Cuicatlán en los estados de Puebla y Oaxaca.

Hábitat: matorral xerófilo y bosque tropical caducifolio, 900 a 1000 m. Es una especie que solamente prospera en vegetación primaria.

Fenología: florece mayo a julio. Fructificación, agosto a octubre.



Figura 2. *Jatropha rzedowskii* en Valle de Cuicatlán.

1.4 *Jatropha pseudocurcas*

Tiene distribución en los estados de Jalisco, Oaxaca, Tabasco, Veracruz y ahora se registra en la porción poblana del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, en bosque tropical caducifolio a 1,895 msnm en clima semiseco cálido con estación seca larga. Se le encontró asociada con *Bursera fagaroides*, *Bursera* sp., *Mimosa* sp. y *Opuntia imbricata* (Rodríguez-Acosta *et al.*, 2009).

Pérez *et al.*, en 2014, determinó una amplia diversidad genética a partir de una población natural de *J. pseudocurcas* ubicada en Huajolotitlán en Oaxaca,

proponiendo el establecimiento una colección núcleo (Pérez, 2014).

1.4.1 Descripción Botánica

J. pseudocurcas Müll Arg en Oaxaca es un arbusto de 3 a 4.5 metros de altura, con hojas de 10 a 20 cm de ancho, en forma de corazón en la base. Presenta pubescencias en el haz, su fruto es una cápsula seca dehiscente, es de 2.5 cm de largo (Standley, 1920).



Figura 3. *Jatropha pseudocurcas* en Huajolotitlán, Oaxaca.

1.5 Distribución y medio ecológico

Las investigaciones en las áreas de distribución de *Jatropha* son escasos. Rodríguez-Acosta *et al.* (2009), estudiaron la distribución del género *Jatropha* en el Estado de Puebla registrando 11 especies, todas ellas distribuidas principalmente en la Cuenca del Balsas y el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, determinan que los tipos de vegetación con más especies son el bosque tropical caducifolio y el matorral xerófilo reportando por primera vez para Puebla, la presencia de *J. elbae* J. Jimenez Ram., *J. oaxacana* J. Jiménez Ram. & R. Torres, *J. pseudocurcas* Müll. Arg. y *J. websteri* J. Jiménez Ram. señalando la posible desaparición de dos especies endémicas; *J. riojae* Miranda y *J. rufescens* Brandegees.

Es importante destacar que *J. neopauciflora* (Pue.), y *J. rzedowskii* (Oax, Pue.) son consideradas endémicas para la región Tehuacán-Cuicatlán (Arias-Toledo *et al.*, 2000; Méndez-Larios *et al.*, 2004). No así para el caso de *Jatropha*

pseudocurcas, la cual se encuentra también en los Estados de Oaxaca, Jalisco, Puebla, Tabasco y Veracruz.

Hernández *et al.*, (2015), en un diagnóstico ecológico con fines de conservación de especies de *Jatropha* en la comunidad de San Nicolás Tepoxtitlán, demostraron que, para los pobladores de dicha comunidad tiene mayor importancia *J. neopauciflora* que *J. rzedowskii*, sin embargo, una de las razones por las que estas especies se ven amenazadas, es precisamente la agricultura y la ganadería. A pesar de su reducida distribución, estas especies no se considerarían sujetas a protección, en comparación con *J. oaxacana*, la cual requiere protección especial y *J. ciliata* y *J. rufescens* se encuentran en peligro de extinción debido a la poca cantidad de ejemplares contabilizados. *Jatropha* es dominante en la estructura de la comunidad vegetal. Asimismo, la distribución actual de las especies de *Jatropha* en la Reserva de Tehuacán-Cuicatlán, está relacionada principalmente con variables de elevación, temperatura y precipitación.



Figura 4. *Jatropha neopauciflora* y *J. rzedowskii* creciendo juntas en el Valle de Cuicatlán.

LITERATURA CITADA

- Aiyelaagbe O. O., Adesogan E. K., Ekundayo O. and Adeniyi B. A. (2000). The antimicrobial activity of roots of *Jatropha podagrica* (Hook). *Phytotherapy Research*, 14 (1): 60-62.
- Aiyelaagbe O. O. and Gloer J. B. (2008). Japodic acid, a novel aliphatic acid from *Jatropha podagrica* Hook. *Records of Natural Products*, 2 (4): 100-106.
- Arias-Toledo A. A., M. T. Valverde-Valdés and Reyes-Santiago J. (2000). Las plantas de la Región de Zapotitlán Salinas, Puebla. Instituto Nacional de Ecología UNAM, 80 p.
- Achten J., W.M., Maes H., W., Aerts R., Verchot L., Trabucco A., Mathijs E., Singh V.P., and Muys, B. (2010). *Jatropha*: From global hype to local opportunity. *Journal of Arid Environments*, 74: 164-165.
- Baena M.L., Halffter G. and Salas R. (2008). Extinción de especies, In: *Capital natural de México*. Sarukhán J., Koleff P., Carabias J., Soberón J., Dirzo R., Llorente-Bousquets J., Halffter G., González R., March I., Mohar A., Anta S., Maza J. (eds.) CONABIO. D.F. México, 263-282.
- Baraguey C., A. Blond I., Correia J. L., Pousset B. and Bodo C. (2001). Isolation, structure and synthesis of mahafacyclin B, a cyclic heptapeptide from the latex of *Jatropha mahafalensis*. *Journal of the Chemical Society*, 1 (17): 2098-2103.
- Bullangpoti V., N. Khumrungsee W., Pluempanupat Y., Kainoh and Saguanpong U. (2011). Toxicity of ethyl acetate extract and ricinine from *Jatropha gossypifolia* senescent leaves against *Spodoptera exigua* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Pesticide Science*, 36 (2): 260-263.
- Canales M. T., Hernández, J., Caballero, A., Romo de Vivar, G., Avila, A. and Lira, R. (2005). Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacology*, 97 (3): 429-439.
- Córdova-Téllez L., Bautista E., Zamarripa A., Rivera J. A., Pérez A., Sánchez O. M., Martínez J. and Cuevas J. A. (2015). Diagnóstico y plan estratégico de la Red *Jatropha* spp. en México. SNICS, SINAREFI, México, 116 p.
- Cuevas S. J. A. (2011). Etnobotánica y sustentabilidad: estudio y conservación de germoplasma de quelites en el Totonacapan, pp. 47-58. In: *Especies vegetales poco valoradas: una alternativa para la seguridad alimentaria*. Mera, L.M.; D. Castro, R.A. Bye (eds.). UNAM-SNICS-SINAREFI. México, D.F. pags, 47-58.
- Granados S., D., López R., G. F. and Hernández G. M. (2010). Valle de

- Tehuacán y Cañada de Cuicatlán. D. R. Universidad Autónoma Chapingo. Edo. de México. México. 260 p.
- Heller J. (1996). Physic Nut *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 1. International Plant Genetic Resources Institute IPGRI, Rome, Italy, 66 p.
- Hernández-Nicolás N. Y., Córdova-Téllez L., Romero-Manzanares A., Jiménez-Ramírez J., Lobato-Ortiz R. and Cuevas S. J. (2015). Diagnóstico ecológico para la conservación de *Jatropha* spp. (Euphorbiaceae) y sus hábitats, en la Reserva Tehuacán-Cuicatlán, México. *Revista de Biología Tropical*, 63 (1): 23–33.
- Jonschaap R. E. E., Corré W. J., Brindabran P. S. and Brandenburg W. A. (2007). Claims and facts on *Jatropha curcas* L. *Plant Research International*, 158: 42-51.
- Pinzi S., García I. L., López-Giménez F. J., Luque de Castro M. D., Dorado G. and Dorado M. P. (2009). The ideal vegetable oil-based biodiesel composition: a review of social, economical and technical implications. *Energy Fuels*, 23, 2325–2341.
- Perez P. J. U. (2014). Caracterización *Jatropha pseudocurcas* Müll Arg., Establecimiento de colección núcleo de Oaxaca utilizando AFLP. (Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco Edo. de México), 73 p.
- Makkar H. P. S., and Becker K. (1999). Nutritional studies on rats and fish (carp *Cyprinus carpio*) fed diets containing unheated and heated *Jatropha curcas* meal of a non-toxic provenance. *Plant Foods for Human Nutrition*, 53: 183–192.
- Méndez-Larios I., Ortiz E. and J. L. Villaseñor. (2004). Las Magnoliophyta endémicas de la porción xerofítica de la provincia florística del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica*, 75 (1): 87-104.
- Mothana R. A. A. and Lindequist U. (2005). Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. *Journal of Ethnopharmacology*, 96 (4): 177–181.
- Van Eijck J. and Romijn H. (2008). Prospects for *Jatropha* biofuels in Tanzania: an analysis with Strategic Niche Management. *Energy Policy*, 36 (1): 311-325.
- Ravindranath N. B., Venkataiah C., Ramesh P. and Jayaprakash B. D. (2003). Jatrophene, a Novel Macrocyclic Bioactive Diterpene from *Jatropha*

gossypifolia. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 51 (7): 870-871.

Sharma Y.C., Singh B. and Upadhyay S. N. (2008). Advancements in development and characterization of biodiesel: a review. *Fuel*, 87: 2355–2373.

Steinmann V.W. (2002). Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. *Acta Botánica Mexicana*, 61:61–93.

Rodríguez-Acosta M., Vega-Flores K., Gante-Cabrera V.H., and Jiménez-Ramírez J. (2009). Distribución del género *Jatropha* L. (Euphorbiaceae) en el estado de Puebla, México. *Polibotánica*, 28:37-48.

Suárez J., Martín G. J., Sotolongo J. A., Rodríguez E., Savran V., Cepero L., Funes-Monzote R., Rivero J. L., Blanco D., Machado R., Martín C. and García A. (2011). Experiencias del proyecto BIOMAS-CUBA. Alternativas energéticas a partir de la biomasa en el medio rural cubano. *Pastos y Forrajes*, 34 (4): 473-496.

Toral O. C. Iglesias J. M. Montes de Oca S., Sotolongo J. A., García S. and Torsti M. (2008). *Jatropha curcas* L., una especie arbórea con potencial energético en Cuba. *Pastos y Forrajes*, 31 (1): 191-207.

Villaseñor J. L. (2004). Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 75: 105-135.

Von Thaden U. H. A. (2014). Contribución al estudio etnobotánico de *Jatropha neopauciflora* Pax., (Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco Edo. de México), 80 p.

CAPITULO II

CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE DE DOS ESPECIES SILVESTRES DE *Jatropha* spp. ENDÉMICAS DE MÉXICO

Oscar Daniel Barrera Sánchez¹, Benito Reyes Trejo², Diana Guerra-Ramírez², Holber Zuleta-Prada², Jaime Sahagún Castellanos³, Baldomero Alarcón Zuñiga⁴, Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez⁵.

¹Doctorado en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo, ²Laboratorio de Productos Naturales, Universidad Autónoma Chapingo, ³Laboratorio de Biología Molecular, Universidad Autónoma Chapingo ⁴Instituto de Horticultura Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco, km. 38.5 CP 56230, Texcoco Edo de México. (danielbarrera9@gmail.com, benijovi@yahoo.com.mx, dg_bonita33@yahoo.com, hozuleta_13@hotmail.com, jsahagunc@yahoo.com.mx, balarconzuniga@hotmail.com.mx) ⁵Autor de correspondencia; jaxayacatl@gmail.com

RESUMEN

El aceite de semillas de *Jatropha rzedowskii* y *J. pseudocurcas*, especies endémicas de México, fue transformado a biodiesel para evaluar su uso potencial como biocombustible. El contenido de aceite en las semillas de *Jatropha rzedowskii* (56.40 %) fue superior al de las semillas de *J. pseudocurcas* (43.43 %). El rendimiento de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), a partir del aceite de *J. rzedowskii* fue de 85.86 %. De acuerdo con el estudio del perfil de ácidos grasos en ambas especies prevaleció el ácido linoleico, con 49.97 y 59.94 % para *J. rzedowskii* y *J. pseudocurcas*, respectivamente, seguido del oleico, con 26.02 % y 22.71 % para cada especie. La viscosidad dinámica, viscosidad cinemática y densidad de las mezclas de biodiesel-diésel para ambas especies, al igual que el calor de combustión (> 39,500 KJ), se encuentran dentro de los parámetros internacionales establecidos en las normas europeas EN 590 Y EN 14214. No se encontró la presencia de ésteres de forbol para ninguna de las especies estudiadas, por lo que representan un potencial alimenticio, siendo *J. rzedowskii*, la especie que mostró un mayor potencial para ser usada como biocombustible.

Palabras Clave: Biodiésel, *Jatropha rzedowskii*, *Jatropha pseudocurcas*, ésteres de forbol.

CHARACTERIZATION OF THE OIL OF TWO WILD SPECIES OF *Jatropha* spp. ENDEMICS OF MEXICO

ABSTRACT

Seed oil of *Jatropha rzedowskii* and *J. pseudocurcas*, endemic species of Mexico, was transformed to biodiesel to evaluate its potential use as biofuel. The *J. rzedowskii* oil content (56.40 %) was higher than *J. pseudocurcas* (43.43 %). The yield of fatty acid methyl esters (FAME) from *J. rzedowskii* was 85.86 %. According to the fatty acid profile in both species, linoleic acid prevailed with 49.97 and 59.94% for *J. rzedowskii* and *J. pseudocurcas* respectively, followed by oleic, with 26.02 % and 22.71 % for each species. Dynamic viscosity, kinematic viscosity, density and gross heating value (> 39,500 KJ), of biodiesel-diesel blends in both species, are within the international parameters established in European Standards EN 590 and EN 14214. The presence of phorbol esters was not detected for any species, so they represent a potential food, being *J. rzedowskii* the species that report the greater potential to be used as biofuel.

Keywords: Biodiesel, *Jatropha rzedowskii*, *Jatropha pseudocurcas*, phorbol ester.

