



## Detoxificación de la torta residual de *Jatropha curcas* L. mediante hongos endófitos

Teresa de Jesús Flores-Chilel, María de Lourdes Adriano-Anaya, Isidro Ovando-Medina, Sonia Ruiz-González\*

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

### Resumen

En este trabajo se diseñó un proceso de fermentación en estado sólido para la detoxificación de la torta residual de la planta *Jatropha curcas* utilizando hongos endófitos. Para esto, harinas (desgrasadas con hexano) con testa y sin testa se mezclaron (40 g) con  $1 \times 10^9$  esporas de hongo, al 50% de humedad, y se incubaron durante 10 días a 28 °C y 80% de humedad relativa, en un ambiente oscuro. Se siguió un diseño factorial completo  $2^k$  (presencia/ausencia de 4 hongos=16 tratamientos) para cada tipo de pasta residual. Para evaluar la capacidad detoxificante, se hicieron extractos hexánicos y metanólicos de los fermentados, y se realizaron pruebas de letalidad sobre *Artemia salina* calculando las  $CL_{50}$  mediante análisis de regresión. Los fermentados que contuvieron la testa de la semilla mostraron mayor toxicidad ( $CL_{50}=36.1 \pm 2.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) que aquellos preparados con harina de la almendra sin testa ( $CL_{50}=126.6 \pm 6.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Los extractos hexánicos del tratamiento 1 sin testa (control, T1) presentaron alta toxicidad ( $CL_{50}=9.2 \pm 0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) comparados los del tratamiento 11 sin testa (T11: *Penicillium* sp. CDCU-3 y *Nigrospora* sp. CHIC-1) que presentó un fenómeno de detoxificación con  $CL_{50}$  de  $803.7 \pm 50.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , es decir, 87 veces menos tóxico que el T1. Además, el T11 presentó más contenido de proteína soluble que el resto de los fermentados ( $F=8.006$ ,  $P<0.001$ ).

### Palabras clave:

$CL_{50}$   
Antinutrientes  
*Artemia salina*  
Ésteres de forbol

### Keywords:

$LC_{50}$   
Antinutrients  
*Artemia salina*  
Phorbol esters

## Detoxification of *Jatropha curcas* L. seed cake using endophytic fungi

### Abstract

In this work, a solid-state fermentation process was designed for the detoxification of the residual cake of the *Jatropha curcas* plant using endophytic fungi. For this, flour (defatted with hexane) with and without seed coat were mixed (40 g) with  $1 \times 10^9$  fungal spores, at 50% humidity, and incubated for 10 days at 28 °C and 80% relative humidity, in a dark environment. A complete  $2^k$  factorial design (presence / absence of 4 fungi=16 treatments) was followed for each type of residual paste. To evaluate the detoxifying capacity, hexane and methanolic extracts were made from the ferments, and lethality tests were performed on *Artemia salina* calculating the  $LC_{50}$  by means of regression analysis. Those ferments that contained the seed coat showed higher toxicity ( $LC_{50}=36.1 \pm 2.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) than those prepared with almond flour without seed coat ( $LC_{50}=126.6 \pm 6.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Hexane extracts from treatment 1 without seed coat (control, T1) presented high toxicity ( $LC_{50}=9.2 \pm 0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) compared to treatment 11 without seed coat (T11: *Penicillium* sp. CDCU-3 and *Nigrospora* sp. CHIC-1) which presented a detoxification phenomenon with  $LC_{50}$  of  $803.7 \pm 50.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , that is, 87 times less toxic than T1. Furthermore, T11 had more soluble protein content than the rest of the treatments ( $F=8.006$ ,  $P<0.001$ ).

### \* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,  
Universidad Autónoma de  
Chiapas.  
Boulevard Príncipe Akishino  
sin número. Colonia  
Solidaridad 2000, CP. 30798.  
Tapachula, Chiapas, México.  
Teléfono: + 52 9626427972  
ext. 106.  
Correo-electrónico:  
[sony.ruizgonzalez@gmail.com](mailto:sony.ruizgonzalez@gmail.com)

## 1. Introducción

La planta *Jatropha curcas*, que pertenece a la familia Euphorbiaceae se ha caracterizado por ser un nuevo cultivo industrial (Kalam et al., 2012; Lim-Meng-Hon, 2010; Pandey et al., 2012), donde sus semillas son utilizadas como fuente principal de aceites para la producción de biocombustibles (Behera et al., 2010; Dharma et al., 2016). Sin embargo, la naciente industria agroenergética genera una serie de co-productos con bajo valor comercial (Becker y Makkar, 2008; Makkar y Becker, 2009), que incluso pueden convertirse en un problema ambiental. Los dos co-productos más abundantes son la torta residual de la semilla (Rodríguez-Calle et al., 2016) y el glicerol derivado de la transesterificación del aceite (Díaz, 2013), de tal manera que el incremento en la utilización de los derivados, en especial de la torta residual, puede aumentar el valor de la cadena de producción (Becker y Makkar, 2008; Devappa et al., 2010b; Ovando-Medina et al., 2009).

Además de su importancia como agroenergético, *J. curcas* tiene características nutrimentales que le confieren potencial para la alimentación de animales, por lo que es cultivada en diversos países y ha sido objeto de numerosos estudios para el aprovechamiento de su proteína y aceite (Bueso et al., 2016; Martínez-Herrera, 2008; Valdés-Rodríguez et al., 2013).

La torta residual de las semillas de *J. curcas* se destaca por su alto contenido de proteína (23-28%) y de lípidos residuales (2-5%); (Castillo et al., 1991; Martínez et al., 2010; Martínez-Herrera et al. 2006; Rodríguez-Calle et al., 2016). Sin embargo, su uso para tal fin se ve limitado por la presencia de compuestos tóxicos (ésteres de forbol) y antinutrientes (lectinas, curcinas, saponinas) (Devappa et al., 2012; Harry-Asobara y Samson, 2014; Makkar et al., 2008; Osorio, 2016; Pecina-Quintero et al., 2014; Rakshit et al., 2008).

El consumo de la torta residual sin detoxificar causa daños en animales (Berenchtein et al., 2014). Makkar y Becker (2009) publicaron que en ovinos y caprinos alimentados durante 14 días manifestaron síntomas de intoxicación con dosis tan bajas como 0.025 g kg<sup>-1</sup>, mientras que con dosis altas (0.25 g kg<sup>-1</sup>) el deceso ocurre en menos de 19 h después de su consumo. Entre los daños que ocasiona la ingesta de la torta sin detoxificar se encuentran la promoción tumoral, proliferación celular, dificultad respiratoria, postración y muerte (Devappa et al., 2010a; Jiménez et al., 2015; Martínez-Herrera et al., 2006).