2.1 Introducción

Para reducir el uso de petróleo como fuente de combustible, se desarrollan en todo el mundo alternativas renovables y menos contaminantes como el biogás, el bioetanol, entre otras. Dentro de la gama de energías alternas se encuentran los biocombustibles, los cuales actualmente son producidos y utilizados eficientemente en algunos países siendo mezclados con diésel para lograr mayor eficiencia en los vehículos (Pinzi *et al.*, 2009). El aceite extraído de semillas ha sido ampliamente evaluado en la generación de biocombustibles eficientes representando una alternativa más atractiva debido a los beneficios ambientales y a que proviene de recursos renovables (Carels, 2009). Sin embargo, uno de los mayores inconvenientes en la producción de biodiesel, es cuando se obtienen de cultivos de especies de importancia alimenticia como el maíz o la caña de azúcar. Por ello el estudio de especies no convencionales cobra importancia como alternativas que no compiten con la soberanía alimentaria (Azam y Nahar, 2005). Se han descrito como especies potenciales en la generación de biocombustibles la palma aceitera, algodón, melón, higuera, girasol y *Jatropha curcas*, entre otras (Sharma *et al.*, 2008; Peña *et al.*, 2009; Om-Tapanes *et al.*, 2008). Si bien *Jatropha curcas* ha sido una de las especies más estudiadas a nivel mundial por su potencial como biocombustible y su alto contenido de aceite en la semilla (del 25 al 60 %), (Rodríguez-Acosta *et al.*, 2010), actualmente existen descritas 200 especies pertenecientes a *Jatropha* (The Plant List, 2017), de las cuales 48 se ubican en México y al menos 39 son endémicas (Steinman, 2002). Dentro de las especies endémicas se encuentran *Jatropha rzedowskii*, *J. neopauciflora* y *J. pseudocurcas*, las cuales han sido poco estudiadas. Sin embargo, estudios etnobotánicos, señalan su posible potencial como alimento humano (semillas tostadas), biocombustible (derivado de sus aceites), así como medicinal mediante su látex, (Fresnedo y Orozco, 2009).

El biodiésel se define como un combustible compuesto de ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga derivados de aceites

vegetales o grasas animales (Khnote, 2010). Los ácidos grasos libres y el contenido de humedad son parámetros clave para determinar la viabilidad del proceso de transesterificación de los aceites de origen vegetal (Loterio *et al.*, 2005).

Cuando el aceite tiene alto contenido de ácidos grasos libres, la transesterificación es ineficiente. Mientras mayor es la acidez de los aceites, menor es la eficiencia de conversión, requiriéndose un proceso de esterificación y transesterificación en dos etapas (Zullaikah *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2013). Sin embargo, la transesterificación de los triglicéridos presentes en los aceites de plantas hacia metil o etil ésteres, genera mezclas que tienen características similares al diésel comercial, principalmente en el índice de cetanos, densidad, viscosidad y valor calorífico, lo que hace a dichos aceites, utilizables como biocombustible (Rodríguez-Acosta *et al.*, 2010).

Respecto a la parte alimenticia, Makkar *et al.* (2011), reportan a *J. platyphylla*, como una nueva especie no tóxica, debido a que en comunidades de México se consume la semilla tostada. Al analizar la semilla encuentran contenidos de 60 % de aceite, libre de ésteres de forbol en harina, detectan algunos compuestos antinutricionales lábiles al calor, lo anterior explica por qué la gente del lugar consume la semilla tostada, sin efectos nocivos. De igual manera, los pobladores de la Sierra Norte de Puebla en México, reportan que se alimentan de semillas de *J. curcas* usándolas como condimento de guisos o tostándolas (Vera *et al.*, 2014). Por lo que el objetivo de esta investigación consistió en efectuar el análisis del aceite de semillas de *J. rzedowskii* y *J. pseudocurcas* para ser transformado a biodiesel como una alternativa sustentable en la producción de biocombustible, así como la detección de presencia o ausencia de sustancias tóxicas en dichas semillas como alternativa potencial para alimento.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Lugar de colecta del material

Material vegetal, ejemplares para herbario y semillas de *Jatropha rzedowskii* fueron colectadas en el ejido San José Tilapa, Coxcatlán, Estado de Puebla, México (18° 12' 28.8" N y 97° 07' 41.2" O), con una elevación de 1, 198 msnm (Hernández *et al.*, 2016). Para el caso de material vegetal y semillas de *Jatropha pseudocurcas*, el lugar de colecta fue en Santiago Huajolotitlán, en el Estado de Oaxaca (17°49'32" N y 97°43'53" O), con una elevación de 1, 620 msnm.

2.2.2 Caracterización física de las semillas

Se seleccionó un lote al azar de 30 semillas de cada especie sin defectos físicos, previamente lavadas y se le determinaron sus medidas (largo, ancho, grosor y peso) mediante un vernier. Posteriormente se les retiró la testa para obtener las semillas y aplicar las mismas pruebas. El peso se determinó en una balanza analítica marca Ohaus. Después se secaron 24 horas a 50 °C y se efectuó la misma operación.

2.2.3 Prueba de emergencia

Para la evaluación experimental de la emergencia de plántulas de *J. rzedowskii* y *J. pseudocurcas*, se utilizaron 3 tratamientos con 4 repeticiones y 50 semillas por repetición. Se colocaron las semillas (previamente escarificadas para favorecer su germinación) usando turba y perlita (relación 1:1), como sustrato y sembradas en bandejas de poliestireno de 200 cavidades. Las bandejas previamente sembradas, fueron colocadas en una germinadora (Seedburo MP6-3000 B), a 25 ± 1 °C, durante 28 días, contabilizando diariamente la emergencia en cada repetición. El análisis estadístico fue hecho mediante un diseño experimental completamente al azar y una prueba de comparación de medias usando la prueba de Tukey ($\alpha= 0.01$), y el análisis estadístico fue efectuado mediante el programa Statistical Analysis System (SAS) versión 9.0.

2.2.4 Extracción del aceite

El aceite fue obtenido mediante maceración de semillas de *J. rzedowskii* (260.6 g) y *J. pseudocurcas* (150.8 g) previamente molidas en un molino nutribullet, el material molido se colocó en frascos de 1 vidrio de 1 L de capacidad agregando 400 y 300 ml de hexano respectivamente. 72 horas después, el hexano fue retirado y puesto en un frasco de vidrio usando papel filtro. Al bagazo sobrante de cada especie, se le colocó nuevamente la misma cantidad de hexano, este proceso se realizó 3 veces en total. Una vez obtenido el hexano, se agregó 5 g de sulfato de sodio anhidro a cada muestra con la finalidad de retirar el agua que pudiera estar contenida. El hexano de cada muestra fue evaporado usando un rotavapor (Büchi modelo R-210) a 44 °C para obtener el aceite de cada especie, el cual fue colocado posteriormente en frascos ámbar y en refrigeración para su análisis posterior.

2.2.5 Obtención de biodiésel mediante transesterificación

En un matraz bola de 50 mL se colocó una disolución de 0.014 g del KOH en 10 ml de metanol, enseguida se adiciono una muestra de 2 g de aceite manteniendo una agitación constante y vigorosa bajo reflujo de metanol durante 2 horas. El desarrollo de la reacción fue seguido por cromatografía en capa delgada (CCD) usando una mezcla de hexano: ácido acético: acetato de etilo (90:1:10) como eluyente, revelando con una cámara de vapores de yodo. Una vez terminada la reacción de transesterificación, la mezcla se enfrió y fue trasferida a un embudo de separación, dejándola reposar durante 24 horas. La fase inferior fue separada por gravedad (esta fase fue la glicerina), mientras que la superior que fue la de biodiesel, fue lavada con una disolución de ácido cítrico al 0.1 %, en una proporción de 1:1, para después ser lavado con agua caliente a 65 °C en una proporción 1:1, lo cual se repitió 3 veces. Enseguida se añadió sulfato de sodio anhidro para eliminar la humedad, dejando reposar por 24 horas. Se decantó la mezcla obtenida de ésteres metílicos y el sulfato de sodio residual se lavó de cada muestra con ácido clorhídrico para extraer la mayor cantidad de ésteres metílicos de ácidos grasos.

2.2.6 Determinación del perfil de ácidos grasos

Los ésteres metílicos de ácidos grasos fueron analizados mediante cromatografía de gases, utilizando un cromatógrafo GC Agilent 6890 empleando una columna ATSilar de 30 m de largo x 0.25 mm de diámetro interno con un detector de ionización de flama (FID). El gradiente de temperatura de la columna osciló de los 170 a los 240° C y se usó hidrógeno como gas acarreador con un flujo de 1.8 ml por minuto. Se corrió una mezcla estándar de ésteres metílicos de ácidos grasos y se utilizaron sus tiempos de retención para identificar los picos de muestra. Los niveles de ácidos grasos fueron estimados como porcentaje de área respecto al total de área del pico de ésteres metílicos.

2.2.7 Determinación de la viscosidad dinámica, viscosidad cinética y densidad a diferentes temperaturas

Las propiedades fisicoquímicas conocidas como densidad y viscosidad se determinaron mediante un viscosímetro Anton Parr, Stabinger SVM 3000, específicamente la viscosidad dinámica, viscosidad cinemática y densidad tanto del aceite de semillas de *J. rzedowskii* y de *J. pseudocurcas*, al 100 % de biodiesel, como de mezclas de biodiésel-diésel en las siguientes proporciones: 5, 10, 15, 20, 30 y 40 % de biodiésel, todo a temperaturas desde 20° C hasta los 90° C en intervalos de 10° C.

2.2.8 Calor de combustión

EL calor de combustión se determinó utilizando un calorímetro marca Anton Parr, modelo 6400, que cumple con la Norma de calidad ISO 9001:2008. Antes de realizar las determinaciones de las muestras se efectuó la estandarización del equipo, para ello se pesaron 6 tabletas de ácido benzoico, determinando el calor de combustión generado por las mismas y obteniendo el gráfico de control. El coeficiente de variación obtenido fue de 0.03 %. Una vez obtenido el biodiesel de ambas especies mediante el proceso de transesterificación, se

utilizaron mezclas con diésel comercial en las mismas proporciones de diésel y biodiesel que las utilizadas para obtener los datos de viscosidad, densidad y cinemática, usando 0.5 g de cada mezcla de biodiesel-diésel para obtener el calor de combustión.

2.2.9 Determinación de presencia de ésteres de forbol

La presencia de ésteres de forbol se llevó a cabo a partir de muestras de 0.3 g de semilla molida sin testa de *J. rzedowskii* y *J. pseudocurcas*, las cuales se colocaron en tubos falcon de 10 ml. Se añadieron 50 mg de 12-miristato-13-acetato de forbol (PMA) (Sigma-Aldrich) como patrón interno. Los ésteres de forbol se extrajeron una vez con 4 ml de hexano / isopropanol en proporción 3:2 respectivamente durante 1 h. con agitación sobre una plataforma rotatoria. El disolvente se recuperó después de la centrifugación del extracto a 1000 rpm. durante 10 min. Se realizaron dos extracciones adicionales con 3 ml de hexano y 3 ml de isopropanol. Los extractos se combinaron y el disolvente se eliminó bajo una corriente de nitrógeno. El residuo oleoso se disolvió en 2 ml de hexano. Se añadió un volumen igual de acetonitrilo y el extracto se sometió a vortiplicación. La capa de hexano se retiró después de centrifugación a 1000 rpm durante 10 min, y se realizaron dos lavados con hexano de 2 ml para eliminar los lípidos neutros. La fracción de acetonitrilo lavada se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,45 mM (Millex®-LH, Millipore, Billerica, MA) y luego se concentró hasta un volumen de aproximadamente 200 µl en un Speedvac. Se analizaron 20 µl del extracto mediante HPLC-UV usando una columna Phenomenex Luna 3u C18 (2) (tamaño de partícula 3 µm, tamaño de poro 100 Å, Macclesfield, Cheshire, UK). Los disolventes de elución fueron (A) agua con ácido fórmico al 0,1 % y (B) acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 %. Las condiciones de flujo fueron 5 % de disolvente B durante 0-5 min, gradiente lineal hasta 95 % B de 5-40 min, gradiente lineal hasta 100 % B de 40-50 min, 100 % de disolvente B durante 50-60 min. La columna se mantuvo a 40 °C. Las concentraciones de ésteres de forbol se calcularon a partir de áreas de pico

integradas obtenidas a 240 nm con referencia al área de pico del estándar interno (PMA).

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Caracterización física de las semillas

Para la variable de longitud, *J. rzedowskii* (1.12 cm) y *J. pseudocurcas* (0.94 cm) los resultados son similares a *J. elbae* y a *J. andrieuxii* (1.4 y 0.9 cm respectivamente) pero menor a *J. curcas* (1.7cm), (Rodríguez-Acosta *et al.*, 2010), sin embargo, el peso promedio de las semillas en ambas especies estudiadas es menor al resto de las especies comparadas, siendo posible que la cantidad de aceite extraída por volumen de semilla, se encuentra directamente relacionada con su tamaño pero no para su rendimiento de biodiésel.

Cuadro 1. Comparación de tamaños de semillas con testa de cuatro especies de *Jatropha* endémicas de México.

Especie	Longitud DE (cm)	Anchura DE (cm)	Peso DE (g)	Rendimiento de aceite (%)	Rendimiento de biodiesel (%)
<i>J. rzedowskii</i>	1.12 ± 0.12	1.02± 0.11	0.39± 0.14	56.4	85.86
<i>J. pseudocurcas</i>	0.94± 0.06	0.67± 0.04	0.14± 0.03	43.43	55.1
<i>J. elbae</i> ^a	1.40 ± 0.10	1.30 ± 0.10	1.29 ± 0.3	55.25	-
<i>J. andrieuxii</i> ^a	0.90 ± 0.10	0.60 ± 0.10	1.40 ± 0.10	39.77	-
<i>J. curcas</i> ^a	1.70 ± 0.10	0.80 ± 0.10	0.54 ± 0.09	25-60	-

^a Rodríguez-Acosta *et al.* 2010.

DE= Desviación Estándar

Es posible que exista una relación directa entre el tamaño de la semilla, específicamente semilla sin testa, con el contenido de aceite y por lo tanto con el rendimiento de biodiésel que se podría obtener por unidad de superficie cultivada y cosechada. El porcentaje de aceite obtenido por *J. rzedowskii* (56.4 %), fue cercano al reportado en *J. elbae* (55.25 %) y mayor al reportado para *J. andrieuxii* (39.77 %), el cual es más cercano al obtenido en *J. pseudocurcas*

(43.43 %), (Rodríguez-Acosta *et al.*, 2010). En ambos casos el rendimiento de aceite es mayor al obtenido en otras semillas como *Annona diversifolia* (21 %), (Reyes-Trejo *et al.*, 2014), *Annona muricata* (22.57 %), (Fasakin *et al.*, 2008). Sin embargo, en comparación con *J. curcas*, que es la especie de *Jatropha* más utilizada de forma comercial para producción de biodiésel a nivel mundial, dependiendo del genotipo, los rendimientos de aceite son variables (25 hasta 60 %), por lo que ambas especies estudiadas en este trabajo, son comparables con esta última especie en cuanto a rendimiento de aceite. Respecto al porcentaje de biodiésel obtenido mediante el proceso de la transesterificación a partir del aceite, *J. rzedowskii* (85.86 %), tuvo un valor cercano al reportado en *Annona diversifolia* con 91.9 % (Reyes-Trejo *et al.*, 2014), sin embargo, para el caso de *J. pseudocurcas* el rendimiento fue mucho más bajo (55.1 %), por lo que valores más altos en rendimiento de biodiésel, favorecen el potencial como fuente de biocombustibles comercialmente.

2.3.2 Prueba de emergencia

De las 50 semillas evaluadas por repetición en cada tratamiento, El mayor porcentaje de semillas emergidas lo obtuvo *J. curcas*, lo cual era de esperarse debido a que es la especie que lleva mayor avance en el proceso de domesticación y concuerda con lo reportado por Nolasco *et al.* (2016), quien reporta del 92 a 96 % de germinación en accesiones de *J. curcas* a 25 °C, seguido por *J. rzedowskii*, la cual se encuentra ya en algunos jardines de pobladores aledaños al lugar de colecta, lo cual podría indicar algún grado de manejo, al menos tolerada y fomentada, y por último, el menor valor de porcentaje de emergencia, es para *J. pseudocurcas*, especie para lo cual, la literatura no reporta ningún uso, pero si una distribución en al menos 5 estados de la República Mexicana.

Cuadro 2. Emergencia de semillas de tres especies de *Jatropha*.

Especie	Porcentaje de emergencia
<i>J. curcas</i>	98.5 a

<i>J.rzedowskii</i>	55.5 b
<i>J. pseudocurcas</i>	28.00 c
DMS	16.92
R ²	0.96
Pr > F	0.0001

2.3.4 Determinación del perfil de ácidos grasos

El porcentaje de ácidos grasos insaturados para *J. rzedowskii* (76.2 %), como para *J. pseudocurcas* (83%), son similares a los reportados en *Annona diversifolia* con 78.8 %, (Reyes- Trejo *et al.*, 2014) y la soya con 74.7 % (Barbosa *et al.*, 2010), pero mayores a los reportados en *J. elbae* y *J. andrieuxii* con 60 y 62 % respectivamente (Rodríguez-Acosta *et al.*, 2010). De los tres ácidos grasos detectados en ambas especies, el linolénico (que posee dos dobles enlaces) fue el que más prevaleció, con 49.9 % y 59.9 % para *J. rzedowskii* y *J. pseudocurcas* respectivamente, seguido del oleico, el cual reporta valores de 26 y 22.7 % para cada especie. Los aceites que incluyen altos porcentajes ésteres metílicos de ácidos grasos monoinsaturados de 16 y 18 carbonos son materias primas ideales para la producción de biodiésel (Pinzi *et al.*, 2009).

Cuadro 3. Perfil de ácidos grasos de especies de *Jatropha*.

Ácido	<i>Jatropha rzedowskii</i>	<i>Jatropha pseudocurcas</i>	<i>Jatropha curcas</i> ^a	<i>Jatropha elbae</i> ^b	<i>Jatropha andrieuxii</i> ^b	<i>Annona diversifolia</i> ^c	Soya ^d
Mirístico (C14:0)	-	-				-	0.2
Palmitico (C16:0)	12.08	8.358	10.0 - 15.0	10	7	16.4	16
Palmitoleico (C16:1)	1.027	0.112	0.9 - 1.5	-	-	-	-
Esteárico (C18:0)	6.068	6.928	2.0-9.0	7	5	5.22	2.4
Oleico (C18:1)	26.024	22.71	37-49	26	24	70.42	23.5
Linoleico (C18:2)	49.977	59.946	35-44	34	38	7.97	51.2
Linolénico (C18:3)	0.222	0.401	-	-	-	-	8.5

^a Mofijur *et al.* (2012).

^b Rodríguez-Acosta *et al.* (2010).

^c Reyes-Trejo *et al.* (2014).

^d Barbosa *et al.* (2010).

El contenido de ácido linolénico en ambas especies fue menor al 12 %, tal como lo requerido por la norma internacional EN 14214. De igual manera, debido a

que el biodiesel no evidenció ésteres metílicos de ácidos grasos con más de cuatro dobles enlaces, también se cumple con las especificaciones para este tipo de ácidos grasos (cantidad de ácido graso metil éster ≥ 4 dobles enlaces deben ser menor al 1 %).

2.3.5 Determinación de la viscosidad dinámica, viscosidad cinética y densidad a diferentes temperaturas

En ambas especies, sin importar la mezcla respectiva de biodiésel-diésel, La viscosidad cinemática, viscosidad dinámica y densidad, decrecen conforme la temperatura incrementa, observándose para el caso de la densidad, una tendencia aparentemente lineal en dicho decremento con relación al aumento de la temperatura, tal y como lo reportan Santos *et al.* (2011), para otros aceites y biodiésel como se observa en las figuras 5 a 10.

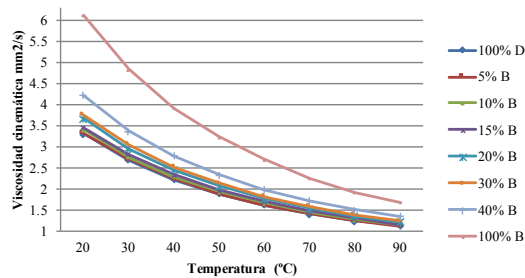


Figura 5. Viscosidad cinemática *J. rzedowskii*

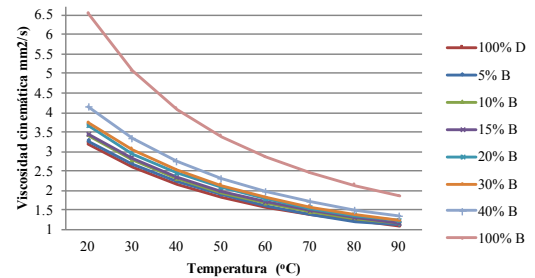


Figura 6. Viscosidad cinemática *J. pseudocurcas*

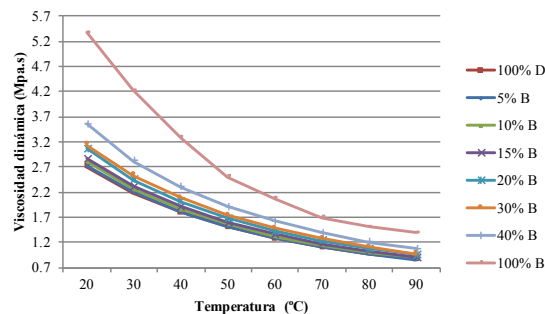


Figura 7. Viscosidad dinámica de *J. rzedowskii*

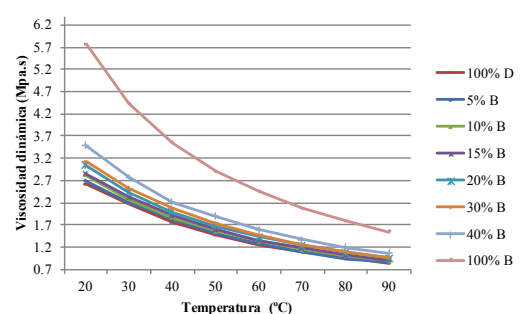


Figura 8. Viscosidad dinámica de *J. pseudocurcas*

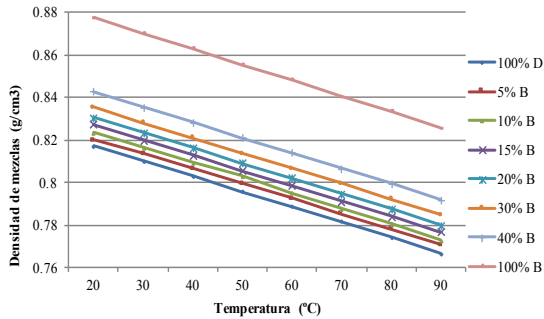


Figura 9. Densidad de *J. rzedowskii*

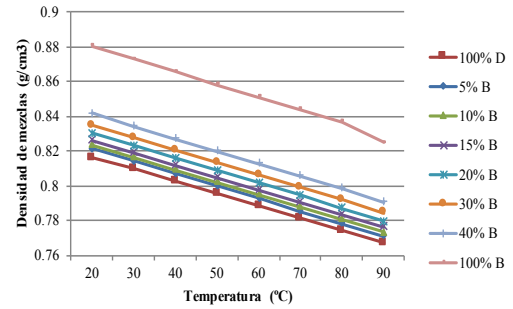


Figura 10. Densidad de *J. pseudocurcas*

Para *J. rzedowskii* y *J. pseudocurcas*, la viscosidad cinemática, viscosidad dinámica y densidad decrecen conforme la proporción del biodiésel es sustituida por diésel en cada mezcla. La misma tendencia se observa en el biodiésel elaborado a partir de semillas de mandarina (*Citrus reticulata*), (Reyes-Trejo *et al.*, 2015) igualmente sigue la misma tendencia que *J. curcas* (Pramanik, 2003).

Los resultados muestran que la viscosidad dinámica, cinemática y densidad de las mezclas de biodiésel de *J. rzedowskii* y *J. pseudocurcas*, son ligeramente mayores que los valores del diésel a cualquier temperatura. Para el caso de la viscosidad, la reducción de sus valores conforme la temperatura aumenta, es una característica deseable ya que la vaporización del combustible, se asemeja más a la del diésel como resultado de la disminución de dicha viscosidad del combustible en cuestión (Pramanik, 2003). Al respecto Reyes-Trejo *et al.* (2014), reportan un uso potencial para biocombustible al aceite de semillas de *Annona diversifolia*, mostrando valores de densidades más altos que los encontrados en las dos especies estudiadas en esta investigación, por lo tanto, valores más bajos, hacen pertinente el uso de las mezclas de biodiésel-diésel de *J. rzedowskii* y *J. pseudocurcas* respecto a estas variables.

La densidad de cualquier mezcla biodiésel-diésel debe satisfacer las exigencias de la norma europea EN 590 a 20 °C, siempre y cuando tales mezclas estén en el rango de 0,86-0,90 gr/cm³ y al mismo tiempo la viscosidad de cualquier mezcla debe estar en el rango de 2- 4,5 mm²/s, como se especifica en EN 14214. En este caso, la viscosidad de todas las mezclas de biodiésel con diésel

comercial (excepto el biodiésel puro), de *J. rzedowskii* y *J. pseudocurcas* se encuentran dentro de este intervalo.

2.3.6 Calor de combustión

Para ambas especies, el calor de combustión de las mezclas de biodiésel incrementa cuando el contenido de biodiesel es menor, los valores más bajos para esta variable se observan en el biodiésel puro y el aceite de ambas especies (Figuras 11 y 12). La misma tendencia es observada en mezclas de biodiésel a partir de aceite de semillas de mandarina mexicana (*Citrus reticulata*), (Reyes-Trejo *et al.*, 2015) y soya (Park *et al.*, 2012).

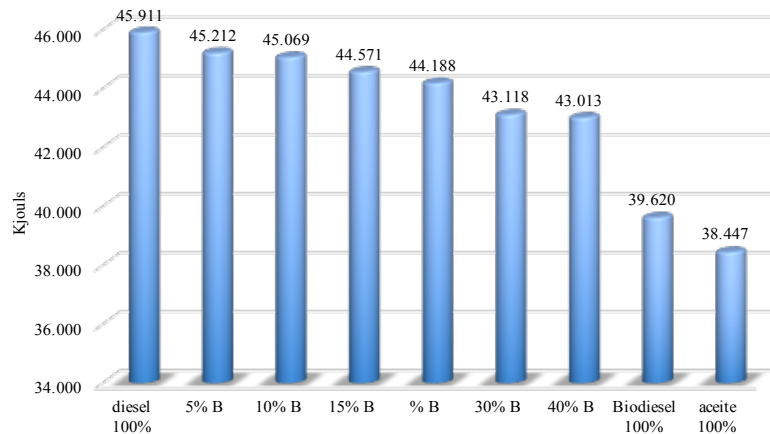


Figura 11. Calor de combustión de mezclas biodiésel de *J. rzedowskii* con diésel comercial.

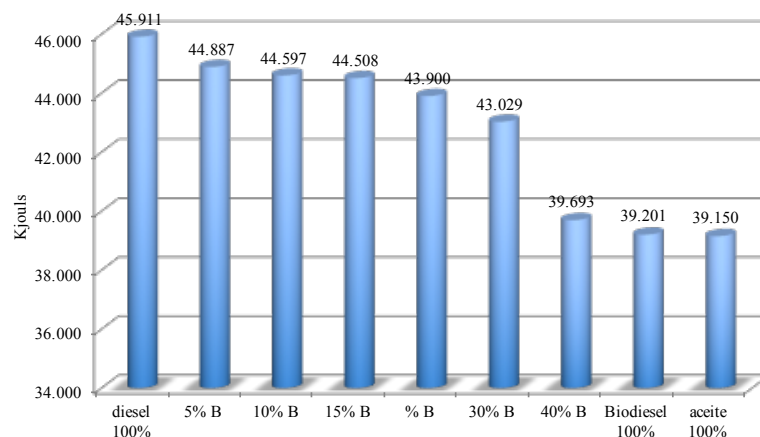


Figura 12. Calor de combustión de mezclas biodiésel de *J. pseudocurcas* con diésel comercial.