Como alternativa se ha propuesto la detoxificación de la torta residual (López et al., 2012; Molina, 2016; Zhang et al., 2016), obteniéndose resultados parcialmente exitosos con métodos físicos y químicos. Asimismo, se han desarrollado procesos de detoxificación biológica, como los estudios de Joshi et al. (2011), que utilizando cepas de *Pseudomonas*, lograron disminuir la concentración de ésteres de forbol. En el mismo sentido, Phengnuam y Suntornsuk (2013) observaron la degradación de compuestos tóxicos y antinutricionales en la torta de

semillas con aplicación de *Bacillus licheniformis* en fermentación sumergida.

También se ha evaluado el uso de cepas de hongos del grupo de los deuteromicetos aislados del suelo o de otras plantas para la detoxificación de la fracción rica en ésteres de forbol y los antinutrientes en medio líquido (Najjar et al., 2014), logrando la detoxificación hasta en un 50%. Incluso, se evaluó el crecimiento del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* sobre la torta residual de *J. curcas*, encontrando que puede degradar los factores antinutricionales con reducciones de 95% del ácido fítico y 85% de taninos (Da Luz et al., 2013).

Por otra parte, hongos endófitos aislados de distintas partes de *J. curcas*, por ejemplo de la hoja (Kumar y Kaushik, 2013), del tallo (Li et al., 2005) y de la semillas (Hedge et al., 2009; Jayaraman et al., 2011; Tiwari et al., 2012) han demostrado tener actividades biológicas potencialmente útiles. Los hongos endófitos pueden aumentar el crecimiento, acelerar el desarrollo o mejorar la resistencia a estrés ambiental de la planta hospedadora. Además, pueden reducir la incidencia y proteger de infecciones causadas por microorganismos patógenos (Arnold, 2007; Rodríguez-Calle et al., 2016). Estos hongos por ser simbioses podrían ser capaces de metabolizar las moléculas tóxicas de la planta.

A la fecha no se han reportado estudios sobre detoxificación de la torta residual con hongos de la misma planta, por lo cual, el objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad de hongos endófitos de *J. curcas* para detoxificar la torta residual del proceso de extracción de aceite de las semillas de dicha planta.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Materia prima

Se obtuvieron frutos de *Jatropha curcas* de la acesión MAP-08 del Banco de Germoplasma del Instituto de Biociencias (BG-IBC) de la Universidad Autónoma de Chiapas. El BG-IBC está ubicado en Tapachula Chiapas, en el sur de México (14.4976° N, 92.4774° O, 58 msnm; temperatura promedio anual de 30.7 °C, humedad relativa media anual de 80%, precipitación media anual de 2,600 mm). A partir de los frutos se obtuvieron 10 kg de semillas secas, que fueron divididas en dos porciones: 6 kg sin testa (quedando solamente la almendra sin la envoltura de la semilla) y 4 kg completas (sin remoción de la testa).

#### 2.1.1. Obtención y desgrasado de la torta residual de *J. curcas*

Las semillas con y sin testa fueron trituradas utilizando un procesador de alimentos hasta obtener las harinas correspondientes. Posteriormente se hicieron tres extracciones secuenciales sólido-líquido, usando hexano en proporción 1:4, descartando la fase hexánica por decantación. La torta residual se expuso al aire durante 8 h para eliminación del solvente.

2.2. Material biológico

Se utilizaron cuatro hongos endófitos (*Nigrospora* sp. cepa CHIC-1, *Trichoderma* sp. cepa MAP-7, *Penicillium* sp. cepa ARR-15, *Penicillium* sp. cepa CDCU-3; Figura 1), que fueron aislados de tallos de cuatro accesiones de *J. curcas* del BG-IBC que producen semillas tóxicas. Las colonias se reactivaron inoculando fracciones de micelio en medio de cultivo ADP (agar-dextrosa-papa) en placa de Petri, permitiendo el crecimiento durante 7 d a 28 °C. Posteriormente, se indujo la esporulación en botellas de

Roux con medio ADP, sembrando un fragmento de 0.5 mm<sup>2</sup> de medio con micelio y esporas en 1 mL de solución Ringer con cinco perlas de ebullición. Se incubaron durante 15 d a 28 °C, después de este tiempo, se lavaron las esporas con 50 mL de solución Ringer. A partir de las suspensiones se tomaron alícuotas representativas, se cuantificaron las esporas en cámara de Neubauer y se estimó la concentración total. Las suspensiones de esporas se guardaron en frascos de vidrio en refrigeración hasta su uso.

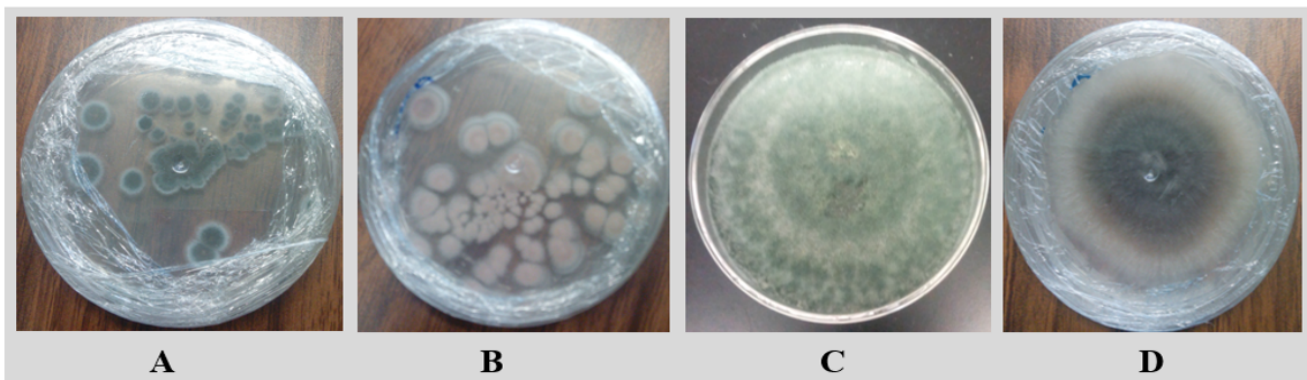


Figura 1. Cepas de hongos utilizadas para la fermentación en estado sólido de la torta residual de *Jatropha curcas*. A) *Penicillium* sp. cepa ARR-15, B) *Penicillium* sp. cepa CDCU-3, C) *Trichoderma* sp. cepa MAP-7 y D) *Nigrospora* sp. cepa CHIC-1.

2.3. Fermentación en estado sólido de la torta residual de *J. curcas*

Se prepararon pasteles con la torta residual (40 g) mezcladas con 1x10<sup>9</sup> esporas de hongo en agua estéril, suficiente para alcanzar 50% de humedad (p/p), colocadas en bolsas de polipapel, selladas y moldeadas (10 x 10 cm por lado y 1 cm de grosor). Los pasteles fueron incubados en oscuridad durante 10 d a 28 °C, y 80% H.R. Se verificó

el crecimiento fúngico al inicio y al final, y se guardaron los fermentados en refrigeración hasta su evaluación.