Por otra parte, la norma internacional ASTM D240 “Método de prueba estándar para calor de combustión de hidrocarburos mediante calorímetro de bomba”

establece como mínimo valores de 39.5 kJ/kg, valores de calor de combustión para que el biodiésel pueda ser utilizado en motores de combustión interna, por lo que todas las mezclas de biodiesel de ambas especies cumplen con este requerimiento al estar por encima del valor establecido.

2.3.7 Contenido de ésteres de forbol

No se encontró presencia de ésteres de forbol bajo las condiciones de este experimento para ninguna de las especies estudiadas. Muestras de semillas de *Jatropha curcas* consideradas tóxicas por la presencia de ésteres de forbol en concentraciones que van desde los 120 a los 515 $\mu\text{g g}^{-1}$ en accesiones cultivadas fuera de México y para aquellas colectadas dentro del país catalogadas como tóxicas hasta 270 $\mu\text{g g}^{-1}$ (He *et al.*, 2011). Debido a experimentos anteriores, los picos considerados más apropiados para detectar la presencia de compuestos de ésteres de forbol, es a 240 nm, tal como los usados en el presente experimento, donde no se detectó la presencia de dichos compuestos.

2.4 Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos en cada una de las variables estudiadas, tanto *Jatropha rzedowskii* como *Jatropha pseudocurcas*, pueden ser consideradas como recursos potenciales para la producción de biocombustible al cumplir con los parámetros establecidos por las normas internacionales, siendo esta primera especie la de mayor potencial.

La ausencia de ésteres de forbol en las semillas de *Jatropha rzedowskii* y *Jatropha pseudocurcas*, evidencian un uso potencial como complemento alimenticio siendo necesaria la continuidad de las investigaciones sobre estos temas.

2.5 Literatura citada

- Azam M. M., Waris A. and Nahar N. M. (2005). Prospects and potential of fatty acid methyl ésters of some non-traditional seed oils for use as biodiesel in India. *Biomass Bioenergy*, 29: 293–302.
- Barbosa C. D., Serra M. T., Meneguetti P. S. M. and Meneguetti M. R. (2010). Biodiesel production by ethanolysis of mixed castor and soybean oils. *Fuel*, 89: 3791–3794.
- Carels N. (2009). *Jatropha curcas*: A Review. In: *Advances in Botanical Research* by Jean-Claude Kader and Michel Delseny (Eds), 50: 39-86. DOI: Doi 10.1016/S0065-2296(08)00802-1.
- Fasakin A. O., Fehintola E. O., Obijole O. A. and Oseni O. A. (2008). Compositional analyses of the seed of sour sop, *Annona muricata* L., as a potential animal feed supplement. *Scientific Research Essays*, 3: 521–523.
- Fresnedo R. J. and Orozco R. Q. (2013). Diversity and distribution of genus *Jatropha* in Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60: 1087-1104.
- He W., King J. A., Khan a. M., Cuevas A. J., Ramiaramanana D. and Graham A. I. (2011). Analysis of seed phorbol-ester and curcin content together with genetic diversity in multiple provenances of *Jatropha curcas* L. from Madagascar and Mexico. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49: 1183-1190.
- Hernández N. N. Y., Cordoba T. L., Luna C. M., Romero N. A. and Jiménez R. J. (2016). Morphological variation related with environmental factors in endemic and threatened *Jatropha* species of Tehuacan-Cuicatlan, Mexico. *Genetic Resources Crop Evolution*. doi:10.1007/s10722-016-0383-2
- Hossain A. K. and Davies P. A. (2010). Plant oils as fuels for compression ignition engines: a technical review and life-cycle analysis. *Renewable energy*, 35 (1): 1-13.
- Knothe G. (2010). Biodiesel and renewable diesel: a comparison. *Progress in Energy Combustion Science*, 36: 364–373.
- Kumar R. M, Tiwari P. and Garg S. (2013). Alkali transesterification of linseed oil for biodiesel production. *Fuel*, 104: 553–560.
- Lotero J. E., Liu, Y., Lopez D.E., Suwannakarn K., Bruce D. A. and Goodwin J. G. (2005). Synthesis of biodiesel via acid catalyst. *Industrial and Enginering Chemistry Research*, 44: 5353–5363.

- Makkar H. P. S., Kumar O. O., Oyeleye, A. O., Akinleye M. A. and Angulo-Escalante K. (2011). *Jatropha platyphylla*, a new non-toxic *Jatropha* species: Physical properties and chemical constituents including toxic and antinutritional factors of seeds. *Food Chemistry*, 125 (1):63-71.
- Mofijur M., Masjuki H. H., Kalam M.A., Hazrat M. A., Liaquat A. M., Shahabuddin M. and Varman M. (2012). Prospects of biodiesel from *Jatropha* in Malaysia. *Renewable Sustainable Energy Review*, 16: 5007–5020.
- Nolasco G. V., Calyecac C. G. H., Muñoz O. A., Miranda R. A. and Cuevas S. J. A. (2016) Evaluación experimental de germinación y emergencia en semillas de piñón mexicano del Totonacapan. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7 (8): 1959-1971.
- Om-Tapanes N. C., Gomes A. D. A., De Mesquita C. J. W. and Ceva A. O. A. (2008). Transesterification of *Jatropha curcas* oil glycerides: theoretical and experimental studies of biodiesel reaction. *Fuel*, 87: 2286–2295.
- Park J. Y., Kim D. K., Lee J. P., Park S. C., Kim Y. J. and Lee J. S. (2008). Blending effects of biodiesels on oxidation stability and low temperature flow properties. *Bioresources Technology*, 99 (5): 1196–203.
- Peña R., Romero R., Martínez S. L., Ramos M. J., Martínez A. and Natividad R. (2009). Transesterification of castor oil: effect of catalyst and cosolvent. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48: 1186–1189.
- Pinzi S., García I. L., López-Giménez F. J., Luque de Castro M. D., Dorado G. and Dorado M. P. (2009). The ideal vegetable oil-based biodiesel composition: a review of social, economical and technical implications. *Energy Fuels* 2 (3): 2325–2341.
- Pramanik K. (2003). Properties and use of *Jatropha curcas* oil and diesel fuel blends in compression ignition engine. *Renewable Energy*, 28: 239–248.
- Rashid U., Rehman H. A., Hussain I., Ibrahim M. and Haider M. S. (2011). Muskmelon (*Cucumis melo*) seed oil: a potential non-food oil source for biodiesel production. *Energy*, 36: 5632–5639.
- Reyes-Trejo B., Guerra R. D., Zuleta-Prada H., Cuevas S. J. A., Reyes L., Reyes C. A. and Rodríguez S. J. A. (2014). *Annona diversifolia* seed oil as a promising non-edible feedstock for biodiesel production. *Industrial Crop and Products*, 52: 400–404.
- Reyes-Trejo B., Antonio A., Reyes L., Guerra R. D. and Zuleta-Prada H. (2015). In: International Congress, Energy and Environment Engineering and Management. París, France.
- Rodríguez A. M., Sandoval R. J. and Zeferino D. R. (2010). Extraction and Characterization of Oils from Three Mexican *Jatropha* Species. *Mexican*

Chemistry Society, 54 (2): 88-91.

- Santos O. R., Compri G. I., Morandim-Giannetti A. A. and Torres B. R. (2011). Optimization of the Transesterification Reaction in Biodiesel Production and Determination of Density and Viscosity of Biodiesel/Diesel Blends at Several Temperatures. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 56: 2030–2038.
- Sharma Y. C., Singh B. and Upadhyay S. N. (2008). Advancements in development and characterization of biodiesel: a review. *Fuel* 87: 2355–2373.
- Steinmann V. W. (2002). Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. *Acta Botánica Mexicana*, 61: 61–93.
- Vera C. Y. B., Cuevas J. A., Valenzuela Z. A. G., Urbano B. and González F. (2014). Biodiversity and indigenous management on the endangered non-toxic germplasm of *Jatropha curcas* in the Totonacapan (Mexico) and the implications of its conservation. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 61(7): 1263-1278.
- Zullaikah S., Lai C. C., Ramjan S. R. and Ju Y. H. (2005). A two steps acid catalyzed process for the production of biodiesel from rice bran oil. *Bioresource Technology*, 96: 1889–1896.

CAPÍTULO III

EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF SEEDS OIL FROM *Jatropha rzedowskii* AND *Jatropha pseudocurcas*, TWO MEXICAN SPECIES AS POTENTIAL BIOFUEL RESOURCE

Oscar Daniel Barrera Sánchez^a, Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez^b, Jaime Sahagún Castellanos^c, Alarcón Zuñiga Balamero^d Zuleta-Prada H^e, Guerra D^e, Benito Reyes Trejo^{e*}

^aInstituto de Horticultura, Doctorado en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo, Apartado 74, Oficina de Correos Chapingo, Km 38.5 carretera México-Texcoco, Chapingo, México 56230, México, ^bBanco Nacional de Germoplasma Vegetal, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Apartado 74, Oficina de Correos Chapingo, Km 38.5 carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México, 56230, México. ^cAcademia de Metodología de la Investigación, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Apartado 74, Oficina de Correos Chapingo, Km 38.5 carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México, 56230, México. ^dLaboratorio de Biología Molecular, Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Apartado 74, Oficina de Correos Chapingo, Km 38.5 carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México, 56230, México, ^eLaboratorio de Productos Naturales, Área de Química, Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Apartado 74, Oficina de Correos Chapingo, Km 38.5 carretera México-Texcoco, Chapingo, México 56230, Mexico Corresponding author. Tel.: +52 55 51331108x5760; fax: +52 55 595 9521617. E-mail address: benijovi@yahoo.com.mx (B. Reyes-Trejo).

ABSTRACT

The composition of seeds oil of *Jatropha rzedowskii* and *Jatropha pseudocurcas* (endemic wild Mexican species) are described for the first time as a potential biodiesel feedstock. Oils were analysed and considered suitable for alkali-catalyzed transesterification. The biodiesel from both species was obtained by a standard transesterification procedure with methanol and alkali-catalysis. Iodine value, acid value, gross heating value, kinematic viscosity and density, were evaluated from seed oil, biodiesel and different blends of biodiesel and commercial diesel of both species. The results showed that only *Jatropha rzedowskii* is a potential resource as biofuel and is therefore a promising alternative crop for biodiesel in the arid regions of Mexico.

Keywords: *Jatropha* wild species, seeds oil, biodiesel.

3.1 Introduction

The production and consumption of petroleum oil increases constantly. To reduce the use of fossil fuel, alternative energies need to be developed; biofuels, biogas and bioethanol are now the most promising alternatives in energy generation. Biodiesel is produced in some countries and used efficiently either alone or in blends with mineral diesel in cars and other transport vehicles (Pinzi *et al.*, 2009), including aircrafts. Considering that most plant oils have densities higher than mineral diesel, their use is limited for indirect-injection engines. To help meet this increased demand, alternative oil seed crops are being evaluated. Biodiesel has become more attractive recently because of its environmental benefits and because it is prepared from renewable resources. Biodiesel is defined as a fuel comprised of mono-alkyl esters of long-chain fatty acids derived from vegetable oils or animal fats (Knothe, 2010). Some recent studies of biodiesel from non-conventional feedstocks show that the main species analysed for production of biodiesel have been *Ricinus communis* (castor oil), *Cucumis melo* (Rashid *et al.*, 2001), palm, cabbage palm, cotton, sunflower (Hossain *et al.*, 2010), and *Jatropha curcas* (Sharma *et al.*, 2008). Because of the strong political and social pressures to avoid the use of edible oils as a biodiesel source, *J. curcas* has been regarded as a valuable multipurpose crop. *Jatropha curcas* is native to Mesoamerica but has been distributed worldwide since the XVI Century by Spaniards and Portuguese to their tropical and subtropical colonies in Africa and Asia. In India and other countries, villagers used *J. curcas* as a hedge crop, and the extracted seed oil to make soap or fuel for lamps. *Jatropha curcas* is easily propagated, drought and disease resistant, and produces seeds with up to 50 % or more oil (Rodriguez-Acosta *et al.*, 2010).

In Mexico and all over the world, the number of studies about *Jatropha* species has increased because its oil seeds are used to produce biodiesel. However, the knowledge of the taxonomy, distribution, and ethnobotany of these and related wild species is incomplete (Fresnedo and Orozco, 2013). Nowadays, there are

at least 200 *Jatropha* species (The Plant List, 2017), all over the world and 48 of these species are present in Mexico, 39 of which are endemic (Steinman 2002). Particularly, two endemic species from Mexico were studied in this work *Jatropha rzedowskii* and *Jatropha pseudocurcas*. The first one, is distributed in dry and very hot climates [BS₀(h)w(w)], specifically in the Tehuacan-Cuicatlan Biosphere Reserve, where it is an important resource as food, and medicine (Hernández *et al.*, 2016). The second species is distributed in 5 states of Mexico, in the following climates: [(A)Cw₁(w), A(C)w₀(w)], [A(C)w₁(w)], (A)C(w₀) (w) and [(A)C(w₂) (w)] (Fresnedo and Orozco, 2013). The objective of this study is to explore the utility of *J. rzedowskii* and *J. pseudocurcas* seed oil as a potential source to be transformed to biodiesel. Such properties as the density, iodine value, kinematic viscosity, acid value, and gross heating value of oil and biodiesel made from both species are evaluated and compared with specifications in the International biodiesel standards.

3.2 Materials and Methods

3.2.1 Materials

Seeds from fully ripened fruits from *Jatropha rzedowskii* (1,289 g) and *Jatropha pseudocurcas* (373.3 g), were collected in Coxcatlan, Puebla and Oaxaca State both in Mexico, respectively, in October 2014. Vouchers specimen (206 HCM, and 211 HCM respectively) were deposited at the National MEXU herbarium (National Autonomous University of Mexico). Fresh seeds from both species were conditioned for long period conservation inside the National Plant Germplasm Bank cold room, located in Chapingo Autonomous University. All chemicals and reagents used, such as methanol, hexane, potassium hydroxide, anhydrous sodium sulphate, and citric acid, were of analytical grade. The Wijs reagent for iodine determination was obtained from Merck.

3.2.2 Oil extraction

Jatropha rzedowskii and *Jatropha pseudocurcas* seed kernels (260.6 g and

150.8 g respectively) were placed in a 1 L round-bottom flask and oil was extracted by maceration at room temperature (22 ± 2 °C) for 3 days with hexane, three times. After the extractions were complete, the solvent was removed under reduced pressure using a rotary evaporator (Büchi R111, Waterbath B-461, Switzerland) at 45 °C and 147.1 and 65.5 g (*Jatropha rzedowskii* and *Jatropha pseudocurcas* respectively), of the crude oils were recovered.

3.2.3 Transesterification

A transesterification reaction was performed to yield a sample of the fatty acid methyl esters (FAMEs) (Om-Tapanes *et al.*, 2008; Da Silva *et al.*, 2010). If the oil has a high Free Fatty Acid content, acid-catalysed transesterification is suitable (Lotero *et al.*, 2005). A mixture of KOH (0.014 g) in anhydrous CH₃OH (10mL) was added to 15 g and 11.78 g of the *J. rzedowskii* and *J. pseudocurcas* oil respectively (molar ratio of 12:1, methanol/oil). The mixture was heated at 65 °C for 2 h with continuous stirring. This was followed by a conventional work-up consisting of separation of phases, washing the resulting methyl esters with a solution of 0.1 % aqueous citric acid to remove the catalyst, washing with water (three times), and finally drying with anhydrous sodium sulphate. To verify the end of the reaction Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (NMR) was employed. The ¹³C and ¹H NMR spectra were recorded on an Agilent NMR vmrs 400 spectrometer operating at 100 MHz for ¹³C and at 400 MHz for ¹H, respectively. The ¹³C and ¹H chemical shifts were measured in CDCl₃ relative to an internal standard TMS. Typical conditions for the proton spectra were: pulse width 45°, acquisition time 2.5 s, FT size 32 K and digital resolution 0.3 Hz per point.

3.2.4 Fatty acid methyl ester analysis

The fatty acid methyl esters (FAMEs) composition of *J. rzedowskii* and *J. pseudocurcas* seed kernel oil was dried with anhydrous sodium sulphate to

afford 10 ml of a FAMEs mixture. These FAMEs were determined by gas chromatography (GC Agilent 6890) and ATSilar Column (30 m · 0.25 mm ID) with a flame ionization detector (FID). The column temperature gradient ranged from 180 to 230 °C and hydrogen, at a flow rate of 1.8 ml per min, Hydrogen gas was used as a carrier gas. A standard fatty acid methyl ester mixture was run and retention times were used in identifying the sample peaks. Fatty acid levels were estimated as area percent of total peak area of methyl esters.

3.2.5 Oil and biodiesel properties

The oil and biofuel properties were tested according to United States Standard Methods (ASTM D6751). Biodiesel of both species was mixed with diesel in different proportions. The blends contents of biodiesel were 5, 10, 15, 20, 30, 40 % for both species. The properties for biodiesel included; density, kinematic viscosity (ASTM D-445), acid value (EN 14104), and gross heating value (ASTM-D-240), and those properties were determined following the specified standard procedures.

3.3 Results and Discussion

Results of the extraction and determination of physicochemical properties are given in Chart 4, it depicts the properties of the *Jatropha rzedowskii* and *Jatropha pseudocurcas* oil. Chart 5 shows the fuel properties of the *Jatropha curcas* and *Jatropha pseudocurcas*. Chart 7 shows density, viscosity and gross heating value for *Jatropha pseudocurcas* in different moisture contents of biodiesel with diesel; and Chart 8 shows the same parameters as Chart 7 but for *Jatropha rzedowskii*.

3.3.1 Oil properties of *Jatropha rzedowskii* and *Jatropha pseudocurcas*

After extraction, oil from *Jatropha rzedowskii* and *Jatropha pseudocurcas* exhibited NMR typical spectra to the normal triglycerides as oils and presented in figures 13 and 14. The oil identity of each specimen was established by means of its NMR spectra, showing a typical signal at 5.3 ppm of the vinylc proton of

fatty acid chain and for the presence of a coupling pattern at 4.2 ppm attributable to the glycerol moiety.

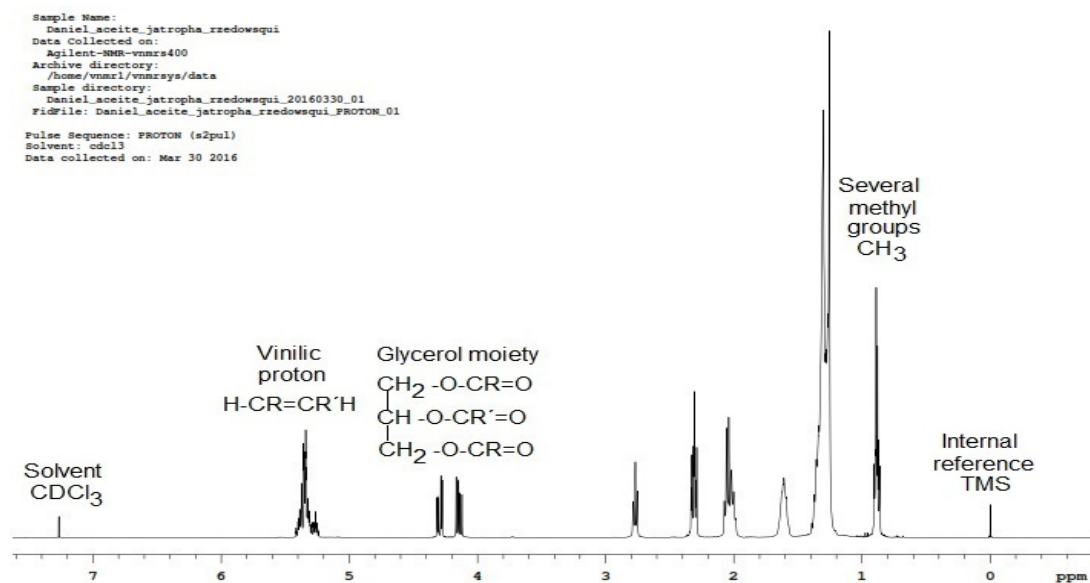


Figure 13. Nuclear Magnetic Resonance spectrum of *Jatropha rzedowskii* seeds oil at 400 MHz (CDCl_3 , TMS).

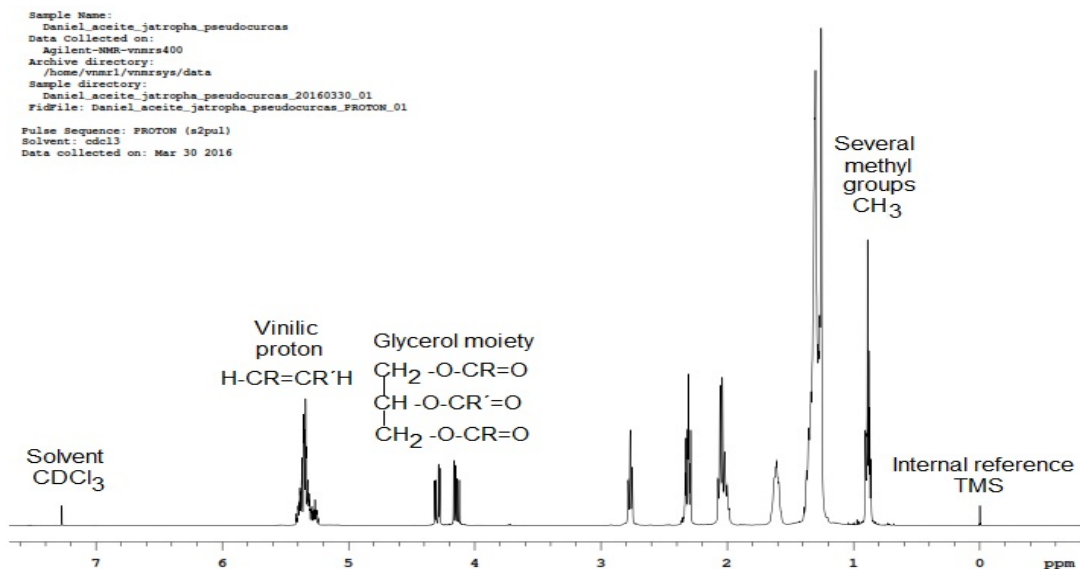


Figure 14. Nuclear Magnetic Resonance spectrum of *Jatropha pseudocurcas* seeds oil at 400 MHz (CDCl_3 , TMS).

The oil composition in *J. rzedowskii* and *J. pseudocurcas* were found to contain 56.4 and 43.43 % respectively (w/w), very near to the oil content of *Jatropha elbae* (55.25 %), and higher than *Jatropha andrieuxii* (39.77 %), [(Rodríguez-Acosta *et al.*, 2010)], *Annona diversifolia* (21 %), [(Reyes-Trejo *et al.*, 2014.)], and *Annona muricata* (22.57 %), [(Fasakin *et al.*, 2008)]. The physical and chemical properties of *Jatropha rzedowskii* and *Jatropha pseudocurcas* oil, including iodine value, acid value, density, kinematic viscosity, and gross heating value, are presented and compared with other oils (Chart 5). The iodine values were 77.05 mg I₂/g and 74.95 mg I₂/g for *Jatropha rzedowskii* and *Jatropha pseudocurcas* respectively, which are lower than *Jatropha curcas* and *J. andrieuxii* oil, and close to the estimated value for *J. elbae* (Rodríguez-Acosta *et al.*, 2010), *Annona diversifolia* (Reyes *et al.*, 2014), *Ximenia americana*, *Madhuca indica*, *Moringa oleifera* and *Ervatamia coronaria* (Azama *et al.*, 2015). The acid value of *Jatropha rzedowskii* and *Jatropha pseudocurcas* were 0.91 and 4.57 mg KOH/g, respectively, which are higher than that of soybean oil (Ramadhas *et al.*, 2005), but close to that of castor oil (Peña *et al.*, 2009). No pre-treatment with acid is required for oils with acid values lower than 3 mg KOH/g, which are considered suitable for alkaline-catalyzed transesterification (Kumar *et al.*, 2013), but for *Jatropha pseudocurcas* oil, pre-treatment was done because it is necessary before transesterification process.

Chart 4. Properties of *J. rzedowskii* and *J. pseudocurcas* oil in comparison with other oils

Property	<i>Jatropha rzedowskii</i>	<i>Jatropha pseudocurcas</i>	<i>Jatropha curcas</i> ^a	<i>Jatropha elbae</i> ^b	<i>Jatropha andrieuxii</i> ^b	<i>Annona diversifolia</i> ^c	Soybean ^d	Castor ^e
Iodine value (mg I ₂ /g)	77.05	74.95	101	72.1	92.56	72	-	85.5
Acid Value (mg KOH/g)	0.901	4.77	-	0.3	0.3	0.666	0.2	0.63
Density at 20°C (g/cm ³)	0.9153	0.9171	0.918	0.93	0.92	0.9118	0.92	-
Viscosity at 40°C (mm ² /s)	29.915	29.946	35.4	-	-	33.64	65	227
Gross heating value (kJ/kg)	38.44	39.15	-	-	-	37.2	39.6	-

^aMofijur *et al.* (2012).

^bRodríguez-Acosta *et al.* (2010).

^cReyes-Trejo *et al.* (2014).

^dRamadhas *et al.* (2005).

^ePeña *et al.* (2009).

The density value of *Jatropha rzedowskii* and *Jatropha pseudocurcas* oil were close to those measured for *J. curcas*, *J. andrieuxii*, *J. elbae*, soybean, and *Annona diversifolia*. The kinematic viscosity of the *J. rzedowskii* and *J. pseudocurcas* oil were 29.915 and 29.946 mm²/s respectively, which are lower than that of *J. curcas*, soybean, and castor oil. However, it is far lower than the viscosity of castor oil (229 mm²/s).

Chart 5. Properties of *Jatropha rzedowskii* and *J. pseudocurcas* biodiesel in comparison with other oil.

Property	ASTM D6751 FAME limits	<i>Jatropha rzedowskii</i>	<i>Jatropha pseudocurcas</i>	<i>Annona diversifolia</i> ^a	Petroleum diesel	Test Method
Iodine value (mg I ₂ /g)		-	-	74		EN 14111
Acid Value (mg KOH/g)	≤ 0.5	-	-	0.5		EN 14104
Density at 20°C (g/cm ³)		0.8774	0.8802	0.886	0.817	EN 3675
Viscosity at 40°C (mm ² /s)	1.9-6	3.9164	4.0877	4.451	2.23	ASTM-D-445
Gross heating value (kJ/kg)		39.61	39.2	36.3	45.9	ASTM-D-240

^aReyes-Trejo *et al.* (2014).

Chart 6. Fatty acid methyl esters composition (%) of *J. rzedowskii* and *J. pseudocurcas* oil.

Fatty acid	<i>Jatropha rzedowskii</i>	<i>Jatropha pseudocurcas</i>	<i>Jatropha curcas</i> ^a	<i>Jatropha elbae</i> ^b	<i>Jatropha andrieuxii</i> ^b	<i>Annona diversifolia</i> ^c	Soybean ^d
Myristic acid (C14:0)	-	-				-	0.2
Palmitic acid (C16:0)	12.08	8.358	10.0 - 15.0	10	7	16.4	16
Palmitoleic acid (C 16:1)	1.027	0.112	0.9 - 1.5	-	-	-	-
Stearic acid (C18:0)	6.068	6.928	2.0-9.0	7	5	5.22	2.4
Oleic acid (C18:1)	26.024	22.71	37-49	26	24	70.42	23.5
Linoleic acid (C18:2)	49.977	59.946	35-44	34	38	7.97	51.2
linolenic acid (C18:3)	0.222	0.401	-	-	-	-	8.5

^aMofijur *et al.* (2012).

^bRodríguez-Acosta *et al.* (2010).

^cReyes-Trejo *et al.* (2014).

^dRamadhas *et al.* (2005).