Para determinar el efecto de los cuatro hongos endófitos se utilizó un diseño factorial completo 2<sup>k</sup> (dos niveles: presencia o ausencia del hongo; cuatro factores: cuatro hongos), dando un total de 2<sup>4</sup>=16 tratamientos (Cuadro 1). Se tuvieron cuatro repeticiones, consistentes en un pastel.

Cuadro 1. Diseño de tratamientos para la fermentación sólida de la torta residual de *Jatropha curcas* (factorial completo 2<sup>4</sup>).

Tratamientos	Cepa de hongo endófito			
	<i>Penicillium</i> sp. ARR-15	<i>Penicillium</i> sp. CDCU-3	<i>Trichoderma</i> sp. MAP-7	<i>Nigrospora</i> sp. CHIC-1
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	+	-	-
4	+	+	-	-
5	-	-	+	-
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	+
13	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
16	+	+	+	+

Presencia (+), ausencia (-).

## 2.4. Evaluación de la capacidad detoxificante de los hongos

### 2.4.1. Obtención de extractos de los fermentados

Se realizaron dos tipos de extractos, hexánico y metanólico, de cada repetición de los fermentados, tomando 0.5 g de muestra que fueron macerados en 4.5 mL de solvente en un mortero. La suspensión obtenida se transfirió a un tubo de ensayo de 13 x 100 mm con tapa de rosca y se refrigeró (4 °C) por 48 h. Enseguida se extrajo con una pipeta el sobrenadante, que fue centrifugado a 2320 g por 5 min. El nuevo sobrenadante se transfirió a microtubos de 2 mL previamente puestos a peso constante. Los tubos se colocaron en un horno a 50 °C durante 24 h para evaporar el solvente y obtener el extracto seco, el cual se pesó en balanza analítica y, por diferencia, se determinó el rendimiento. Los extractos secos se re-disolvieron en 100 µL de dimetil-sulfóxido y se hicieron diluciones con agua de mar a concentraciones conocidas.

### 2.4.2. Obtención de nauplios de *Artemia salina*

Para la prueba de letalidad se usaron nauplios del microcrustáceo *A. salina*. Para esto, se eclosionaron 0.5 g de quistes de *A. salina* procedentes del Great Salt Lake (Utah, E.U.A.). El procedimiento consistió en el lavado e hidratación de los quistes con agua corriente durante 30 min para posterior decapsulación en una mezcla de 32 mL de NaClO (6% de cloro libre), 3 mL de NaOH (35%) y 120 mL de agua de mar hasta la obtención de un color naranja. Los quistes decapsulados fueron lavados con agua corriente e incubados durante 24 h en un litro de agua de mar en un eclosionador cilíndrico, con iluminación ( $7.9 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), 28 °C y aireación (1 vvm). Se tomaron muestras a las 24 h y 48 h para verificar la obtención de nauplios, bajo el estereoscopio.

### 2.4.3. Determinación de la concentración letal media ( $CL_{50}$ )

Se utilizaron placas de 24 pozos con capacidad de 3 mL por pozo para evaluar el efecto de distintas concentraciones de extracto hexánico o metanólico (0.1, 1, 10, 100 y 1000 µg mL<sup>-1</sup>) en la sobrevivencia de nauplios de primer estadio. En cada pozo individual se colocaron 50 µL de extracto a la concentración deseada, 400 µL de agua de mar y 50 µL de la suspensión de eclosión con 10 nauplios vivos de primer estadio. Como control se tuvieron pozos a los que se agregaron 50 µL de una mezcla de agua de mar con dimetil-sulfóxido en lugar del extracto. Después de 24 h de incubación bajo iluminación ( $7.9 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a 28 °C, se contó bajo el estereoscopio el número de nauplios muertos (inmovilidad por al menos 10 s) y sobrevivientes. Se calcularon las  $CL_{50}$ , por tratamiento y por tipo de extracto.

## 2.5. Caracterización química de los fermentados detoxificados

Se realizó la caracterización química de los fermentados correspondientes a los tratamientos T1 sin testa (sin hongo), T1 con testa (sin hongo), T11 sin testa (*Penicillium* sp. cepa CDCU-3 y *Nigrospora* sp. cepa CHIC-1) y T13 con testa (*Trichoderma* sp. cepa MAP-7 y *Nigrospora* sp. cepa CHIC-1).

### 2.5.1. Determinación de humedad

Se determinó el contenido por gravimetría usando el secado en horno. Para esto, se calculó el peso constante de los crisoles y se les agregó  $1 \pm 0.05$  g de muestra. Después se colocaron los crisoles en el horno a 105 °C durante 24 h, transcurrido ese tiempo, se enfriaron en el desecador y se tomó el peso del crisol con la muestra seca (NOM-116-SSA1-1994).

### 2.5.2. Cenizas

Se determinó el contenido de cenizas por calcinación en mufla, para lo cual se utilizaron las muestras secas provenientes del análisis de humedad. Se calcinaron las muestras a 550 °C, durante 4 h, se enfriaron en desecador y se pesaron (NMX-F-066-S-1978).

### 2.5.3. Contenido de saponinas

Se utilizó la metodología descrita por Makkar et al. (2007) para la extracción de saponinas de las muestras (1 g), mezclando 10 mL de metanol al 80% con 1 g de muestra y llevadas a un agitador orbital HZ-300 Luzeren, durante 20 min y a centrifugación a 1340 g durante 10 min en el equipo Eppendorf Centrifuge 5403. Una vez centrifugado, se tomaron 20 µL del sobrenadante que fueron mezclados con 230 µL de metanol, 250 µL de vainillina (1.6 g de vainillina diluido en 20 mL de metanol) y 2.5 mL de ácido sulfúrico (72%). Se midió la absorbancia a 544 nm con el espectrofotómetro Genesys 20 y se estimó la concentración a partir de una curva de calibración usando diosgenina (Sigma, EUA) a concentraciones de 0 a 250 µg mL<sup>-1</sup>. Los resultados fueron expresados en porcentaje de diosgenina.

### 2.5.4. Proteína total

Se determinó el contenido de proteína total de los fermentados utilizando el método de Kjeldahl para nitrógeno. Inicialmente se pesó 0.5 g de muestra, se colocó la muestra en un tubo donde se añadió 2 g de catalizador y 8 mL de ácido sulfúrico concentrado para digestión a 420 °C durante 60 min. Posteriormente se añadió 80 mL de agua destilada y 50 mL de NaOH al 40%. A continuación se destiló la muestra recibiendo el destilado en 25 mL de ácido bórico al 4% hasta que viró a color verde. Finalmente, se titularon las muestras con una solución de HCl valorada hasta viraje a color violeta claro (NOM-F-068-S-1980). Con los resultados se calculó el porcentaje de nitrógeno total y para obtener el contenido de proteína se multiplicó por el factor 6.25.