3.3.2 Fatty acid composition

The oil content in the kernel had a higher percentage of unsaturated fat acids for *J. rzedowskii* (76.22 %) and *J. pseudocurcas* (83.05 %), which are like reported by *Annona diversifolia* (Reyes-Trejo *et al.*, 2014), and soybean 74.7 % (Barbosa *et al.*, 2010), but higher than *J. elbae* y *J. andrieuxii* (60 and 62 %), respectively

(Rodríguez-Acosta *et al.*, 2010). Of the three fatty acids detected, linoleic acid (possessing two double bonds), was the most prevalent (49.97 and 59.94 % for *J. rzedowskii* and *J. pseudocurcas* respectively), whereas oleic acid, a monounsaturated fatty acid, was the least (26.02 and 22.71 % for each one). Oils that include high percentages of 16 and 18 carbon monounsaturated fatty acid methyl esters are ideal biodiesel components (Pinzi *et al.*, 2009).

3.3.3 Biodiesel properties of *Jatropha rzedowskii* and *Jatropha pseudocurcas*

The biodiesel yield of the transesterification reaction was 85.86 % and methylester content for *Jatropha rzedowskii* which is like *Annona diversifolia* (91.9 % w/w), and 55.1 % (w/w), for *J. pseudocurcas*. To assess the total transformation from the oils to biodiesel, ¹H-NMR spectra of the FAME was obtained and is presented at figures 15 and 16, showing at 3.65 ppm a typical signal assigned to the methoxy group (CH₃-O-) of the fatty acid methyl esters, and is observable that disappear the coupling pattern at 4.2 ppm attributable to the glycerol moiety in the oil.

Physicochemical properties of diesel, biodiesel and biodiesel-diesel mixtures are presented in the Chart 8, and includes density, kinematic viscosity, and gross heating value for the distillation of biodiesel (ASTM-D-445 and ASTM-D-240) and petroleum diesel. Comparisons of these properties with petroleum diesel showed that the density of the biodiesel of both studied species is similar to petroleum diesel and the kinematic viscosity is higher than petroleum diesel but it is lower than *Annona diversifolia* (Reyes-Trejo *et al.*, 2014), and gross heating value is slightly lower than petroleum diesel.

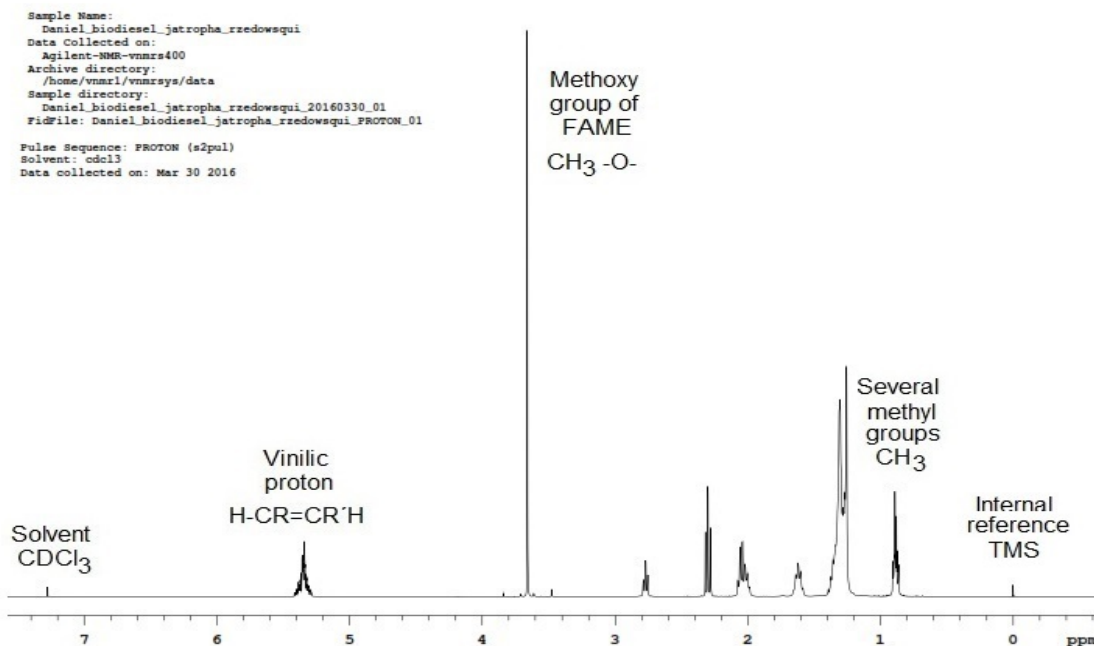


Figure 15. Nuclear Magnetic Resonance spectrum of *Jatropha rzedowskii* biodiesel at 400 MHz (CDCl₃, TMS).

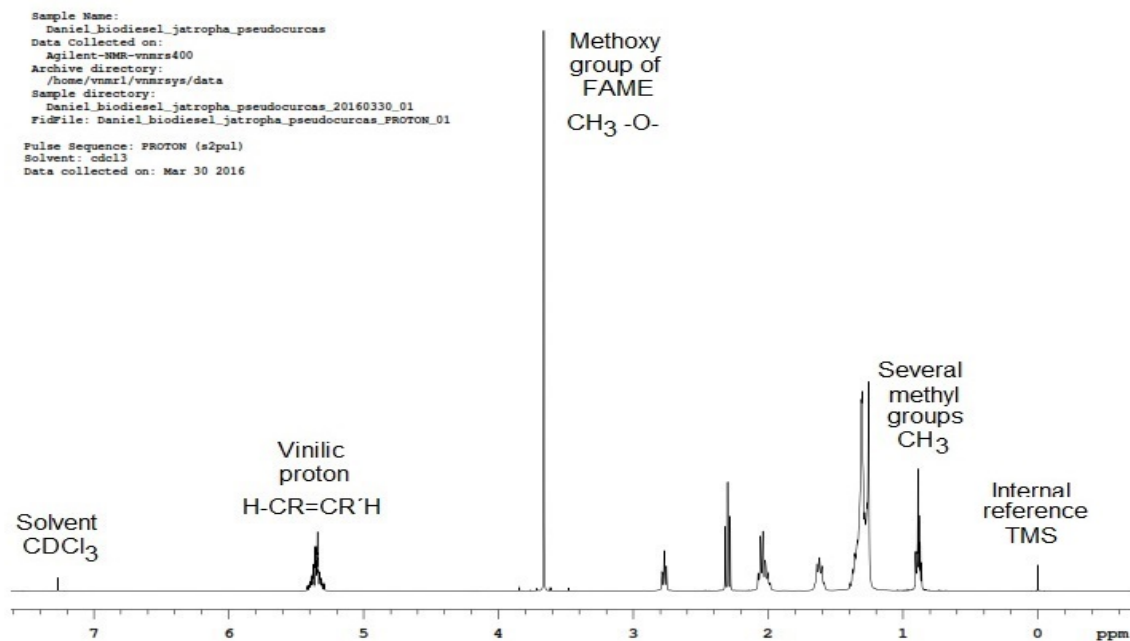


Figure 16. Nuclear Magnetic Resonance spectrum of *Jatropha pseudocurcas* biodiesel at 400 MHz (CDCl₃, TMS).

Chart 7. Density, viscosity and gross heating value for *Jatropha pseudocurcas* mixed in different percentages with diesel.

Variable	100%		Percentage of biodiesel						Oil
	Diesel	5	10	15	20	30	40	100b	100%
Density at 20°C (g/cm ³)	0.8172	0.8211	0.8235	0.8262	0.8301	0.8347	0.8415	0.8802	0.9171
Viscosity at 40°C (mm ² /s)	2.2326	2.2457	2.3037	2.3428	2.4452	2.5186	2.7407	4.0877	29.946
Gross heating value (kJ/kg)	45.9	44.88	44.59	44.5	43.9	43.0	39.69	39.2	39.15

Chart 8. Density, viscosity and gross heating value for *Jatropha rzedowskii* mixed in different percentages with diesel.

Variable	100%		Percentage of biodiesel						100%
	Diesel	5	10	15	20	30	40	100b	oil
Density at 20°C (g/cm ³)	0.8172	0.8199	0.8235	0.8272	0.8306	0.8353	0.8427	0.8774	0.9153
Viscosity at 40°C (mm ² /s)	2.2326	2.2419	2.2924	2.3433	2.4592	2.5309	2.7833	3.9164	29.915
Gross heating value (kJ/kg)	45.91	45.21	45.06	44.57	44.18	43.11	43.03	39.62	38.44

Density and viscosity of the different moisture contents of *Jatropha pseudocurcas* decreases when the proportion of petroleum diesel moisture increases. The gross heating value increases when blend of biodiesel decreases, and the lower values were obtained when only biodiesel and oil are used. The same trend was observed for *Jatropha rzedowskii* for these variables. The same trend is showed in biodiesel made from mandarine seeds (*Citrus reticulata*) (Reyes-Trejo *et al.*, 2015).

Density of any biodiesel-diesel blends should satisfy the requirements of EN 590 at 20 °C, as long as such blends are in the range of 0.86-0.90 gr/cm³ and the same time viscosity of any blends should be in the range of 2-4.5 as specified in EN 14214. In this case, viscosity in both species is involved in this range for all blends of biodiesel-diesel and only pure biodiesel is inside of the range of density.

3.4. Conclusions

Because the acidity index is outside the allowed range (less than 3 mg KOH/g) for *J. pseudocurcas*, a pre-treatment is required to perform the transesterification process, which reduces its potential as biodiesel.

The *J. rzedowskii* and *J. pseudocurcas* yield of the transesterification reactions were 85.86 and 55.1 % methyl ester content, respectively, which indicate that only the first one is appropriate for this reaction.

Density, viscosity, and gross heating value for *J. rzedowskii* and *J. pseudocurcas* biodiesel blends are considered suitable for being used according to EN 14214 and EN 590.

Based on physical properties determined, biodiesel of *Jatropha rzedowskii* can be used as alternative fuel in conventional diesel engines.

3.5. Acknowledgements

The author wish to express their appreciations to Universidad Autónoma Chapingo, National Plant Germplasm Bank, and Laboratorio de Productos Naturales, for funding this Project. Thanks, are also due to Héctor Cervantes and Martín López for their technical assistance in the accessions collected.

3.6. References

- Azam M. M., Waris A. and Nahar N. M. (2005). Prospects and potential of fatty acid methyl ésters of some non-traditional seed oils for use as biodiesel in India. *Biomass Bioenergy*, 29: 293–302.
- Barbosa C. D., Serra T. M., Meneghetti S. M. P. and Meneghetti M. R. (2010). Biodiesel production by ethanolysis of mixed castor and soybean oils. *Fuel*, 89: 3791–3794.
- Da Silva J. P. V., Serra T. M., Gossmann M., Wolf C. R., Meneghetti M. R., and Meneghetti S. M. P. (2010). *Moringa oleifera* oil: studies of characterization and biodiesel production. *Biomass Bioenergy*, 34: 1527–1530.
- Fasakin A. O., Fehintola E. O., Obijole O. A. and Oseni O. A. (2008). Compositional analyses of the seed of sour sop, *Annona muricata* L., as a potential animal feed supplement. *Scientific Research Essays*, 3: 521–523.
- Fresnedo R. J. and Orozco R. Q. (2013). Diversity and distribution of genus *Jatropha* in Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60: 1087–1104.
- Hernández N. N. Y., Cordoba T. L., Luna C. M., Romero N. A. and Jiménez R. J. (2016). Morphological variation related with environmental factors in endemic and threatened *Jatropha* species of Tehuacan-Cuicatlan, Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, doi:10.1007/s10722-016-0383-2
- Hossain A. K. and Davies P. A. (2010). Plant oils as fuels for compression ignition engines: a technical review and life-cycle analysis. *Renewable energy*, 35 (1): 1-13.
- Knothe G. (2010). Biodiesel and renewable diesel: a comparison. *Progress in Energy and Combustion Science*, 36: 364–373.
- Kumar R., Tiwari P. and Garg S. (2013). Alkali transesterification of linseed oil for biodiesel production. *Fuel*, 104: 553–560.
- Lotero J. E., Liu Y., Lopez D. E., Suwannakarn K., Bruce D. A., Goodwin J. G. (2005). Synthesis of biodiesel via acid catalyst. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 44: 5353–5363.
- Mofijur M., Masjuki H. H., Kalam M. A., Hazrat M. A., Liaquat A. M., Shahabuddin M. and Varman M. (2012). Prospects of biodiesel from *Jatropha* in Malaysia. *Renewable Sustainable Energy Review*, 16: 5007–

- Om-Tapanes N. C., Gomes A. D. A., De Mesquita C. J. W. and Ceva A. O. A., (2008). Trans- ésterification of *Jatropha curcas* oil glycerides: theoretical and experimental studies of biodiesel reaction. *Fuel*, 87: 2286–2295.
- Peña R., Romero R., Martínez S. L., Ramos M. J., Martínez A. and Natividad R. (2009). Transesterification of castor oil: effect of catalyst and cosolvent. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48: 1186–1189.
- Pinzi S., García I. L., López-Giménez F. J., Luque de Castro M. D., Dorado G. and Dorado M.P. (2009). The ideal vegetable oil-based biodiesel composition: a review of social, economical and technical implications. *Energy Fuels*, 23: 2325–2341.
- Ramadhas A. S., Jayaraj, S. and Muraleedharan, C. (2005). Biodiesel production from high FFA rubber seed oil. *Fuel* 84: 335–340.
- Rashid U., Rehman H. A., Hussain I., Ibrahim M. and Haider M. S. (2011). Muskmelon (*Cucumis melo*) seed oil: a potential non-food oil source for biodiesel production. *Energy*, 36: 5632–5639.
- Rodríguez A. M., Sandoval R. J., and Zeferino D. R. (2010). Extraction and Characterization of Oils from Three Mexican *Jatropha* Species. *Mexican Chemistry Society*, 54(2): 88-91.
- Reyes- Trejo B., Guerra R. D., Zuleta-Prada H., Cuevas S. J. A., Reyes L., Reyes, C.A. and Javier Rodríguez S. J. A. (2014). *Annona diversifolia* seed oil as a promising non-edible feedstock for biodiesel production. *Industrial Crop and Products*, 52: 400–404.
- Reyes-Trejo B., Antonio A., Reyes L., Guerra R. D. and Zuleta-Prada H. (2015). In: International Congress, Energy and Environment Engineering and Management. París, France.
- Sharma Y. C., Singh B. and Upadhyay S. N. (2008). Advancements in development and characterization of biodiesel: a review. *Fuel*, 87: 2355–2373.
- Steinmann V.W. (2002). Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. *Acta Botánica Mexicana*, 61:61–93.