### 2.5.5. Proteína soluble

Se determinó el contenido de proteína soluble en los fermentados por el método de Bradford (1976). Para ello, se maceró 1 g de fermentado en 9 mL de buffer de fosfatos (pH 7.0), se filtró la suspensión y se tomaron 20 µL del filtrado. Se añadieron 780 µL de agua destilada y 200 µL de reactivo de Bradford y se midió la absorbancia a 595 nm. Se estimó el contenido de proteína en porcentaje a partir de una curva patrón de albúmina (0-20 µg mL<sup>-1</sup>).

### 2.5.6. Carbohidratos totales

Para determinar el contenido de carbohidratos totales se siguió el método de Dubois et al., (1956), para ello, se

maceraron 50 mg de fermentado en 50 mL de agua destilada, de esta mezcla se transfirió 1 mL de la suspensión a un tubo de ensayo de 13 x 100 mm y se adicionaron 0.6 mL de una solución acuosa de fenol al 5%. Se mezcló y se añadieron 3.6 mL de ácido sulfúrico concentrado. Dicha mezcla se dejó 30 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 480 nm. Se estimó el contenido de carbohidratos, en porcentaje, a partir de una curva patrón de glucosa preparada en el intervalo 0-50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 2.5.7. Lectinas y curcinas

La determinación del contenido de lectinas y curcinas se realizó mediante el ensayo de hemaglutinación reportado por Makkar et al. (1997). Antes de realizar la extracción la muestra se desgrasó en frío con solución de cloroformo: metanol (2:1) de la siguiente manera: se agregaron 4 mL de solución por gramo de muestra, se agitó durante 30 min y se filtró, esta operación se repitió 3 veces, una vez que se concluyeron los lavados, la muestra se dejó secar a temperatura ambiente para su posterior utilización. Para obtención del extracto se maceró 1 g de muestra desgrasada en 5 mL de buffer Tris-HCl (50 mM, pH 8.0), se agitó durante 12 h a 28 °C en un agitador orbital HZ-3000 Luzeren, seguido de un filtrado. Se transfirieron 100  $\mu\text{L}$  de extracto a un pozo de una placa de microtitulación y se hicieron diluciones seriadas 1: 2 con buffer fosfato salino (PBS 1X, pH 7.0), para lo cual a 50  $\mu\text{L}$  de buffer se le agregaban 50  $\mu\text{L}$  de la dilución previa. Las concentraciones de los pozos variaron desde 66.6 hasta 0.0020  $\text{mg mL}^{-1}$ . Posteriormente, se agregó a cada pozo 50  $\mu\text{L}$  de una solución de eritrocitos en PBS al 0.05%. Se incubaron las placas durante 2 h a 37 °C y se observó bajo el microscopio para determinar si había o no aglutinación de eritrocitos. El contenido de lectina se determinó indirectamente al medir la actividad hemaglutinante expresada como la cantidad mínima del material del estudio (en  $\text{mg mL}^{-1}$  del medio de ensayo) que produce aglutinación. Para conocer el contenido de curcina se utilizó la siguiente fórmula: Curcina ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) =  $2^n / \text{mg}$  de proteína soluble en la muestra; donde n: es el número del pozo en el cual no se presenta la aglutinación.

### 2.6. Análisis estadístico

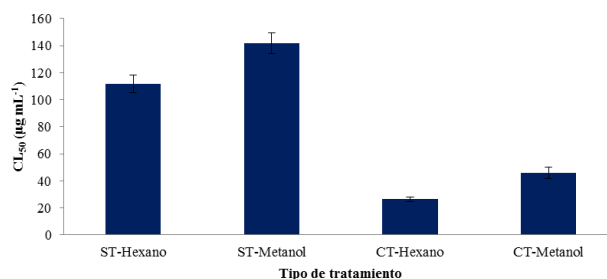
Para determinar las  $\text{CL}_{50}$  de cada uno de los tratamientos se hicieron análisis de regresión donde se utilizó un software BioStat© v. 2009. Los datos de composición de los fermentados se procesaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y donde hubo diferencias significativas se compararon las medias de los tratamientos (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1. Toxicidad de los extractos de los fermentados

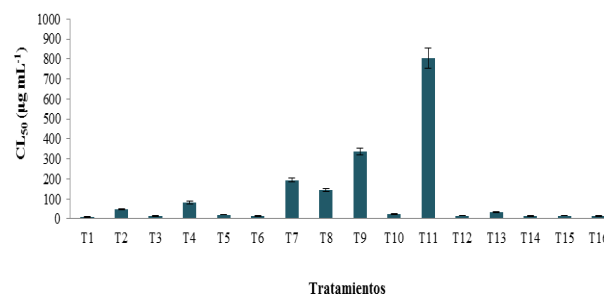
Se encontró que los extractos de fermentados que contuvieron la testa de la semilla son más tóxicos ( $\text{CL}_{50}=36.1\pm 2.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) que los preparados con harina de la almendra sin testa ( $\text{CL}_{50}=126.6\pm 6.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). En la Figura 2 se muestran las medias globales de las  $\text{CL}_{50}$  de los

tratamientos fermentados con o sin testa, de acuerdo al tipo de extracto, donde se observa que los extractos hexánicos presentan ligeramente mayor toxicidad que los metanólicos ( $\text{CL}_{50}$  1.2 veces menor en el caso de los fermentados sin testa y  $\text{CL}_{50}$  1.7 veces menor en el caso de los fermentados con testa).



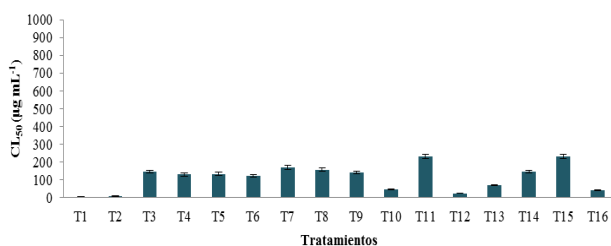
**Figura 2.** Toxicidad ( $\text{CL}_{50}$ ) de los extractos hexánicos y metanólicos de fermentados con (CT) y sin testa (ST).

El análisis por tipo de solvente y de materia prima mostró que los extractos hexánicos de fermentados sin testa difirieron en toxicidad de acuerdo a los inóculos utilizados en la fermentación. En la Figura 3 se observa que el extracto del T1 (sin inóculo fúngico) tiene muy alta toxicidad ( $\text{CL}_{50}=9.2\pm 0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), la cual se mantuvo en la mayoría de los tratamientos, sin embargo, en cuatro de ellos (T7, T8, T9 y T11) se presentó un fenómeno de detoxificación, siendo T11 (*Penicillium* sp. cepa CDCU-3 y *Nigrospora* sp. cepa CHIC-1), con valor de  $\text{CL}_{50}$  de  $803.7\pm 50.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , el que presentó menor toxicidad (87 veces menos que el T1).



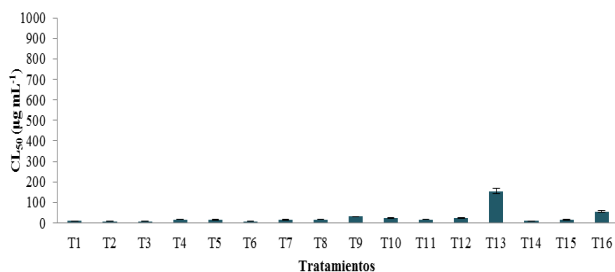
**Figura 3.** Toxicidad ( $\text{CL}_{50}$ ) de los extractos hexánicos de fermentados sin testa.

Los extractos metanólicos de fermentados sin testa también difirieron en toxicidad de acuerdo a los inóculos utilizados en la fermentación. En la Figura 4 se observa que el extracto del T1 (sin inóculo fúngico) tiene alta toxicidad ( $\text{CL}_{50}=6.4\pm 1.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) en comparación con los tratamientos fermentados. El T11 (*Penicillium* sp. cepa CDCU-3 y *Nigrospora* sp. cepa CHIC-1) y el T15 (*Penicillium* sp. cepa CDCU-3, *Trichoderma* sp. cepa MAP-7 y *Nigrospora* sp. cepa CHIC-1), con valores de  $\text{CL}_{50}$  de  $231.3\pm 10.7 \mu\text{g mL}^{-1}$  y de  $232.0\pm 10.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, presentaron menor toxicidad (36 veces menos que el T1).



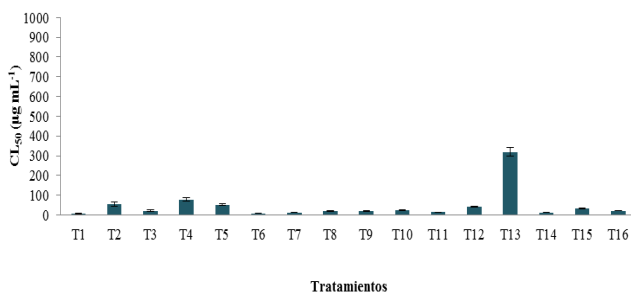
**Figura 4.** Toxicidad (CL<sub>50</sub>) de los extractos metanólicos de fermentados sin testa.

Respecto a los extractos hexánicos de fermentados con testa, se observó que la mayoría de los tratamientos fúngicos fueron tan tóxicos como el T1 (sin inóculo fúngico), el cual tuvo una CL<sub>50</sub> de  $9.3 \pm 0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 5), sin embargo, el T13 (*Trichoderma* sp. cepa MAP-7 y *Nigrospora* sp. cepa CHIC-1) presentó un fenómeno de detoxificación, con valor de CL<sub>50</sub> de  $155.0 \pm 12.8 \mu\text{g mL}^{-1}$  (16 veces menos que el T1).



**Figura 5.** Toxicidad (CL<sub>50</sub>) de los extractos hexánicos de fermentados con testa.

Por su parte, los extractos metanólicos de fermentados con testa presentaron CL<sub>50</sub> bajas (alta toxicidad), excepto los del T13 (*Trichoderma* sp. cepa MAP-7 y *Nigrospora* sp. cepa CHIC-1), donde se encontró un valor de CL<sub>50</sub> de  $319.4 \pm 23.2 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 6). Esto representa una toxicidad 53 veces menor que la del T1.



**Figura 6.** Toxicidad (CL<sub>50</sub>) de los extractos metanólicos de fermentados con testa.

La toxicidad de los fermentados puede deberse a los ésteres de forbol presentes en las semillas de *J. curcas*, ya contienen entre  $0.60$  y  $3.56 \text{ mg g}^{-1}$  (Jiménez-Ocampo et al.,

2015) y a otros compuestos tóxicos presentes en *J. curcas*, como las jatrolonas A y B, curculatiranos A y B, y las curcusonas A-D (Ahirrao et al., 2008; Baraguey et al., 1998; Boateng y Kusi, 2008; Correa y Penna, 1974; Igbinsola et al., 2009; Jaikumar et al., 2010; Ravindranath et al., 2004; Yan et al., 2008).

Por otra parte, fue evidente que los fermentados preparados con harina de la almendra sin testa se detoxificaron en comparación con los fermentados que incluyeron la testa de la semilla. Esto es contrario a lo que se conoce de la ubicación de los compuestos tóxicos en la semilla de *J. curcas*, ya que la almendra es varias veces más tóxica que la testa (Abou-Arab y Abou-Salem, 2010). Esta última es un material leñoso fabricado a base de celulosa y lignina que requiere de hidrólisis para su degradación y metabolización por parte de los hongos. Es probable que en los tratamientos sin testa los inóculos fúngicos cubrieran toda la torta residual detoxificándola, mientras que en los tratamientos con testa los hongos fermentaron la materia prima con mayor lentitud al tener que degradar la materia lignificada resultando insuficiente el periodo experimental para la degradación. A lo anterior se añade el hecho de que los tratamientos con testa eran heterogéneos (mezcla de la torta de la almendra con fragmentos de testa), lo cual pudo provocar que los inóculos fúngicos no cubrieran totalmente la torta a fermentar.

No obstante, hubo algunos tratamientos con testa que fueron detoxificados, en particular el tratamiento 13 (*Trichoderma* sp. cepa MAP-7 y *Nigrospora* sp. cepa CHIC-1), el cual tuvo altos valores de CL<sub>50</sub> tanto en los extractos hexánicos (Figura 5), como en los metanólicos (Figura 6). Los fermentados de este tratamiento arrojaron bajo contenido de saponinas ( $0.67 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ), comparado con los valores reportados para la semilla de *J. curcas* ( $1.51 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) reportados por Abou-Arab y Abou-Salem (2010); sin embargo, se detectaron lectinas y curcinas en este tratamiento (Cuadro 2).

Los tratamientos que indujeron detoxificación fueron fermentados con el hongo *Nigrospora* sp. cepa CHIC-1 (tratamientos 9, 11 y 13), por lo que es posible que dicha cepa sea la responsable del proceso de degradación de las sustancias tóxicas (probablemente los ésteres de forbol). La evidencia señala que su acción detoxificante se potencia cuando el hongo está combinado con otras cepas (Belew y Sam, 2010), probablemente porque la degradación de las moléculas tóxicas se haga en varias etapas usando las maquinarias metabólicas de varios microorganismos.

### 3.2. Caracterización química de los fermentados detoxificados

Se encontró que la fermentación en estado sólido influyó significativamente ( $F=10.957$ ,  $P<0.001$ ) en el contenido de humedad, siendo el tratamiento 11 sin testa el que presentó mayor humedad (57.04%). En el contenido de cenizas se encontraron diferencias significativas en los tratamientos ( $F=9.889$ ,  $P<0.001$ ), resultando que los tratamientos sin

testa tienen mayor contenido de cenizas que los tratamientos con testa, independientemente del inóculo para la fermentación (Cuadro 2).

Con respecto a la proteína soluble el tratamiento 11 sin testa fue estadísticamente superior al resto de los tratamientos ( $F=8.006$ ,  $P<0.001$ ), con valor de  $40.71 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ . Sin embargo, en el contenido de proteína total no se encontraron diferencias entre los tratamientos ( $F=0.242$ ,  $P=0.865$ ).

Con relación al contenido de carbohidratos totales, el tratamiento 11 sin testa fue estadísticamente superior al

resto de los tratamientos ( $F=11.328$ ,  $P<0.001$ ) con valor de 4.99%.

Para el contenido de saponinas se encontró que el tratamiento sin inóculo fúngico (11 sin testa) tuvo valores mayores ( $2.29 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) a los fermentados detoxificados ( $F=46.367$ ,  $P<0.0001$ ). Con respecto a las lectinas y curcinas, los tratamientos con testa presentaron dichos compuestos tóxicos, mientras que en los tratamientos sin testa no se detectaron (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Caracterización de los tratamientos fermentados con y sin testa de pasta residual de *J. curcas*.

Tratamientos	Humedad (%)	Cenizas (%)	Proteína soluble ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ )	Proteína total (%)	Carbohidratos totales (%)	Saponina (%)	Lectina ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	Curcina ( $\text{mg mL}^{-1}$ )
T1ST	52.47 B*	9.27 A	32.50 B	32.75 A	2.07 B	2.29A	ND	ND
T1CT	49.56 B	7.77 B	35.13 B	36.72 A	3.51 AB	0.65 C	33.3	0.108
T11ST	57.04 A	8.96 A	40.71 A	36.66 A	4.99 A	1.85 B	ND	ND
T13CT	52.19 B	7.51 B	34.17 B	31.11 A	3.33 B	0.67 C	33.3	0.128

T1ST: Tratamiento 1 sin testa, T1CT: Tratamiento 1 con testa, T11ST: Tratamiento 11 sin testa, T13CT: Tratamiento 13 con testa, ND: No detectado, \*Letras distintas en cada columna indican medias estadísticamente distintas (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

El contenido de humedad de la torta residual de *J. curcas* oscila entre 3% y 10% (Rodríguez-Calle et al., 2016). Montes et al. (2011), encontraron que las pastas de semillas procedentes de Paraguay y Argentina contienen  $6.50\pm 0.10\%$  y  $7.20\pm 0.10\%$ , respectivamente. En otro estudio reportaron valores de 3.8% de humedad en la torta residual (Rodríguez-Calle et al., 2016). Sin embargo, en los fermentados obtenidos en el presente estudio se encontraron valores más altos (por encima de 50%), lo cual se debe al 50% de humedad que se adicionó a la torta residual para que se llevara a cabo el proceso de incubación. El hecho de que los fermentados del tratamiento 11 sin testa presentaran mayor humedad (57%) puede deberse a que el micelio de los hongos crecieron más que en los otros tratamientos, formando una red que retuvo la humedad.

Por su parte, el contenido de cenizas en los tratamientos con testa fue similar a lo reportado por Rodríguez-Calle et al. (2016), quienes mencionan que la torta residual de *J. curcas* contiene 7.02% de cenizas. No obstante, algunos autores reportan valores ligeramente menores, como Makkar et al. (1998) y Martínez-Herrera et al. (2006), quienes encontraron contenidos de ceniza que oscilaron entre 4.4% y 4.8%. El hecho de que los tratamientos con testa tuvieran estadísticamente menor cantidad de cenizas se debe a que la testa está hecha de un material poroso (paredes celulares lignificadas de baja densidad) que rinde baja cantidad de cenizas.

Por otro lado, la proteína soluble de los fermentados arrojaron valores inferiores a los reportados por Jarma et al. (2014) para la torta residual de *J. curcas* ( $1208 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ). Sin embargo, el tratamiento 11 sin testa fue superior al resto de tratamientos, lo cual le confiere potencial para usos posteriores como alimento animal.

Por su parte, el contenido de proteínas totales en los tratamientos osciló entre 31.11%-36.72%, valores inferiores

a los reportado por Makkar et al. (1998) en la torta residual de *J. curcas* (56.4%), pero superior a lo reportado por Martínez et al. (2010), (23-28%). No obstante, Martínez-Herrera et al. (2006), reportaron valores en la harina de las semillas entre 31-34.5%, coincidiendo con los encontrados en este estudio.

Con respecto al contenido de carbohidratos, el valor más alto encontrado en los tratamientos fue de 4.99%, inferior a estudios realizados por Makkar et al. (1998) y Peralta-Flores et al. (2012), quienes reportaron valores de 15.1% y 35%, respectivamente. Rodríguez-Calle et al. (2016) reportaron valores de 51.9% en la pasta residual de *J. curcas*.

Con lo que respecta al contenido de saponinas de los tratamientos fue similar a lo reportado por Abou-Arab y Abou-Salem (2010), quienes reportaron que la semilla integral de *J. curcas* tiene  $1.51 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  de saponinas,  $2.63 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  en la almendra y  $0.65 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  en la cáscara.

Respecto al contenido de lectinas ( $33.3 \text{ mg mL}^{-1}$ ), los tratamientos fermentados con testa fueron menos tóxicos a lo reportado por Martínez-Herrera et al. (2006) en semillas sin tratar, quienes encontraron valores de tan solo  $1.46 \text{ mg mL}^{-1}$ .

#### 4. Conclusión

Los fermentados que mantuvieron la testa de la semilla fueron más tóxicos ( $CL_{50}=36.1\pm 2.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) que los preparados con harina de la almendra sin testa ( $CL_{50}=126.6\pm 6.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Los extractos hexánicos del tratamiento 1 sin testa (control) presentaron alta toxicidad ( $CL_{50}=9.2\pm 0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), que fue mantenida en la mayoría de los tratamientos. Sin embargo, el tratamiento 11 sin testa (*Penicillium* sp. cepa CDCU-3 y *Nigrospora* sp. cepa CHIC-1) presentó 87 veces menos toxicidad que el tratamiento control sin hongos endófitos ( $CL_{50}=803.7\pm 50.0$

$\mu\text{g mL}^{-1}$ ); Además, este tratamiento presentó más contenido de proteína soluble que el resto de los fermentados ( $F=8.006$ ,  $P<0.001$ ), lo que representa un potencial en el desarrollo futuro de alimentos balanceados para animales.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### Referencias

- Abou-Arab AA, Abu-Salem FM. 2010. Nutritional quality of *Jatropha curcas* seeds and effect of some physical and chemical treatments on their antinutritional factors. *African Journal of Food Science* 4(3): 93-103.
- Ahirrao RA, Pawar SP, Borse LB, Borse SL, Desai SG, Muthu AK. 2008. Anthelmintic activity of leaves of *Jatropha curcas* Linn and *Vitex negundo* Linn. *Pharmacology Online Newsletters* 1: 279-293.
- Arnold AE. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: Progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews* 21(2-3): 51-66.
- Baraguey C, Auvin-Guette C, Blond A, Cavelier F, Levenzen F, Pousset JL, Bodo B. 1998. Isolation, structure and synthesis of chevalierins A, B and C, cyclic peptides from the latex of *Jatropha chevalieri*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* 1998(18): 3033-3040.
- Becker K, Makkar HPS. 2008. *Jatropha curcas*: A potential source for tomorrow's oil and biodiesel. *Lipid Technology* 20(5): 104-107.
- Behera SK, Srivastava P, Tripathi R, Singh JP, Singh N. 2010. Evaluation of plant performance of *Jatropha curcas* L. under different agro-practices for optimizing biomass—a case study. *Biomass and Bioenergy* 34(1): 30-41.
- Belewu MA, Sam R. 2010. Solid state fermentation of *Jatropha curcas* kernel cake: Proximate composition and antinutritional components. *Journal of Yeast Fungal Research* 1(3): 44-46.
- Berenchtein B, Abdalla AL, Do Prado PT, Sbardella M, Louvandini H, Filho ALA, Dhanasekaran D, dos Santos PP. 2014. Effects of detoxified *Jatropha curcas* kernel meal in finishing pig diets on their performance, carcass traits, meat quality and intoxication. *Livestock Science* 165: 100-103.
- Boateng BA, Kusi F. 2008. Toxicity of *Jatropha* seed oil to *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and its parasitoid, *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Journal of Applied Sciences Research* 4(8): 945-951.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2): 248-254.
- Bueso F, Sosa I, Chun R, Pineda R. 2016. Phorbol esters seed content and distribution in Latin American provenances of *Jatropha curcas* L: potential for biopesticide, food and feed. *SpringerPlus* 5(1): 445.
- Castillo HL, Arenas OM, Jiménez A. 1991. Composición química y aspectos nutricionales de la harina desgrasada del piñón mexicano *Jatropha curcas*. *Acta de Ciencia y Tecnología* 40: 73-74.
- Correa MP, Penna LDA. 1974. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Volume 5. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Rio de Janeiro.
- Da Luz JMR, Paes SA, Torres DP, Nunes MD, da Silva JS, Mantonavi HC, Kasuya MCM. 2013. Production of edible mushroom and degradation of antinutritional factors in *Jatropha* biodiesel residues. *LWT-Food Science and Technology* 50(2): 575-580.
- Devappa RK, Becker K, Makkar HPS. 2012. Phytochemicals in *Jatropha* seeds and potential agro-pharmaceutical applications of *Jatropha curcas* phorbol esters. En Carels N, Sujatha M, Bahadur B. (eds.). *Jatropha*, challenges for a new energy crop: Volume 1: Farming, economics and biofuel. Springer. New York. Pp. 383-402.
- Devappa RK, Maes J, Makkar HPS, Greyt WD, Becker K. 2010a. Quality of biodiesel prepared from phorbol Ester extracted *Jatropha curcas* oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 87(6): 697-704.
- Devappa RK, Makkar HPS, Becker K. 2010b. Biodegradation of *Jatropha curcas* phorbol esters in soil. *Journal of the Science Food and Agriculture* 90(12): 2090-2097.
- Dharma S, Masjuki HH, Ong HC, Sebayang AH, Silitonga AS, Kusumo F, Mahlia TMI. 2016. Optimization of biodiesel production process for mixed *Jatropha curcas-Ceiba pentandra* biodiesel using response surface methodology. *Energy Conversion and Management* 115: 178-190.
- Díaz MBH. 2013. Optimización de la producción de biodiesel a partir de aceite vegetal usado a nivel laboratorio y a nivel planta piloto. Tesis. Instituto Politécnico Nacional. México.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PT, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28(3): 350-356.
- Harry-Asobara JL, Samson EO. 2014. Comparative study of the phytochemical properties of *Jatropha curcas* and *Azadirachta indica* plant extracts. *Journal of Poisonous and Medicinal Plants Research* 2(2): 20-24.
- Hedge YR, Chavhan T, Patil SJ. 2009. *Jatropha curcas*-a new host for *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Plant Disease Sciences* 4(2): 230.
- Igbinosa OO, Igbinosa EO, Aiyegoro OA. 2009. Antimicrobial activity and phytochemical screening of stem bark extracts from *Jatropha curcas* (Linn). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 3(2): 58-62.
- Jaikumar S, Ramaswamy S, Asokan BR, Mohan T, Gnanavel M. 2010. Antiulcer activity of methanolic extract of *Jatropha curcas* (Linn.) on aspirin-induced gastric lesions in Wistar stains rats. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 1(4): 886-897.
- Jarma AB, Vanegas OY, Pompelli MF, Garrido PC, Bezerra Neto E, Jarma Orozco A. 2014. Desintoxicación de la torta de *Jatropha curcas* L. como posible alternativa de alimento para ganado bovino en el caribe colombiano. *Revista UDCA Actualidad y Divulgación Científica* 17(1): 171-178.
- Jayaraman P, NesaPriya S, Parameshwari S, Shyamala S, Jawahar N, Sekar H. 2011. Occurrence of storage fungi in



- Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) seeds. African Journal of Microbiology Research 5(5): 474-480.
- Jiménez-Ocampo R, Rosales-Serna R, Rodríguez-González JA, Domínguez-Martínez PA. 2015. Harina de *Jatropha* para la alimentación animal. En: Osuna FJ, Atkinson CJ, Vázquez JMP, Barrios EJ, Hernández M, Rangel SE, Cruz E. Estado del arte en la ciencia y tecnología para la producción y procesamiento de *Jatropha* no tóxica. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, México. Pp. 74-82.
- Jiménez OR, Rosales RS, Rodríguez JAG, Martínez HJ. 2015. Riesgos del uso alimenticio, industrial y agropecuario de la *Jatropha*. Desplegable para productores Núm. 66 INIFAP-CIRNOC- Campo Experimental Valle del Guadiana, Durango, Méx. 2 Pp.
- Joshi C, Mathur P, Khare SK. 2011. Degradation of phorbol esters by *Pseudomonas aeruginosa* PseA during solid-state fermentation of deoiled *Jatropha curcas* seed cake. Bioresource Technology 102(7): 4815-4819.
- Kalam MA, Ahamed JU, Masjuki HH. 2012. Land availability of *Jatropha* production in Malaysia. Renewable and Sustainable Energy Reviews 16(6): 3999-4007.
- Kumar S, Kaushik N. 2013. Endophytic fungi isolated from oil-seed crop *Jatropha curcas* produces oil and exhibit antifungal activity. PloS one 8(2): e56202.
- Li H, Qing C, Zhang Y, Zhao Z. 2005. Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21(8-9): 1515-1519.
- Lim-Meng-Hon J. 2010. *Jatropha* in South East Asia. SEGI Review 3(2): 118-134.
- López A, Gil AG, Bello J. 2012. Alimentos con sustancias tóxicas de origen natural: Plantas superiores alimenticias. En: Cameán A, Repeto M. (eds.) Toxicología alimentaria. Ediciones Diaz-Santos. Madrid, España. Pp. 191-209.
- Makkar HP, Becker K. 2009. *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts. European Journal of Lipid Science and Technology 111(8): 773-787.
- Makkar HP, Martínez-Herrera J, Becker K. 2008. Variations in the seed number per fruit, seed physical parameters and contents of oil and phorbol ester in toxic and non-toxic genotypes of *Jatropha curcas*. Plant Science 3(4): 260-265.
- Makkar HP, Siddhuraju P, Becker K, Harinder PS. 2007. Plant secondary metabolites. Methods in Molecular Biology 393: 1-122.
- Makkar HPS, Becker K, Sporer F, Wink M. 1997. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45: 3152-3157.
- Makkar HPS, Becker K, Schmook B. 1998. Edible provenances of *Jatropha curcas* from Quintana Roo state of Mexico and effect of roasting on antinutrient and toxic factors in seeds. Plant Foods for Human Nutrition 52(1): 31-36.
- Martínez J, Martínez AL, Makkar HPS, Francis G, Becker K. 2010. Agroclimatic conditions, chemical and nutritional characterization of different provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. European Journal of Scientific Research 39(3): 396-407.
- Martínez-Herrera J. 2008. El piñón mexicano: fuente de energía renovable en el estado de Morelos. Memorias del Foro nacional sobre cultivos productores de biodiesel (*Jatropha curcas*, *Ricinus communis*). Aguascalientes, México. Pp. 13-23.
- Martínez-Herrera J, Siddhuraju P, Francis G, Dávila-Ortiz G, Becker K. 2006. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from México. Food Chemistry 96(1): 80-89.
- Molina PC. 2016. Evaluación de varias fuentes de proteína vegetal en dietas para camarón *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Doctorado. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Montes JM, Rodríguez J, Vaca J, Guzmán C, Calandri E. 2011. Characterization of *Jatropha curcas* L. seed and its oil, from Argentina and Paraguay. The Journal of the Argentine Chemical Society 98: 1-9.
- Najjar A, Abdullah N, Saad WZ, Ahmad S, Oskouean E, Gherbawy Y. 2014. Removal of phorbol esters present in *Jatropha curcas* kernel by fungal isolates. International Journal of Agriculture and Biology 16(5): 871-878.
- NMX-F-066-S-1978. 1978. Determinación de cenizas en alimentos. Recuperado de [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4721127&fecha=04/08/1978](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4721127&fecha=04/08/1978).
- NOM-F-68-S-1980. 1980. Alimentos determinación de proteínas. Recuperado de [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4858024&fecha=04/08/1980](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4858024&fecha=04/08/1980).
- NOM-116-SSA1-1994. 1995. Bienes y servicios. Determinación de humedad en alimentos por tratamiento térmico. Método por arena o gasa. Recuperado de [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4868300&fecha=02/02/1995](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4868300&fecha=02/02/1995).
- Osorio RA. 2016. Evaluación de propiedades mecánicas, físicas y estructurales de películas de concentrados proteínicos de *Jatropha curcas* L. y de *Glycine max* L., adicionadas con montmorillonita. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Yautepec de Zaragoza, Morelos, México.
- Ovando-Medina I, Espinosa-García F, Núñez-Farfán J, Salvador-Figueroa M. 2009. Does biodiesel from *Jatropha curcas* represent a Sustainable Alternative Energy Source? Sustainability 1(4): 1035-1041.
- Pandey VC, Singh KS, Kumar A, Singh RP. 2012. *Jatropha curcas*: A potential biofuel sustainable environmental development. Renewable and Sustainable Energy Reviews 16(5): 2870-2883.
- Pecina-Quintero V, Anaya-López JL, Zamarripa-Colmenero A, Núñez-Colín CA, Montes-García N, Solís-Bonilla JL, Jiménez-Becerril MF. 2014. Genetic structure of *Jatropha curcas* L. in México and probable centre of origin. Biomass and Bioenergy 60: 147-155.
- Peralta-Flores L, Gallegos-Tintoré S, Solorza-Feria J, Dávila-Ortiz G, Chel-Guerrero L, Martínez-Ayala A. 2012. Biochemical evaluation of protein fractions from physic nut (*Jatropha curcas* L.). Grasas y Aceites 63(3): 253-259.
- Phengnuam T, Suntornsuk W. 2013. Detoxification and anti-nutrients reduction of *Jatropha curcas* by *Bacillus* fermentation. Journal of Bioscience and Bioengineering 2: 168-172.
- Rakshit KD, Darukeshwara J, Raj KR, Narasimhamurthy K, Saibaba P, Bhagya S. 2008. Toxicity studies of

- detoxified *Jatropha* meal (*Jatropha curcas*) in rats. Food and Chemical Toxicology 46(12): 3621-3625.
- Ravindranath N, Ravinder-Reddy M, Ramesh C, Ramu R, Prabhakar A, Jagadeesh B, Das B. 2004. New lathyrane and podocarpane diterpenoids from *Jatropha curcas*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 52(5): 608-611.
- Rodríguez-Calle RM, Suárez-Hernández J, Támara-Hernández Y. 2016. Caracterización de la torta obtenida del prensado del fruto de *Jatropha curcas*. Pastos y Forrajes 39(1): 72-75.
- Tiwari P, Kannoja P, Pandey A. 2012. *Jatropha* seed borne fungi in the Haryana. International Journal of Advanced Biological Research 2(1): 83-85.
- Valdés-Rodríguez OA, Sánchez-Sánchez O, Pérez-Vázquez A, Caplan J. 2013. The Mexican non-toxic *Jatropha curcas* L., food resource or biofuel? Ethnobotany Research and Applications 11: 1-7.
- Yan R, Gao S, Yang W, Cao M, Wang S, Chen F. 2008. Nickel toxicity induced antioxidant enzyme and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. cotyledons. Plant Soil Environmental 54(7): 294-300.
- Zhang X, Yang Z, Liang J, Tang L, Chen F. 2016. Detoxification of *Jatropha curcas* seed cake in solid-state fermentation of newly isolated endophytic strain and nutrition assesment for its potential utilizations. International Biodeterioration and Biodegradation 109: 202-210.