CAPÍTULO IV

DIVERSIDAD GENÉTICA DE TRES ESPECIES ENDÉMICAS DE *Jatropha*. spp. EN MEXICO MEDIANTE EL USO DE MARCADORES AFLP

Oscar Daniel Barrera Sánchez¹, Baldomero Alarcón Zuñiga² Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez³
Benito Reyes Trejo⁴, Jaime Sahagún Castellanos⁵

¹Doctorado en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo, ² Laboratorio de Productos Naturales, Universidad Autónoma Chapingo, ³Laboratorio de Biología Molecular, Universidad Autónoma Chapingo ⁴Instituto de Horticultura Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco, km. 38.5 CP 56230, Texcoco Edo de México. (danielbarrera9@gmail.com, balarconzuniga@hotmail.com.mx benijovi@yahoo.com.mx, jsahagunc@yahoo.com.mx,) autor de correspondencia; jaxayacatl@gmail.com

RESUMEN

La diversidad genética es un elemento importante para la integración de las colecciones núcleo de plantas y desempeña un papel clave en la conservación *In situ* y *Ex situ* de especies vegetales endémicas siendo indispensable en programas de mejoramiento genético del germoplasma vegetal. *Jatropha neopauciflora*, *J. rzedowskii* y *J. pseudocurcas* son tres de las 48 especies silvestres de México, y su ubicación se reduce a la reserva de la biosfera de Tehuacán-Cuicatlán y Oaxaca, razón por la cual su distribución es reducida y la información sobre su diversidad genética y usos es escasa. Dado lo anterior, el objetivo fue estimar la diversidad genética de las tres especies de *Jatropha* con marcadores AFLP, proponiendo esta metodología para la generación de colecciones núcleo en el Banco Nacional de Germoplasma Vegetal de México. Se colectaron 236 individuos de las tres especies, en Oaxaca y Puebla, México. Cuatro combinaciones de oligonucleótidos de AFLP (*EcoRI* y *MseI*) generaron 181 amplicones polimórficos con un índice de Shannon de 0,42. Los individuos se agruparon con el método UPGMA con un punto de agrupamiento de 0,21 (coeficiente de similitud de Dice) entre especies, y fue corroborado por el análisis de coordenadas principales, resultando en 3 agrupaciones diferenciadas, una por especie, que representan el 79.38 % de la variación dentro de la especie (AMOVA). La alta variabilidad genética encontrada en las especies endémicas muestra que los individuos pueden ser útiles para la integración de una colección núcleo.

Palabras clave: *Jatropha* spp., Diversidad genética, AFLP, Colección núcleo.

GENETIC DIVERSITY OF THREE ENDEMIC OF *Jatropha* spp. FROM MEXICO USING AFLP MARKERS

ABSTRACT

Genetic diversity is an important element for the integration of plant core collections and plays a key role in the *In situ* and *Ex situ* conservation of endemic plant species being essential in genetic breeding programs for germplasm plant. Endemic *Jatropha neopauciflora*, *J. rzedowskii* and *J. pseudocurcas* out of 48 wild species in Mexico, are located in the Tehuacán-Cuicatlán biosphere reserve and Oaxaca, for this reason its distribution is reduced and the information about its genetic diversity and uses is scarce. The objective was estimate the genetic diversity of three *Jatropha* species using AFLP markers proposing this methodology for generate core collection in National Plant Germplasm Bank of Mexico. 236 individuals of the three species were collected in Oaxaca and Puebla, Mexico. 181 polymorphic amplicons were generated of four oligonucleotide combinations of AFLP (*EcoRI* and *MseI*) with a Shannon index of 0.42. The individuals were grouped with the UPGMA method considering a grouping point among individuals of 0.21 (Dice similarity coefficient), and was corroborated by Principal Coordinate Analysis. The three species were grouped in each cluster, representing 79.38 % of variation within the species (AMOVA). The high genetic variability found by AFLP in the endemic species shows that the individuals can be useful for the integration of a core collection.

Keywords: *Jatropha* spp., Genetic diversity, AFLP, Core collection.

4.1 Introducción

Jatropha (Euphorbiaceae) es uno de los grupos de plantas endémicas con gran importancia cultural y económica en México, con 200 especies reportadas a nivel mundial y 48 en México, de las cuales 39 son endémicas (Steinmann, 2003; Fresnedo y Ramírez, 2013). Algunas especies de este género han sido reconocidas por sus diferentes usos para prevenir y controlar la erosión del suelo como cercas vivas, alimentos, propiedades medicinales, textiles y como biocombustibles (Rodríguez *et al.*, 2009; Francis *et al.*, 2013; Lim *et al.*, 2015). La especie más estudiada ha sido *J. curcas*, debido a su amplia adaptación a las regiones subtropicales y tropicales; sin embargo, otras especies se limitan a los hábitats cercanos donde se tienen que preservar en reservas de la biosfera, tales como *J. rzedowskii*, *J. oaxacana*, *J. ciliata*, *J. rufescens* y *J. neopauciflora*, endémicas de la reserva de la biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. A pesar de la importancia de dichas especies, no existe información disponible sobre la diversidad genética contenida en sus poblaciones (Mukherjee *et al.*, 2011, Sharma y Singh, 2012, Pullaiah y Bahadur, 2013, Hernández *et al.*, 2016).

Jatropha neopauciflora es una especie endémica de México que tiene una alta importancia biocultural. Los indígenas usan esta planta por sus diferentes propiedades como un remedio natural para el tratamiento de erupciones cutáneas, heridas y dolor de muelas, comercializándose en los mercados tradicionales de Oaxaca y Puebla (Canales *et al.*, 2005, Arellanes *et al.*, 2013). Existen evidencias de que *J. neopauciflora* produce sesquiterpenoides que tienen actividad citotóxica contra células tumorales del sistema nervioso central humano y la línea celular de leucemia (García y Delgado, 2006; Sharma y Singh, 2012). Se encuentra ubicada en Coxcatlán, Puebla, México, con una distribución restringida de la reserva de biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, lo que la convierte en una especie en peligro de extinción (Fresnedo y Ramírez, 2013).

J. rzedowskii es otra de las especies endémicas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, la cual solamente prospera en vegetación primaria. *Jatropha pseudocurcas* tiene distribución en los estados de Jalisco, Oaxaca, Tabasco, Veracruz y ahora se registra en el valle de Tehuacán-Cuicatlán, en bosque tropical caducifolio a 1,895 m.s.n.m. en clima semiseco cálido con estación seca larga. Se le encontró asociada con *Bursera fagaroides*, *Bursera* spp., *Mimosa* sp. y *Opuntia imbricata* (Rodríguez-Acosta *et al.*, 2009).

A medida que la población humana aumenta y demanda nuevos hábitats naturales, se vuelve prioritario definir estrategias para preservar el germoplasma endémico de especies silvestres, incluida la obtención de colecciones núcleo, las cuales pretenden con un mínimo de individuos, conservar la mayor representatividad de la diversidad genética de una especie (Frankel, 1984). Para crear y evaluar una colección núcleo, se han utilizado rasgos fenotípicos, datos bioquímicos y marcadores moleculares de ADN para el análisis de la diversidad genética (Odong *et al.*, 2013, Sivalingam *et al.*, 2014). En los estudios de diversidad de *Jatropha*, se han utilizado ampliamente RAPD's, I-SSR's, SNP's y AFLP's, concluyendo que los marcadores de ADN son muy efectivos para estimar la variabilidad genética de las colecciones núcleo de este género (Sinha *et al.*, 2016, Montes *et al.*, 2014).

Por esta razón, se empleó AFLP para estimar la diversidad genética de *J. neopauciflora*, *rzedowskii*, y *pseudocurcas*, para proponer la primer colección núcleo en el Banco Nacional de Germoplasma Vegetal de México (BANGEV).

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Material vegetal

Se colectaron muestras de 88 individuos de *J. neopauciflora* y 54 de *J. rzedowskii* en la reserva de biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México (18° 12' 28,8" N y 97° 07' 41,2" O a 1198 msnm); y 94 de *J. pseudocurcas* obtenidas en la comunidad de Huajolotitlán en Oaxaca (17° 49' 32" N y 97° 43'

53" O a 1,620 msnm). De cada planta muestreada, se separaron las hojas, tallos, flores y semillas para la correcta identificación taxonómica, y las hojas de brotes tiernos fueron utilizadas para el análisis molecular de la diversidad genética.

4.2.2 Extracción de ADN

El ADN se extrajo de acuerdo con el protocolo CTAB de Sudheer (2009), con modificaciones. Las muestras se almacenaron a -80 °C, se liofilizaron y molieron finamente. Se añadió un mililitro de solución amortiguadora de lisis (CTAB al 2%, Tris-HCl 100 mM, NaCl 3,5 M, EDTA 20 mM, PVP al 2 %, 14,3 \ μL de β-mercaptoetanol, pH 8,0) a 300 mg de tejido foliar seco, a 65 °C durante 90 minutos (con agitación). Se añadió un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24: 1), se centrifugó a 9300 rpm durante 5 minutos, recuperando el sobrenadante para añadir 4 \ μL de RNasa y se almacenó a 40 °C durante 30 min. La etapa anterior se repitió y precipitó con etanol al 70 %. El ADN fue resuspendido en 50 μl de TE (Tris pH 8 + EDTA).

4.2.3 Análisis molecular

El análisis molecular se hizo con marcadores tipo AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) utilizando el Licor® Fluorescent IRDye (AFLP® Kit Large Plant Genome Analysis). El ADN (250 ng) fue digerido con EcoRI (hexa-cutter) y MseI (tetra-cutter) durante dos horas a 37 °C con un incremento de temperatura a 70 °C durante 15 minutos. Los fragmentos de ADN se ligaron a los adaptadores *EcoRI* y *MseI* en una solución que contenía ADN ligasa T4 a 20 °C durante dos horas. La preamplificación se realizó en un termociclador (Therm-1000, Axygen) en una dilución 1:10 del ADN ligado, añadiendo solución amortiguadora 10X, con una mezcla de preamplificación de iniciador AFLP y 5 U/μl de ADN Taq polimerasa, con los siguientes ciclos: 1 ciclo (30 s a 94 °C, 30 s a 65 °C y 1 min a 72 °C), 12 ciclos (30 s a 94 °C, 30 s a 65 °C reducido en 0,7 °C Cada ciclo y 1 min a 72 °C), y finalmente 23 ciclos (1 min a 72 °C, 30 s a 94 °C y 1 min a 72 °C). Se tomaron dos microlitros de dilución de preamplificador

(1:40) y se añadieron a la mezcla de amplificación selectiva más una gota de aceite mineral. La mezcla se amplificó con un programa de 1 ciclo (30 s a 94 °C, 30 s a 65 °C y 1 min a 72 °C), 12 ciclos (30 s a 94 °C, 30 s a 65 °C reducido 0,7 °C cada ciclo y 1 min a 72 °C), y finalmente 23 ciclos (1 min a 72 °C, 30 s a 94 °C y 1 min a 72 °C). El producto de amplificación selectiva fue corrido sobre gel de poliacrilamida desnaturalizado (300 Volts. durante tres horas usando solución amortiguadora TBE 1X). Se obtuvieron oligonucleótidos polimórficos seleccionados a partir de 20 combinaciones y sólo cuatro mostraron amplicones informativos y polimórficos (E-ACG / M-CTC, E - ACT / M – CTA, E - AGG / M – CAC y E - AGG / M – CTT).

4.2.4 Análisis estadístico

Se generó una matriz con datos binarios ausencia / presencia (0 y 1) a partir de cuatro combinaciones de oligonucleótidos AFLP en 236 individuos, para estimar el grado de polimorfismo y contenido de información con los siguientes parámetros: i) heterocigosidad (H), para cada combinación de oligonucleótidos y entre oligonucleótidos. La heterocigosidad (H) se define como la probabilidad de que un individuo sea heterocigótico para el locus en la población y se calculó de acuerdo con Liu (1998), como:

$$H = 1 - \sum_{i=1}^l P_i^2$$

Donde, P_i es la frecuencia para el i-ésimo alelo entre un total de 1 alelos.

Se consideró PIC como el valor de una combinación de cebadores AFLP para detectar el polimorfismo dentro de la población endémica, dependiendo del número y la frecuencia de alelos detectables; y puede usarse para el poder de discriminación de la combinación de cebador AFLP. El estimador PIC de un locus de alelo l se calculó como:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^l P_i^2 - \sum_{i=1}^{l-1} \sum_{j=i+1}^l 2P_i^2 P_j^2$$

Donde P_i y P_j son la frecuencia de población de los alelos i -ésimo y j -ésimo. PIC es una modificación de las medidas de heterocigosidad que substraen del valor H una probabilidad adicional de que un individuo en un análisis de ligamiento no aporte información al estudio (Botstein *et al.*, 1980; Speer, 1999).

Se determinó el número efectivo de alelos (N_e), el número de *loci* polimórficos, el porcentaje de *loci* polimórficos, la tasa de diversidad genética de Nei (H) y el índice de Shannon (I) con el software POP-GENE V1.32 (Yeh *et al.*, 1997). La similitud genética entre los individuos se calculó utilizando el coeficiente de similitud de Dice, y se agruparon con el método flexible, utilizando un análisis de bootstrap con 5000 repeticiones. Además, se evaluó el grado de las relaciones genéticas de la colección central con el Análisis de coordenadas principales (PCoA), utilizando el programa GeneAlex 6 (Peakall and Smouse, 2006). Los grupos generados por el método flexible se analizaron como poblaciones. La heterocigosidad esperada se determinó dentro de especies (H_t) y los individuos (H_s), por el coeficiente de variación genética de Nei generado por el software POP-GENE V1.32 (Yeh *et al.*, 1997).

4.3 Resultados y Discusión

Con base en el análisis UPGMA, se agruparon las especies en tres grupos, observándose que los más cercanos son *J. rzedowskii* y *J. neopauciflora*, especies que conviven y crecen como parte de la vegetación natural en la Reserva de la Biosfera de Tehucacán-Cuicatlán. En un estudio realizado por Hernández-Nicolás *et al.* (2016) reportaron que *J. rzedowskii* y *J. neopauciflora*, localizados en la misma reserva Tehuacán-Cuicatlán, comparten rasgos morfológicos muy similares que les permiten agruparse de manera muy cercana, ya que comparten adaptaciones ambientales, por lo que, al estar sometidas a las mismas condiciones, sus mecanismos de adaptación suelen ser iguales (Nooryazdan *et al.*, 2010).

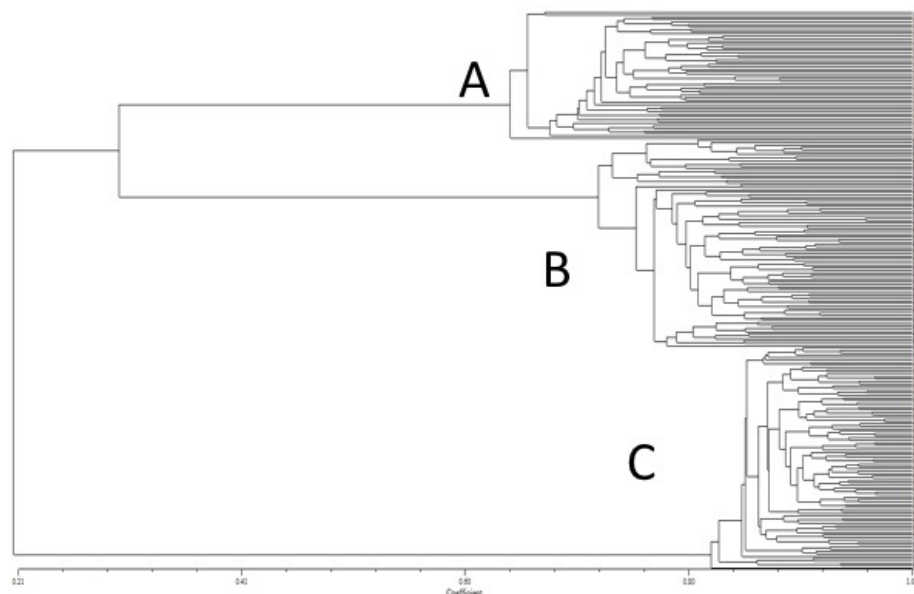


Figura 17. Dendrograma de similitud de Dice de tres especies del género *Jatropha* donde A: *rzedowskii*, B: *neopauciflora* y C: *pseudocurcas*.

La agrupación de las tres especies mostró un coeficiente de similitud entre 0.21 a 1.0, donde el dendrograma resultante fue sustentado las interacciones de Bootstrap, con un alto coeficiente de correlación cofenética de 0.988 y un índice de Shannon de 0.42. El análisis de coordenadas principales también confirmó el poder de separación de los tres grupos.

En estudios de diversidad genética de 5 especies de *Jatropha* y 4 poblaciones de diferentes lugares de *J. curcas*, mediante un dendrograma de bandas polimórficas se identificaron y agruparon claramente genotipos formando primero grupos de la misma especie y después entre especies cercanas de *J. curcas* con alto coeficiente de similitud que osciló entre 0.39 a 0.99 y un coeficiente de correlación cofenética de 0.974 (Patcharin *et al.*, 2011).

Cuadro 9. Número de alelos efectivos, número y porcentaje de *loci* polimórficos de tres especies de *Jatropha*.

Especie	Núm de alelos efectivos	Núm de Loci polimórficos	% de Loci Polimórficos
<i>J. rzedowskii</i>	1.65	119	65.75
<i>J. neopauciflora</i>	1.30	55	30.39
<i>J. pseudocurcas</i>	1.16	30	16.57

El mayor número de *loci* polimórficos y mayor porcentaje lo presentó *J. rzedowskii*, seguido por *J. neopauciflora*, y por último *J. pseudocurcas*. Nooryazdan *et al.* (2010) encontraron en un estudio de diversidad genética en 8 especies del mismo género, un porcentaje de 99.31 % de *loci* polimórficos mediante marcadores moleculares ISSR. Previamente Basha *et al.* (2009), usando marcadores tipo AFLP, ISSR, y RAPD, encontraron un 35.5 % de *loci* polimórficos para *J. curcas*. Lo anterior evidencia la necesidad de explorar a las parientes silvestres de *J. curcas* para ampliar la base genética del género con fines de mejoramiento, ya que esta especie es susceptible de ser cruzada con otras especies si se usa como donador femenino (Dehgan, 1984).

4.3.1 Análisis de Coordenadas Principales

Mediante el análisis de coordenadas principales se determinó qué, de la variación total, 42.4 % es atribuida a *J. rzedowskii*, 35.35 % para *J. neopauciflora* y tan solo el 1.63 % para *J. pseudocurcas*, dando un total de 79.38 % de variación inter-específica, y el 20.42 % de variación intra-específica, lo cual evidencia una gran variación genética entre las especies en cuestión.

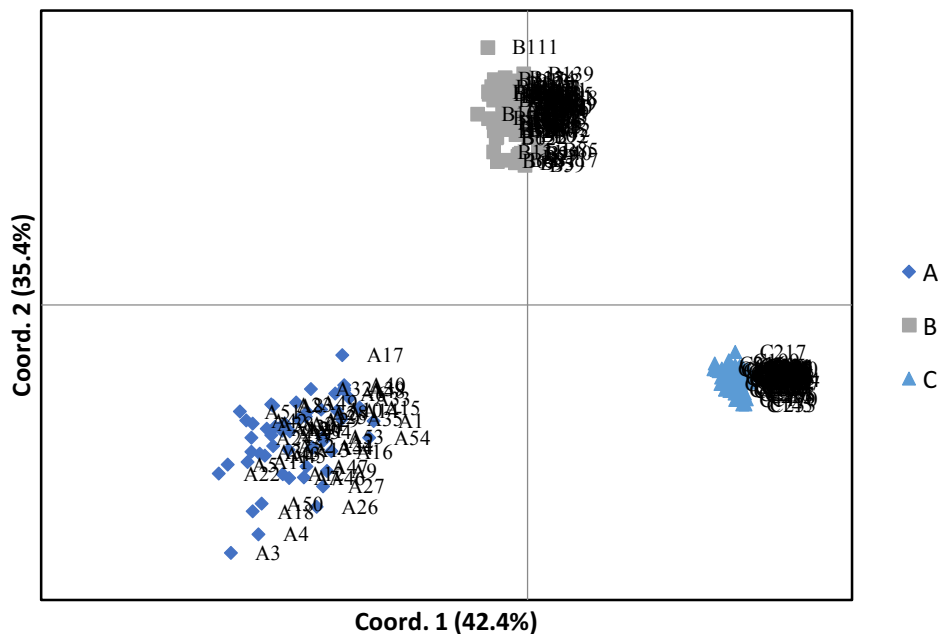


Figura 18. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) de tres especies de *Jatropha*, donde A: *rzedowskii*, B: *neopauciflora* y C: *pseudocurcas*.

La distancia genética (Nei) entre *J. rzedowskii* y *J. neopauciflora* es de 0.2663 y de *J. rzedowskii* con *J. pseudocurcas* es de 0.3661, y de esta última con *J. neopauciflora* es de 0.3448, por lo que hay una similitud genética mayor entre las dos primeras especies en relación a la tercera. Lo anterior es debido posiblemente a que las dos primeras especies crecen en la misma área geográfica, e incluso morfológicamente están agrupadas de manera cercana (Hernández *et al.*, 2016), a comparación de *J. pseudocurcas*, la cual es claramente diferente en cuanto a su morfología, además de haber sido colectada en un hábitat con características ambientales diferentes. En un estudio de diversidad genética mediante marcadores moleculares ISSR, realizado en India con individuos provenientes de varias especies de *Jatropha*, se formaron agrupaciones claramente definidas entre especies, siendo más cercanas aquellas que tenían características morfológicas similares, pero en el caso de los individuos de *J. curcas* morfológicamente diferentes debido a que fueron colectadas en lugares geográficos con características ambientales distintas, también se agruparon de acuerdo a sus similitudes morfológicas (Vijayanand *et al.*, 2009).

4.4 Conclusiones

Las tres especies estudiadas están claramente diferenciadas genéticamente, sin embargo, hay una mayor similitud entre *J. rzedowskii* y *J. neopauciflora*, que cualquiera de éstas con *J. pseudocurcas*.

Debido a la reducida distribución geográfica de *J. rzedowskii* y *J. pseudocurcas*, es necesario su colecta de germoplasma y resguardo para iniciar una colección núcleo, y así favorecer su conservación además de ser las especies que mayor diversidad genética aportaron en el estudio.

4.5 Literatura Consultada

- Arellanes Y., Casas A., Arellanes A., Vega E., Blancas J., Vallejo M., Torres I., Rangel-Landa S., Moreno, A.I., Solís L. and Pérez-Negrón E. (2013). Influence of traditional markets on plant management in the Tehuacan Valley. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 9: 38-53.
- Basha S. D., Francis G., Makkar H. P. S. and Sujata M. (2009). A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. *Plant Science*, 176: 812-823.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetic*, 32: 314-331.
- Canales M., Hernández T., Caballero J., Romo De Vivar A., Avila A., Duran, R. and Lira A. (2005). Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlan, Puebla, México. *Journal Ethnopharmacology*, 97: 429-439.
- Dehgan B. 1984. Phylogenetic significance of interspecific hybridization in *Jatropha* (Euphorbiaceae). *Systematic Botany*, 9: 467-478.
- Francis G., Oliver, J. and Sujatha M. (2013). Non-toxic *Jatropha* plants as a potential multipurpose multi-use crop. *Industrial Crops and Products*, 42: 397-401.
- Frankel O.H. (1984). Genetic perspectives of germplasm conservation. In: Arber, W.K., Llimensee, K., Peacock, W.J. (Eds.), *Genetic Manipulation: Impact on Man and Society*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 161–170.
- Fresnedo-Ramírez J. and Orozco-Ramírez Q. (2013). Diversity and distribution of genus *Jatropha* in Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60:1087-1104.
- Garcia A and Delgado G. (2006). Cytotoxic cis-fused bicyclic sesquiterpenoids from *Jatropha neopauciflora*. *Journal of Natural Product*, 69: 1618-1621.
- Hernandez N.N.Y., Cordova L., Luna M., Romero A. and Jiménez J. (2016). Morphological variation related with environmental factors in endemic and threatened *Jatropha* species of Tehuacan-Cuicatlan, Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, DOI 10.1007/s10722-016-0383-2.
- Lim, B.Y., Shamsudin R., Baharudin B. T. H. and Yunus R. (2015). A review of processing and machinery for *Jatropha curcas* L. fruits and seeds in

- biodiesel production: Harvesting, shelling, pretreatment and storage. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52: 991-1002.
- Liu B.H. (1998). Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis. CRC Press, Boca Raton. 648 p.
- Montes J, M., Technow F., Martin M. and Becker K. (2014). Genetic diversity in *Jatropha curcas* L. assessed with SSR and SNP markers. *Diversity*, 6: 551-566.
- Mukherjee P., Varshney A., Johnson T. S. and Baran J. T. (2011). *Jatropha curcas*: a review on biotechnological status and challenges. *Plant Biotechnology Reports*, 5: 197-215.
- Nei M. (1973). Analysis of genetic diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National of Academic Science*, 70 (12): 3321-3323.
- Nooryazdan H., Serieys H., Baciliéri R., David J. and Bervillé A. (2010) Structure of wild annual sunflower (*Helianthus annuus* L.) accessions based on agro-morphological traits. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 57: 27–39.
- Odong T.L., Jansen J., van Eeuwijk F. A. and van Hintum T. J. L. (2013). Quality of core collections for effective utilization of genetic resources review, discussion and interpretation. *Theoretical Applied Genetics*, 126: 289-305.
- Patcharin T., Puntaree T., Yaowanarat H. and Peerasak S. (2011). Genetic diversity among *Jatropha* and *Jatropha* species based on ISSR markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29: 252–264.
- Peakall R. and Smouse P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288–295.
- Pullaiah T. and Bahadur B. (2013). Economic and Medicinal importance of *Jatropha*. In: *Jatropha, Challenges for a New Energy Crop* 187-217 p.
- Rohlf F. J. (1993). NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.80. Setauket, New York: Applied Biostatistics Inc. (distributed by Exeter Software, Setauket, New York).
- Rodríguez M. A., Vega-Flores K., Gante-Cabrera V. H. and Jiménez-Ramírez J. (2009). Distribución del género *Jatropha* L. (Euphorbiaceae) en el estado de Puebla, México. *Polibotánica*, 28: 37-48.
- Sharma S.K. and Singh H. (2012). A review on pharmacological significance of genus *Jatropha* (Euphorbiaceae). *Chinese Journal Integrative Medicine*, 18 (11): 868-880.

- Sihna P., Islam M. A., Negi M. S. and Tripathi S. B. (2016). First identification of core accessions of *Jatropha curcas* from India based on molecular genetic diversity. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 14 (1): 77-80.
- Sivalingam P. N., Singh D., Chauhan S., Chandal H.K., Bhan C., Mohapatra T., More T.A., Sharma S.K. (2014) *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 12 (1): 140-142.
- Speer M.J. (1999). Genetic linkage: concepts and methods. In: Albers MJ (ed) *Genetics of cerebrovascular disease*. Blackwell, Oxford, 25-26 p.
- Sudheer P. V. N., Nirali P., Reddy M. P. and Radhakrishnan, T. (2009). Comparative study of interspecific genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* by RAPD and AFLP. *Molecular Biology Reports* 36: 901–907.
- Steinmann V.W. (2003). Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. *Acta Botanica Mexicana*, 61: 61-93.
- Yeh F.C., Young, R.C., Timothy, B., Boyle, T. B. J. and Ye, Z.H., Mao, J.X. (1997). POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada.