



Escuela de Ciencias Químicas

DESTOXIFICACION DE LA PASTA DE JOJOBA

INVESTIGACIÓN TECNOLÓGICA

Que para obtener el Título de

QUIMICO

Presenta

Luis Angel Medina Juárez

CENTRO DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS Y TECNOLOGICAS

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

INDICE

	pag.
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE ILUSTRACIONES.	vii
RESUMEN	1
INTRODUCCION.	3
ANTECEDENTES.	5
La planta de Jojoba	5
Composición del Grano y de la Pasta de Jojoba.	
Determinación de la Estructura Química de los	
Tóxicos de la Pasta de Jojoba	9
Destoxificación de la Pasta de Jojoba	10
Comprobación de la Destoxificación de la	
Pasta de Jojoba en Ratas	19
MATERIALES Y METODOS.	23
Materia Prima Utilizada	23
Desgrasado de la Pasta de jojoba.	23
Extracción de Tóxicos	24
Obtención de Estándares Secundarios de	
Simmondsina y Simmondsina -2- Ferulato.	25
Cuantificación de Simmondsina y Simmondsina	
-2- Ferulato	27
Cuantificación de Solubles.	29
Determinación del Punto Isoeléctrico	30

INDICE -- Continuación

RESULTADOS Y DISCUSION	31
Desgrasado de la Pasta de Jojoba	31
Extracción de Tóxicos.	31
Obtención de estándares secundarios de Simmondsina y Simmondsina -2- Ferulato.	32
Cuantificación de Simmondsina -2- Ferulato	33
Destoxificación con Agua.	35
Disminución de la Solubilidad de la Protefna.	44
CONCLUSIONES	48
RECOMENDACIONES.	50
BIBLIOGRAFIA	51

LISTA DE TABLAS

Tabla	Pag.
1.- Composición del Grano de Jojoba	7
2.- Composición de la Pasta de Jojoba Desgrasada.	8
3.- Desgrasado de la Pasta de Jojoba por Solventes.	15
4.- Destoxificación de la Pasta de Jojoba.	17
5.- Comprobación de la Destoxificación de la Pasta de Jojoba con Ratas.	21
6.- Ratonés Alimentados con Pasta de Jojoba Destoxificada.	22
7.- Destoxificación Preliminar de Pasta de Jojoba Usando Agua como Solvente	37
8.- Efecto del Tamaño de la Partícula sobre la Extracción de Tóxicos de la Pasta a 50°C.	39
9.- Efectos del Tamaño de Partícula Sobre la Extracción de Tóxicos a 21°C.	40
10.- Efecto en la Destoxificación de la pasta de Diferentes Tipos de Extracción.	42
11.- Efectos de la Relación Pasta: Agua y Tipo de Extracción en la Destoxificación de la Pasta.	43
12.- Exámenes Bromatológicos para Evaluar Solubles en Agua de Destoxificación.	45

LISTA DE ILUSTRACIONES

Figura	Pag.
1.- 2- (Cianometileno)-3- hidroxil- 4,5 - dimetoxi- ciclohexil - B - D -glucosa.	11
2.- Estructuras de Tóxicas y sus Productos de Hi- drólisis Encontrados en Pasta Residual de Jojoba.	13
3.- Detección por CCD de Simmondsina y S -2- F del Extracto Acetónico de la Pasta.	26
4.- Diagrama de Destoxificación de la Pasta de Jojoba.	28
5.- Cuantificación de Simmondsina y Simmondsina -2- Ferulato en Pasta de Jojoba Desgrasada.	34
6.- Punto Isoeléctrico de la Protefna en Pasta y en el Filtrado.	47

RESUMEN

En este trabajo se pretende lograr la destoxificación de la pasta de jojoba eliminando de ella los factores antinutricionales Simmondsina y Simmondsina -2- ferulato, para poder aprovechar, su alto contenido de proteína.

En primer lugar se desarrolló el método de cuantificación para lo cual se aislaron y purificaron Simmondsina y Simmondsina -2- ferulato (S -2- F) para ser utilizados como estándares secundarios. La cuantificación se hizo por cromatografía en placa delgada aplicándose las muestras y estándares en diferentes concentraciones, desarrollándose con acetato de etilo-etanol (7:3) y revelándose primero con luz ultravioleta y después con vapores de yodo. La estimación de los tóxicos se hizo semicuantitativamente por comparación visual de la intensidad de las manchas de muestra respecto a las manchas estándares, la cual fué posible en un rango de trabajo de 30 mg/ml a 8 mg/ml para Simmondsina y de 10 mg/ml a 1 mg/ml para Simmondsina -2- ferulato.

Después se procedió a desarrollar el método de destoxificación escogiéndose como el más adecuado la destoxificación con agua dada la naturaleza química de los tóxicos.

Los parámetros probados en la destoxificación fueron: relación pasta/solventes, temperatura, tipo de extracción de los tóxicos y tamaño de partículas de la pasta, resultando ser los más efectivos: la relación (1/14) pasta/solvente.

temperatura ambiente, pasta entera y extracción estática. Con estas condiciones se destoxificó la pasta desde 4.6% de Simmondsina que tenía originalmente a 0.23% y S-2-F desde 1.8% a 0.08%.

En las condiciones antes mencionadas el agua con la que se extrajeron los tóxicos arrastró 28.2% de sólidos de la pasta de los cuales 7.1% fue proteína.

En un intento de recuperación de la proteína solubilizada se llevó ésta a su punto isoeléctrico (pH=3) lográndose una recuperación de 33% de proteína con solo trazas de tóxicos.

Los niveles de destoxificación alcanzados se compararon con experimentos reportados en la bibliografía, resultando ser muy similares. En cuanto a los sólidos solubles en agua las pérdidas fueron menores en el presente trabajo.

INTRODUCCION

Jojoba (Simmondsia chinensis), es una planta que crece en forma silvestre en las zonas áridas de Sonora, Arizona, California y Baja California, la cual posee un fruto conteniendo alrededor de 50% en peso de una cera líquida incolora y sin olor conocida comúnmente como aceite de jojoba la cual, puede ser un excelente sustituto de la esperma de ballena, o en forma hidrogenada de la cera de carnauba o cera de abeja. Después de la remoción del aceite del grano de jojoba queda una pasta que contiene de 28-32% de proteína, 28-30% de carbohidratos y 10-12% de fibra cruda, convirtiéndola en un subproducto potencial para ser utilizada como alimento para animales.

No obstante la calidad nutritiva de esta pasta se han reportado como factores antinutricionales Simmondsina (4.5%) y Simmondsina -2- ferulato (1.2%), capaces de inhibir el apetito en ratas al ser incorporados a su dieta normal a un nivel de 0.15%.

El incremento del interés por el aceite de jojoba ha traído como consecuencia que exista en abundancia la pasta de jojoba que a su vez contiene un alto porcentaje de compuestos nutritivos para animales, no pudiéndose utilizar

debido a su toxicidad, de aquí que haya surgido la necesidad de desarrollar métodos de destoxificación.

De igual manera se han hecho estudios con ratones para observar el aprovechamiento de la proteína de la pasta destoxificada, resultando que la pasta que mejor consumen es la destoxificada con agua debido a que este tratamiento elimina un alto porcentaje de los tóxicos y el mal sabor que tiene la pasta antes de ser extraída con agua. Este efecto no se ha observado en destoxificaciones por medio de procesos químicos en los cuales el mal sabor de la pasta persiste después de la destoxificación, ocasionando esto que los animales de experimentación no la consuman en la misma cantidad.

En base a lo anterior el objetivo del presente trabajo es proponer el diseño de un proceso práctico y económico de destoxificación de pasta de jojoba, sin destrucción de tóxicos, que permita, dado su contenido alto de proteína; su aprovechamiento como alimento para animales.

ANTECEDENTES

La Planta de Jojoba

La planta natural del desierto, jojoba (Simmondsia chinensis también conocida como Simmondsia californica) crece en forma silvestre en las zonas áridas de Sonora, Arizona, California y Baja California donde el suelo es usualmente infértil y las lluvias escasas.

El arbusto de jojoba puede ser masculino y femenino alcanzando una altura promedio de 4.5 m. El arbusto femenino produce flores que cuando son polinadas, se desarrollan en frutos. Generalmente, el polen y las flores femeninas se producen durante los últimos meses de invierno y la fruta se desarrolla durante la primavera. Con el calor del verano el fruto se seca; su cubierta se encoge y se pierde, dejando expuesta una nuez color café del tamaño de una aceituna. (13).

La producción de granos de un arbusto individual fluctúa ampliamente de arbusto a arbusto y de año con año. Se ha llegado a observar una producción de 5 kg de granos limpios y secos por arbusto. (10).

El grano de jojoba no atraviesa por período de latencia y puede germinar inmediatamente después de la cosecha. La germinación se lleva a cabo a 25°C en menos de una semana.

Los brazos de jojoba y cortes de ellos, si se tratan con un fungicida y una hormona para la raíz, pueden producir raíces dentro de un período de 8 semanas, siempre y cuando se mantengan en cámaras de preparación y a una temperatura de 25°C (1).

Los granos de jojoba, de color café rojizo, son ovoidales y triloculares, llegando a pesar cada uno 0.5 gr (18). Estos granos se han utilizado por mucho tiempo como alimento por los indígenas del desierto de Sonora y también se han usado como medicina. (9). El grano de jojoba normalmente tiene un contenido de aceite que fluctúa entre 42 y 60%. La producción de grano y contenido de aceite están fuertemente influenciados por los factores ambientales. (15).

Composición del Grano y de la Pasta de Jojoba

El aprovechamiento de la pasta residual, una vez extraído el aceite de la semilla, indiscutiblemente va a tener una influencia económica considerable en el proceso de extracción. Los análisis reportados en la tabla 1 y 2 indican el valor potencial de esta pasta.

Tabla 1. Composición del grano de jojoba

	%
Aceite	51.4
Pasta seca	46.4
Proteína (N x 6.25)	14.9
Simmondsina	3.0
Simmondsina -2- ferulato	0.61

Tomado de: Fuente (12)

Tabla 2. Composición de la pasta de jojoba desgrasada

	%
Proteína (n x 6.25)	29.09
Grasa residual	3.0
Humedad	8.9
Fibra cruda	8.1
Cenizas	3.1
Carbohidratos	
Azúcares reductores	5.7
Azúcares no reductores	3.05
Otros por diferencia	39.0
Aminoácidos*	
Lisina	0.903
Histidina	0.399
Arginina	1.23
Acido aspártico	2.23
Treonina	1.11
Serina	1.09
Acido glutámico	2.30
Prolina	1.06
Glicina	1.59
Alanina	0.846
Valina	1.05
Metionina	0.211
Isoleucina	0.758
Leucina	1.340
Tirosina	0.925
Fenilalanina	0.861
Cistina y cisteína	0.804
Triptofano	0.404

Tomado de: Fuente (17)

* % de aminoácidos reductores en la pasta.

Determinación de la Estructura Química de los Tóxicos de la Pasta de Jojoba.

Con base en algunas investigaciones preliminares que demuestran que la incorporación de pasta residual ocasiona inhibición del apetito de ratas (5), se extrajo pasta de jojoba sucesivamente con benceno, acetato de etilo y metanol, aislándose por cromatografía en gel de sílice un componente cuya actividad inhibitoria del apetito fué comprobada y dándosele el nombre de Simmondsina. El análisis de los espectros de Infrarrojo (IR), Ultravioleta (UV), Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y espectrómetro de masas de este compuesto y alguno de sus derivados permiten asignarle la estructura, (fig. 1) 2 (cianometileno) -2- hidroxí -4, 5- dimetoxiciclohexil - β - D - glucosa. (2).

Estudios adicionales condujeron a la ligera modificación de la configuración de la primera estructura propuesta. Colocando en esta nueva estructura al grupo ciano en posición *syn* al sustituyente β glucosil axial. (fig. 2a).

La fracción de pasta residual extraída con acetato de etilo, fué montada en columna y eluída con un gradiente de cloroformo a cloroformo: metanol al 20%, separándose tres fracciones que mostraron señal de absorción al IR a 2220 cm^{-1} característica del grupo nitrilo conjugado presente en Simmondsina. De la fracción menos polar se obtuvo una mezcla de *cis* y *trans* Simmondsina -2- ferulato determinándose una estructura mediante el análisis del compuesto. (fig. 2b).

En la siguiente fracción eluida se encontró Simmondsina. De la fracción más polar se obtuvo una mezcla de sustancias incristalizables cuya estructura fué establecida mediante el análisis espectral de sus respectivos acetatos. (fig. 2c y d).

Se obtuvieron algunos productos de hidrólisis de Simmondsina y los otros glucósidos aislados en pasta de jojoba. (fig. 2e, f, g y h). (6, 7, 8).

Toxicidad de la Simmondsina.- Fueron dadas 5 dosis orales de 750 mg por kg de peso de Simmondsina pura disuelta en agua durante 5 días seguidos a varios ratones, muriendo todos ellos a los 10 días después de la primera dosis.(3). Actualmente solo un animal se conoce que tenga tolerancia a la jojoba y es un roedor del desierto de Sonora de la especie de los heteromídes. La Simmondsina es secretada por la planta de jojoba para inhibir la germinación de otros granos que compitan con ella. Más de 100 especies de plantas son secretoras de este tipo de sustancias, fisiológicamente activas en el fruto o granos. (16).

Destoxificación de la Pasta de Jojoba

Desgrasado.- Se hicieron algunos estudios tendientes a reducir abajo de 7% el contenido del aceite de la pasta residual la cual contiene de 10 - 18% de aceite una vez exprimida la semilla. Hexano en una relación de solvente/pasta de (4:1) resultó ser un buen solvente, siendo además de bajo

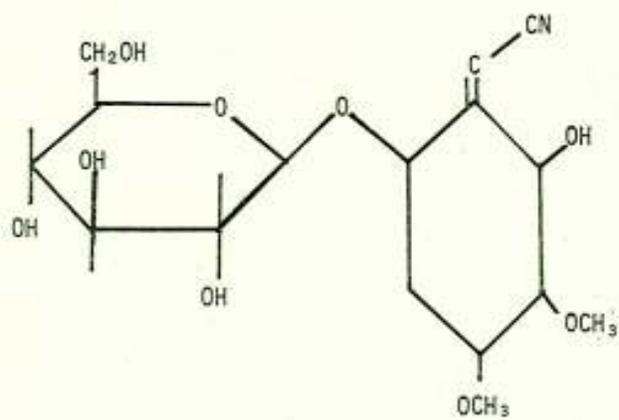
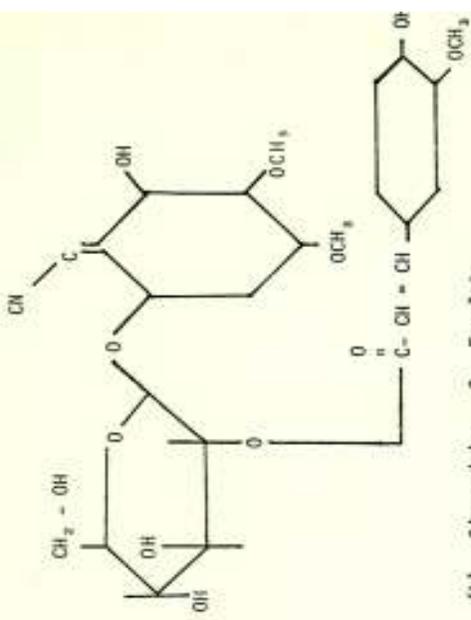
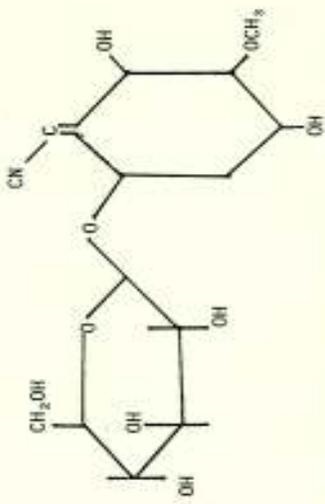


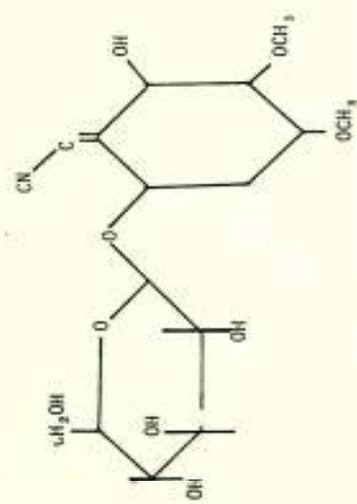
Fig. 1. -2- (cianometilen) -3- hidroxi -4, 5- dimetoxi-
ciclohexil - β - D- glucosa.



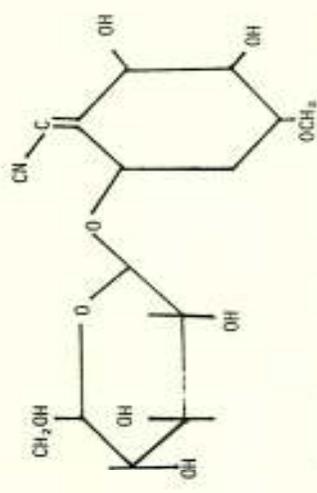
(b). - Siamondsina - 2 - Ferulate



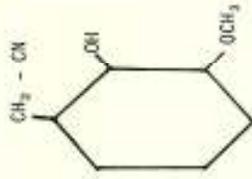
(d). - 2 (cianometil) - 3,5-dihidroksi-4 metoksi beta-D-glucosa



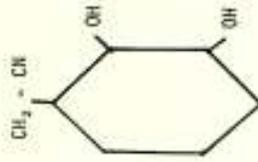
(a). - Siamondsina



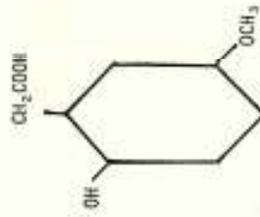
(c). - 2(cianometil)-3,4 - dihidroksi-5 metoksi beta-D glucosa



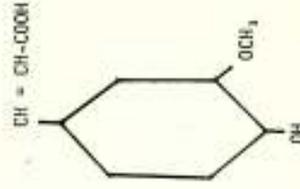
(e).- Producto de hidrólisis básica de (a), (c) y (d).



(f).- Producto de hidrólisis básica de (b).



(g).- Producto de hidrólisis ácida de (j)



(h).- Acido Ferúlico

Fig. 2. Estructuras de toxinas y sus productos de hidrólisis encontrados en pasta residual de jofoba.

precio y toxicidad y fácilmente recuperable. Cloruro de metileno - metanol en una relación (85:15) se reportó también como un buen sistema de solventes pero con el inconveniente de destoxificación simultánea de la pasta, quedando los tóxicos en el aceite recuperado con el decremento de la calidad de éste si es que se piensa en su utilización comercial.

Tabla 3.

Destoxificación por Solventes.- Una vez desgrasada la pasta se hicieron estudios de destoxificación extrayendo los tóxicos con solventes en distintas relaciones de solvente: pasta, utilizando un proceso intermitente a temperatura ambiente.

Usando dos extracciones sucesivas con metanol en una relación de solvente:pasta (v/p) de (6:1) se logró reducir el contenido de Simmondsina de 45 gr/kg a 0.3 gr/kg y el de Simmondsina-2-ferulato (S-2-F) de 12 gr/kg de pasta a 0.06 gr/kg de pasta; sin embargo, aunque estos resultados son satisfactorios, el metanol remueve, además, 60 gr/kg de pasta de otros componentes principalmente carbohidratos que pueden tener valor nutritivo.

Acetona aunque resultó ser más selectivo en la extracción de los tóxicos, no los remueve en su totalidad. Por otro lado cloruro de metileno: metanol (75:25), destoxificó completamente la pasta con el inconveniente ya señalado de desgrasar y destoxificar simultáneamente dando una mezcla de aceite y tóxicos.

Tabla 3. Desgrasado de la pasta de jojoba por solventes

Solventes	Solvente/pasta (v/p)	Producto recuperado (%)	
		Aceite	Pasta
Hexano	8 : 1	17	75
Hexano	7.5 : 1	17	-
Hexano	4.0 : 1	20	76
Hexano	2.7 : 1	17	82
Cloruro de metileno: MeOH (85:15)	8 : 1	21	-

Tomado de: Fuente (2).

Con extracción con agua en una relación solvente: pasta de (8:1) se logró reducir el contenido de tóxicos en la pasta a muy buen nivel pero a la par se extrajeron 33% de solubles en agua entre los que están los tóxicos. (2) Tabla 4.

Destoxificación Química.- Se han hecho intentos de destoxificación de la pasta con calor, sometiendo la pasta al autoclave a 125° por un período de 12 horas; se destoxificó parcialmente la pasta produciendo en la misma grandes cambios en apariencia.

En otros experimentos se intentó modificar químicamente el grupo cianometileno responsable de la toxicidad de estos compuestos por un grupo químico menos tóxico, como el grupo amida, entre los que podemos citar el tratamiento de la pasta con NH_4OH , el cual requiere de 40 días a temperatura ambiente y de 14 días a 50°C. Ya que los nitrilos parecen ser resistentes a hidrólisis aún variando las condiciones de reacción, se intentó modificar el tratamiento a fin de aumentar la velocidad de reacción. Así un tratamiento usando NH_4OH y H_2O_2 mejoró la velocidad de reacción notablemente a una semana (4); para esto se practicó la relación a la pasta humedecida con agua usando el NH_4OH como una base volátil distribuyendo los reactivos a través de la pasta.

En otro tratamiento se trató la pasta con H_2S intentando adicionar el grupo OH^- a la doble ligadura del grupo cianometileno, logrando la modificación química de Simmondsina,

Tabla 4. Destoxificación de la pasta de jojoba

Tratamiento	Tóxicos g/100 g de pasta	
	Simmondsina	S -2- F
Metanol		
Extracción (6:1)	0.031	0.006
Acetona		
Extracción (10:1)	0.630	0.050
CH ₂ CL ₂ : CH ₃ OH (75:25)		
Extracción (8:1)	0.047	0.002
H ₂ O extracción (8:1)	0.092	0.067
NH ₄ OH, 14 días, 50°C.	0.190	0.029
NH ₄ OH, 40 días, T°C Amb.	0.160	0.080
NH ₄ OH + H ₂ O ₂ , 8 días	0.060	0.030
Desgrasada con hexano	4.5	1.2

Tomado de: Fuente (2)

pero no la de S -2- F. Se probó la destoxificación con tóxicos solos usando NaOH catalizados con iones Cu^{++} , Zn^{++} y Ni^{++} , lográndose ésta en escasos minutos, pero no se probó en pasta por las dificultades que tendrían estos reactivos en la distribución en la pasta por su no-volatibilidad. (14) Tabla 5.

Todos los tratamientos descritos requirieron de un método de detección y cuantificación de los compuestos tóxicos, habiéndose desarrollado un método en el cual se practicó cromatografía en capa delgada a una fracción extraída a partir de la pasta con acetona y redisolta, con acetato de etilo-etanol (7:3), mismo con el cual se eluyó la placa, revelándose ésta con H_2SO_4 al 10% y posterior calentamiento para visualizar Simmondsina con un R_f de 0.33 y S -2- F con un R_f 0.62. Mediante este método se pueden lograr resultados cuantitativos bastante aceptables.

Se desarrolló un método usando cromatografía líquida de alta presión para separar y cuantificar tóxicos, usando una precolumna de Porasil A, de 37 - 75 μ y de 3.2 x 4 mm; columna de Porasil A de 37 - 75 μ y de 3.2 x 500 mm; eluyendo con acetonitrilo - agua (9:1) a una velocidad de flujo de 0.5 cm/min. detectando su presencia con U.V. a 220 nm. Los tiempos de retención para los tóxicos a estas condiciones son:

Simmondsina	9.7 min. aprox.
Simmondsina -2- ferulato (S-2-F)	6.7 min. (2)

Comprobación de la Destoxificación
de la pasta de Jojoba con Ratas.

En la Tabla 5 se resumen varios de los procesos experimentales por medio de los cuales, se probó la destoxificación de la pasta de jojoba. Estos datos nos indican que la mortalidad en ratas es general con niveles altos de tóxicos en la pasta. En dos pastas, las cuales se trataron con NH_4OH y $\text{NH}_4\text{OH} + \text{H}_2\text{O}_2$ los niveles de tóxicos son muy bajos y ninguna de las ratas murieron. Una de las muestras extraídas con metanol (MeOH) y otra con Cloruro de Metileno Metanol; ($\text{CH}_2\text{Cl}:\text{MeOH}$) resultaron tener niveles altos de Simmondsina, causando algunas muertes durante la segunda y tercera semana. Con niveles de tóxicos muy altos, como en el caso de la pasta extraída con isopropanol, el 100% de las ratas murieron. La única pasta que no siguió este patrón es la tratada con calor y se cree que esto se deba a que la Simmondsina y la S -2- F se modificaron con la temperatura pero al mismo tiempo es posible que estos productos de la degradación de la Simmondsina por la temperatura mantengan intacto el grupo ciano que es el que contribuye a la toxicidad de la pasta.

En los experimentos hechos con ratones la pasta de jojoba se adicionó a la dieta solo como fuente de protefna, tratando de cubrir niveles en un rango de 19-28% en cada ración.

En un experimento posterior se probó con ratones el aprovechamiento de la protefna de la pasta, alimentándolos por

tres semanas con tres tipos de pasta destoxificada, al mismo tiempo se alimentaron ratones con proteína de huevo que sirvieron como control. Los datos están expuestos en la Tabla 6.

Con esto se comprobó que el método más aceptable de destoxificación fue la extracción por agua, por extraer fácilmente los tóxicos y además ser esta pasta la que mejor consumieron los ratones. La pasta extraída con agua fue incluida en la dieta hasta en un 10%, sin causar problemas en el sabor del alimento.

Tabla 5. Comprobación de la destoxificación de la pasta de jojoba con ratas. a/

Destoxificación	Composición de la pasta			Mortalidad % en 3 semanas <u>b/</u>
	Simmondsina	S-2-F	Proteína %	
Extracción con acetona	0.63	0.50	31.3	60
Extracción con Isopropanol	2.90	0.40	32.2	100 <u>c/</u>
Extracción con metanol	0.31	0.06	34.3	30
Extracción con CH ₂ CL: MeOH (85:15)	0.33	0.05	33.5	10
Extracción con agua	0.09	0.07	-	-
135°C, 15 horas	0.27	0.18	26.7	95
100°C, 3 horas, extrac- ción con agua	0.19	0.38	25.4	95
NH ₄ OH, 40 días	0.16	0.08	37.0	0
NH ₄ OH + H ₂ O ₂ , 8 días	0.01	0.03	32.4	0

a/ Datos proporcionados por el Profesor C. W. Weber, Universidad de Arizona

b/ Ratones, 10 hembras y 10 machos

c/ Dos semanas.

Tabla 6. Ratones alimentados con pasta de jojoba destoxificada a/

Destoxificación	Comp. de la pasta %		Semanas	Peso en gramos	Aumento de peso en gr	Alimento consumido por semana en gr
	S.	Protetina				
Control <u>b/</u>	-	-	1	13.9	4.9	18.6
			2	19.0	5.1	23.4
			3	24.1	5.1	26.4
NH ₄ OH, 40 días	0.05	30.4	1	9.8	-	17.8
			2	12.2	2.4	24.0
			3	14.6	2.4	29.0
Extracción con agua	Tr.	22.5	1	10.6	-	17.8
			2	14.6	4.0	28.1
			3	17.7	3.1	32.9
NH ₄ OH + H ₂ O ₂	0.05	32.8	1	9.1	-	16.1
			2	10.3	1.2	19.8
			3	11.7	1.4	20.9

a/ Datos proporcionados por C.W. Weber, Universidad de Arizona

b/ En la dieta total se agrega un 8% de protetina de huevo.

MATERIALES Y METODOS

Materia Prima Utilizada

La materia prima utilizada para este trabajo fué pasta de jojoba. Esta fué obtenida por medio de la extracción mecánica del aceite del grano de jojoba, la cual consta de 3 pasos principales: un cocimiento del grano, extracción del aceite por expeller y un filtrado posterior del aceite. En el cocimiento de la semilla, ésta se calienta utilizando vapor a presión a una temperatura de 90°C. Después de un secado previo, también llevado a cabo con presión, el grano se somete a un prensado en expeller (Marca Hander modelo EX-100), de donde se obtiene por un lado el aceite producto de la extracción el cual se pasa después por un filtro prensa, y por el otro la pasta conteniendo todavía una cantidad de aceite remanente que fluctúa alrededor de 10%.

De esta pasta se tomaron las cantidades necesarias para el aislamiento de los tóxicos y para probar los métodos de destoxificación.

Desgrasado de la Pasta de Jojoba

Se desgrasaron 100 gr de pasta con hexano (grado reactivo) en un extractor tipo Soxhlet usando una relación de solvente-pasta de (4:1) durante 6 horas.

El extracto se concentra en un evaporador rotatorio (Rotavapor - R, Modelo Brinkman Instruments, Tipo W-240) para recuperación del solvente y obtención del aceite crudo.

Extracción de Tóxicos

La pasta desgrasada se extrajo con acetona durante 6 horas en un Soxhlet recogiendo el extracto y concentrándose a presión reducida en un evaporador rotatorio. El residuo se disolvió en una porción de acetato de etilo-etanol (3:1) y se pasó a través de una columna de vidrio de 10 cm de diámetro y 30 cm de altura, empacada con 0.5 gr de sílica gel 60 (230-400 mallas, grado cromatografía). Se eluyó la columna con acetato de etilo - etanol (7:3) evaporándose a sequedad la fracción eluida y disolviéndose después en 4 ml de etanol.

Cromatografía en Placa Delgada.- Se prepararon las placas distribuyendo sobre ellas sílica gel G para cromatografía en capa delgada (CCD) usando un aplicador Kensaco para espesores variables, formándose una capa de 0.25 mm de espesor; las placas se activaron en una estufa a 110°C durante 20 min. Se aplicaron los extractos junto con los estándares primarios de Simmondsina y S -2- ferulato (proporcionados por: Anver Bioscience Design Inc. Sierra Madre California), desarrollándose la cromatografía en cámaras rectangulares de vidrio con acetato de etilo - etanol (7:3), y revelándose con luz UV a 360 nm, vapores de I_2 y H_2SO_4 al 10% seguido de

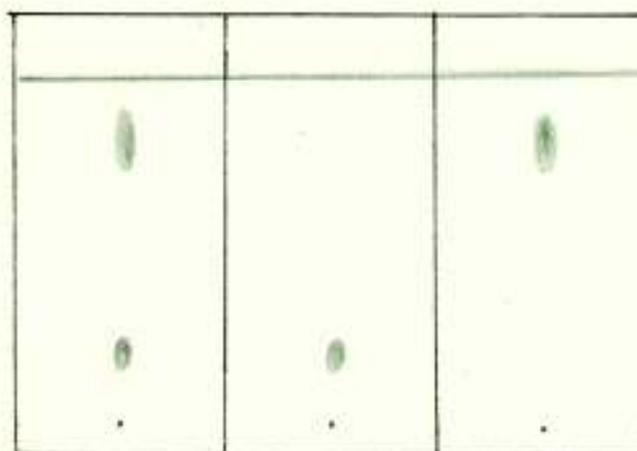
calentamiento para visualización de las manchas. (fig. 3).

Obtención de Estándares Secundarios
de Simmondsina y Simmondsina -2- F

Preparación de la Muestra.- La muestra se preparó de la siguiente manera: 100 gr de pasta se desgrasaron con hexano en una relación de (2:1) ó (2.5:1) en un soxhlet haciéndose 3 extracciones sucesivas. Se evaporó el hexano de la pasta.

Obtención de Simmondsina.- La pasta de jojoba desgrasada con hexano se extrajo con acetona usando una relación de solvente/pasta de 2:1 durante 4 horas. Después de la evaporación de la acetona en un evaporador rotatorio se obtuvieron 6.2 gr de la mezcla de tóxicos a partir de 100 gr de pasta. Esta mezcla de tóxicos se disolvió en un exceso de acetona y se pasó a través de una columna con 0.5 gr de sílica gel 60 (230-400 mallas); se eluyó con acetona y se concentró a un volumen pequeño. Esta solución de acetona se evaporó lentamente en un vaso de precipitado (30 ml) y se empezó a cristalizar la Simmondsina. Para que la cristalización fuera completa se introdujo el vaso en una salmuera por 6 horas y se dejó reposar 48 hrs., recrystalizándose 2 veces de la manera anterior.

Obtención de Simmondsina -2- ferulato.- En el sobrenadante obtenido después de la precipitación de Simmondsina se obtuvo S -2- F, por ser ésta última mucho más soluble en acetona que Simmondsina. Se evaporó completamente la acetona y



Muestra:	1	2	3
Solvente:	AcET-EtOH (7:3)		
Revelador:	Vapores de I ₂		
Observaciones:	<u>Muestra</u>		
	1	Extracto
	2	Simmondsina
	3	Simmondsina -2- Ferulato

Fig. 3. Detección por CCD de Simmondsina y S -2- F del extracto acetónico de la pasta.

se disolvió en un exceso de acetato de etilo y después con la evaporación lenta del acetato de etilo en un vaso de precipitado se obtuvo primero, la Simmondsina residual disuelta en la acetona y después la S -2- F en forma de una pasta café. Esta pasta se disolvió en acetonitrilo y se le agregó lentamente y agitando eter butírico precipitando la S -2- F, recristalizándose de la misma forma para eliminar impurezas. A fin de obtenerse en forma pura la S -2- F se pasó a través de una columna de sílica gel 60 (70-230 mallas) recuperándose en las primeras 5 fracciones eluidas con acetato de etilo.

Cuantificación de Simmondsina
y Simmondsina -2- Ferulato.

Se pusieron en un vaso de precipitado (4000 ml) 3200 ml de agua destilada agregándose después 200 gr de pasta. Esta mezcla se llevó a 50°C con una parrilla convencional en la cual una vez alcanzada la temperatura se mantuvo ésta durante 8 hrs.; después la mezcla se pasó a un embudo de porcelana y se filtró a través de un filtro Whatman No.1 con presión reducida. Aquí se recogió el filtrado para cuantificar los solubles y la pasta residual se pasó a secar a una estufa (National Appliance Company Modelo 5851) a 50°C durante 8 hrs. a presión reducida. Una vez seca la pasta se pasó a un desecador para que alcanzara la temperatura ambiente. Con la pasta se procedió a cuantificar los tóxicos residuales por el método anteriormente expuesto (fig. 4).

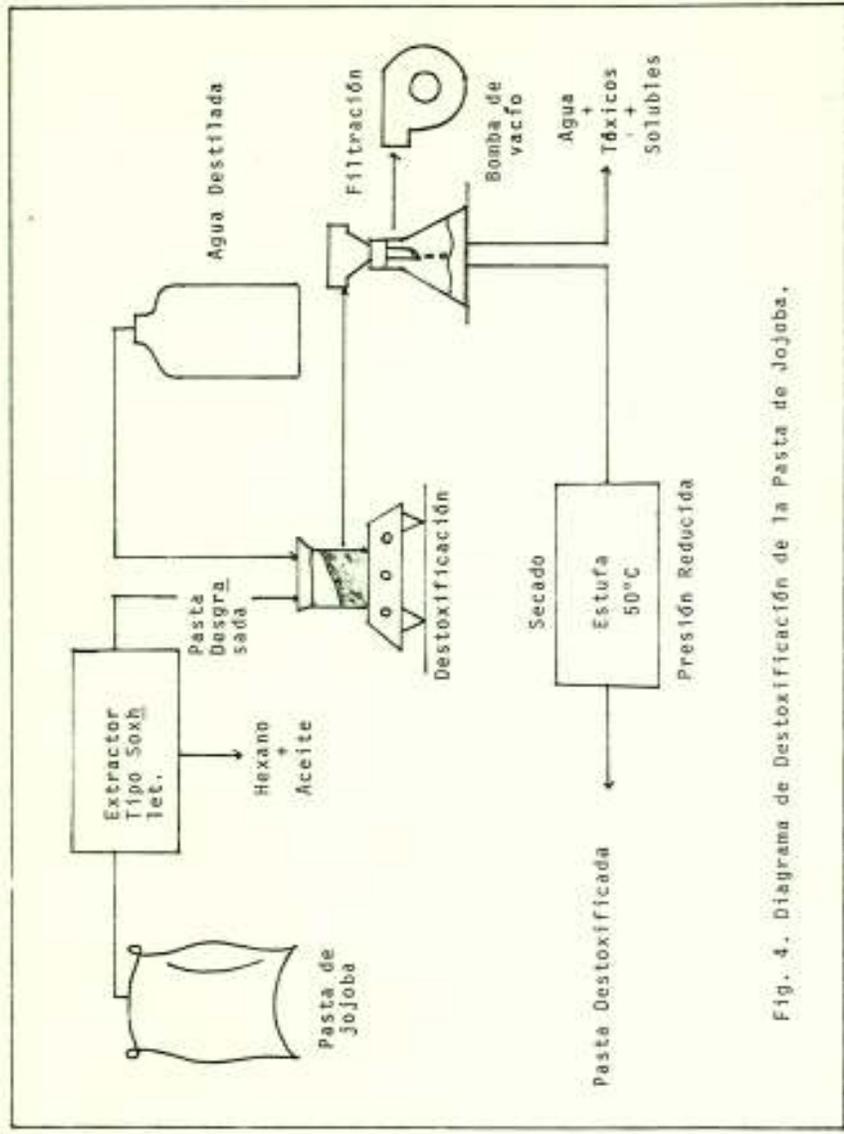


Fig. 4. Diagrama de Destoxificación de la Pasta de Jojoba.

Para lograr las condiciones óptimas de destoxificación de la pasta se tomó en cuenta la influencia que pudieran tener en la extracción del tóxico cada uno de los siguientes parámetros:

- a) Relación Solvente/Pasta (v/p).- En este caso se probaron relaciones solventes/pasta desde la mínima que fue (8:1) hasta (16:1) que fue la máxima.
- b) Temperatura de Destoxificación.- En este caso se probaron dos temperaturas, a 50°C y temperatura ambiente (21-23°C).
- c) Tipo de Proceso de Extracción.- Se probaron tres procesos por agitación continua con un agitador mecánico de flecha (Polyscience Corp. Modelo - RZR10), el segundo proceso fue el de homogenizar, el cual consistió en poner la pasta y el agua destilada en las cantidades determinadas y homogenizar la mezcla con un agitador de vidrio, dejando transcurrir la extracción en reposo; otro proceso fue el estático, en este caso se puso la pasta y el agua dejando transcurrir el tiempo de extracción en completo reposo.
- d) Tamaño de Partícula.- La pasta de jojoba se trituró en un molino (Wiley Mill, Standar Modelo No.3), eligiendo la molienda de 42 y 20 mallas.

Cuantificación de Solubles

El filtrado procedente de la extracción de cada uno de los experimentos desarrollados se evaporó a sequedad en una parrilla convencional a 80°C y después que estuvo completamente seco se determinaron los siguientes

análisis recomendados por la A.O.A.C.(11): proteína (kjeldahl), cenizas, grasa, humedad, fibra cruda y carbohidratos (por diferencias).

Determinación del Punto Isoeléctrico

En la pasta.- Se tomaron 7 vasos de precipitado de 250 ml y se colocaron en cada uno de ellos 10 gr de pasta desgrasada con hexano y 160 ml de agua destilada. Cada vaso se ajustó a un pH diferente desde 1 a 7. Estas 7 muestras se trataron como en el proceso de destoxificación antes descrito y se cuantificó el contenido de proteína por el método de Kjeldahl

En el filtrado .- En este caso se pusieron 70 ml del filtrado proveniente de la extracción de la pasta durante 8 hrs. a temperatura ambiente, en 7 vasos de precipitado de 125 ml y se llevaron con NaOH 1N o HCl a pH desde 1 a 7. Después los 7 vasos se dejaron reposar 8 horas y se filtraron a través de un filtro Whatman 3 MM determinando en cada uno de los filtrados la proteína precipitada por el método de Kjeldahl (11).

RESULTADOS Y DISCUSION

Desgrasado de la Pasta de Jojoba

La pasta de jojoba resultante de la extracción mecánica del aceite de jojoba, contiene alrededor de 10% de aceite remanente, por lo que, para este trabajo se desgrasó con hexano reduciendo la cantidad de aceite de 2-3%.

Esto fue con el fin de que el aceite, no interfiriera en la destoxificación ni en la cuantificación de los tóxicos.

Extracción de Tóxicos

La extracción de tóxicos se realizó con acetona por ser un solvente altamente selectivo para la extracción de éstos. Después de evaporar la acetona, se removió el extracto y se pasó a través de una columna de vidrio empacado con sílica gel 60 para eliminar otros compuestos que pudieran haber sido arrastrados por acetona. Después esta mezcla de tóxicos se secó y pesó para llevar a cabo su cuantificación.

Cromatografía en Placa Delgada.- Se prepararon las placas distribuyendo sobre ellas sílica gel 60 para CCD. Se aplicaron los extractos junto con los estándares de Simmondsina y Simmondsina -2- Ferulato, desarrollándose la cromatografía con acetato de etilo-etanol (7:3) y revelándose con UV y vapores de yodo.

De esta forma se probó la técnica de extracción y se estandarizó el método de identificación de los tóxicos.

Obtención de Estándares Secundarios de
Simmondsina y Simmondsina -2- Ferulato

Se consideró necesario el aislar y purificar los tóxicos principales presentes en la pasta (Simmondsina y S -2- F) para ser utilizados como estándares secundarios previa estandarización con los correspondientes estándares primarios (de escasa disponibilidad), a fin de asegurar un suministro de estándares a lo largo del desarrollo de todo el trabajo.

Obtención de Simmondsina.- Primero la pasta se desgrasó con hexano y después se extrajo con acetona, de donde se obtuvo 6.2 gr de tóxicos de cada 100 gr de pasta desgrasada. Esta mezcla de tóxicos se disolvió en un exceso de acetona y se pasó a través de una columna de vidrio con 0.5 gr de sílica gel 60 para eliminar impurezas. Esta solución de acetona se evaporó lentamente en un vaso de precipitado, cristalizando la Simmondsina, para que la cristalización fuera completa se introdujo el vaso a una salmuera por 6 hrs. y se dejó reposar por 48 hrs. Esta se recrystalizó de la manera anterior dándonos el estándar de Simmondsina hidratada con un punto de fusión de 96-99°C y un Rf de 0.21 en CCD desarrollada con acetato de etilo-etanol (7:3) dejando correr el frente del solvente 15 cm.

Obtención de Simmondsina -2- Ferulato.- En el sobrenadante obtenido de la precipitación de Simmondsina se obtuvo

la S -2- F, como se indicó en materiales y métodos. La S -2- F así obtenida tiene un Rf de 0.48 en CCD, desarrollada con acetato de etilo-etanol (7:3).

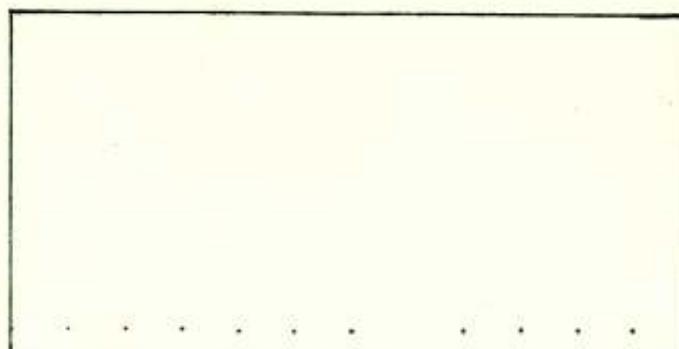
Los estándares secundarios de Simmondsina y S -2- F fueron comparados con los estándares primarios comportándose cromatográficamente de la misma forma.

Estos resultados corresponden a los reportados en la bibliografía.

Cuantificación de Simmondsina y Simmondsina -2- Ferulato

Se probó el método de cuantificación por CCD utilizando los estándares secundarios previamente aislados. Se seleccionó un rango de concentraciones donde las variaciones de concentración fueran detectables por comparación visual de las manchas lo cual fué posible entre 30 mg/ml a 8 mg/ml para Simmondsina y de 10 mg/ml a 1 mg/ml para S -2- F. En estos rangos las variaciones de concentración de los tóxicos fueron fácilmente detectables, en cambio en el caso de Simmondsina, concentraciones mayores de 30 mg/ml en cromatografía por CCD dieron manchas tan fuertes que una variación en la concentración no fué detectable.

Por este método se determinó el contenido de tóxicos en el lote de pasta con el que se trabajó en los experimentos de destoxicación, encontrándose en él 4.6% de Simmondsina y 1.8% de S -2- F. (fig. 5).



Muestra: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Solventes: Ac.Et - EtOH (7:3)

Revelador: U.V.

Observaciones:	Muestra	Descripción	Concentración mg/ml
	1	Estandar Simmondsina	20
	2	Extracto	10
	3	Estandar Simmondsina	15
	4	Extracto	15
	5	Estandar Simmondsina	8
	6	Extracto	20
	7	Estandar S -2- F	3
	8	Extracto	15
	9	Estandar S -2- F	4
	10	Extracto	10

Fig. 5 . Cuantificación de Simmondsina y S -2- Ferulato en pasta de jojoba desgrasada.

La estimación de los tóxicos fué hecha por comparación visual de las intensidades de las manchas de muestra respecto a las manchas de estándares.

Destoxificación con Agua

Una vez estandarizado el método de cuantificación de los tóxicos predominantes en la pasta (Simmondsina y Simmondsina -2- Ferulato) se procedió a iniciar el estudio de destoxificación de la misma, seleccionándose un proceso de destoxificación por solventes con el propósito de intentar en el futuro una recuperación y utilización de los tóxicos dado el contenido de éstos en la misma. Por otro lado revisando la bibliografía referente a estudios previos de destoxificación, se observó que comparado con otros solventes y dada la naturaleza química de los tóxicos, el agua resulta ser un buen solvente de los mismos escogiéndose como solvente más adecuado.

Para llegar a proponer un método de destoxificación con agua se tomó en cuenta la influencia que pudieran tener en el mismo cada uno de los siguientes parámetros: Relación pasta/solvente, temperatura de destoxificación, tipo de proceso (estático, agitado, etc.) y tamaño de partícula, probándose de acuerdo al diseño que se muestra a continuación.

Como un punto de partida dada la escasez de datos previos e intentando tener una idea del comportamiento de la pasta al ser extraída con agua, se realizaron dos experimentos

extremos. En el primero de ellos (Exp. No.1), se utilizó una relación pasta: solvente excesiva (1:16) a una temperatura de extracción de 50°C con sistema de agitación mecánica, variando el tiempo de extracción de 1 a 7 horas. En otro experimento (No.2), se utilizó una relación pasta: solvente mínima la cual resultó ser de (1:8), un sistema a temperatura ambiente con agitación mecánica, variando el tiempo de 2-14 horas en intervalos de 2 horas.

La destoxificación se llevó a cabo en un vaso de precipitado de 4000 ml utilizando 200 gr de pasta previamente desgrasada con hexano. Se adicionó la cantidad de solvente correspondiente a cada experimento estableciendo la temperatura y proporcionando la agitación mecánica para tomar alcuotas cada hora en el experimento No.1 y cada 2 horas en el experimento No.2; estas alcuotas se filtraron recogiendo se el residuo para cuantificación del tóxico y el filtrado para cuantificación de los solubles después de ser secados a 50°C a presión reducida.

Comparativamente se obtuvieron mejores resultados en cuanto a niveles de destoxificación y tiempo, en el experimento No.1 (Tabla 7) aún cuando el porcentaje de solubles fue elevado, escogiéndose estas condiciones para probar los otros parámetros

Enseguida se hicieron una nueva serie de experimentos variando el tamaño de partícula para observar si éste tenía

Tabla No. 7.- Destoxificación Preliminar de Pasta de Jojoba Usando Agua Como Solvente.

Mues tra.	Tiem po.	Experimento 1 Temp=50°C			Experimento 2 Temp=25°C		
		S%	S-2-F%	% Soluble en H ₂ O	Tiempo	S%	S-2-F%
1	1 Hr.	1.35	0.25	36.0	2 Hrs.	3.9	0.73
2	2 Hrs.	0.99	0.23	37.6	4 Hrs.	2.9	0.56
3	3 Hrs.	0.85	0.16	38.0	6 Hrs.	2.8	0.45
4	4 Hrs.	0.59	0.08	39.6	8 Hrs.	2.3	0.40
5	5 Hrs.	0.37	0.07	40.0	10 Hrs.	2.0	0.35
6	6 Hrs.	0.14	0.05	41.2	12 Hrs.	1.8	0.26
7	7 Hrs.	0.13	0.04	42.0	14 Hrs.	-	-

Los porcentajes están calculados en base a pasta seca.

influencia en la transferencia del tóxico al solvente. En estos experimentos (No.3 a No.8) descritos en las Tablas 8 y 9 se utilizaron 3 tamaños de partículas a saber: Pasta sin moler, molienda a 20 mallas y molienda a 42 mallas, a 50°C y a temperatura ambiente en cada uno de los casos, observándose que no hubo efecto considerable de la molienda sobre la extracción.

Enseguida se procedió a probar el sistema de extracción del tóxico haciendo 2 experimentos uno de ellos estático (Exp. No.9) y otro en el cual se mezcló inicialmente la pasta y solvente para dejar transcurrir la extracción en reposo (Exp. No.10), comparándose los resultados con los obtenidos en un sistema de agitación mecánica anteriormente probado en el experimento No.6.

En el experimento No.9 (estático) se tomaron 2 vasos de precipitado colocando en cada uno de ellos 20g de pasta entera y se agregó agua destilada en una relación pasta: solvente de (1:16) dejándose transcurrir el tiempo de reposo a temperatura ambiente; en el primer vaso se suspendió la extracción a las 6 horas, filtrándose para cuantificar niveles de tóxicos residuales en la pasta y porcentaje de solubles en agua, mientras que en el segundo vaso se continuó la extracción hasta 14 horas, después de las cuales se cuantificaron los tóxicos y los solubles.

El experimento No.10 se corrió en forma similar al anterior excepto que se homogenizó la pasta y el solvente

Tabla No. 8.- Efecto del Tamaño de Partícula Sobre la Extracción de Tóxicos de la Pasta a 50°C.

Muestra	Tiempo	Experimento 3		Experimento 4		Experimento 5			
		%	% Soluble en H ₂ O	%	% Soluble en H ₂ O	%	% Soluble en H ₂ O		
1	1 Hr.	1.35	0.25	0.94	0.32	31.1	0.60	0.18	31.1
2	2 Hrs.	0.99	0.23	0.87	0.31	32.8	0.46	0.14	32.0
3	3 Hrs.	0.85	0.16	0.76	0.30	34.0	0.40	0.14	34.8
4	4 Hrs.	0.59	0.08	0.56	0.20	37.9	0.36	0.11	36.1
5	5 Hrs.	0.37	0.07	0.52	0.20	36.8	0.16	0.09	36.9
6	6 Hrs.	0.14	0.05	0.36	0.18	39.0	-	-	-

Los porcentajes están calculados en base a pasta seca.

Tabla No. 9.- Efecto del Tamaño de Partícula Sobre la Extracción de Tóxicos a 21°C.

Muestra	Tiempo	Experimento 6		Experimento 7		Experimento 8	
		S%	% Soluble en H ₂ O	S%	% Soluble en H ₂ O	S%	% Soluble en H ₂ O
				Temp= 21°C Sin Moler	Temp= 32°C 20 Mallas	Temp= 21°C 42 Mallas	
1	1 Hr.	0.64	0.20	31.2	0.62	0.24	29.2
2	2 Hrs.	0.45	0.20	35.5	0.36	0.18	30.6
3	3 Hrs.	0.42	0.18	35.4	0.36	0.18	32.6
4	4 Hrs.	0.36	0.09	36.15	0.37	0.18	33.0
5	5 Hrs.	0.20	0.07	36.4	0.32	0.16	33.7
6	6 Hrs.	0.17	0.06	37.0	0.24	0.13	34.8
					S-2-F%	S-2-F%	S-2-F%
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12
					0.12	0.11	0.11
					0.27	0.10	0.10
					0.26	0.13	0.13
					0.10	0.12	0.12
					0.18	0.12	0.12
					0.15	0.12	0.12

con una pequeña agitación inicial, dejándose transcurrir la extracción en reposo para cuantificar tóxicos y solubles a las 6 y 14 horas respectivamente. Los resultados de estos experimentos se pueden comparar con los obtenidos para un sistema con agitación (Exp. No.6) en la Tabla 10 donde se observa, que el nivel de destoxificación alcanzado en 6 horas en un sistema agitado requiere de 14 horas de extracción en un sistema estático, sin embargo, el porcentaje de solubles en este último disminuye; además, debido a la alta solubilidad de los tóxicos en el agua, el sistema estático resulta ser adecuado sin requerir de una homogenización previa (Exp. No.10) con la cual, de otra forma, se incrementan los solubles.

El siguiente parámetro a probar fué la relación pasta: solvente, para lo cual se hicieron 10 corridas experimentales: 5 de ellas con un sistema estático y 5 con agitación, variando en cada sistema de extracción, la relación solvente: pasta como se describe en la Tabla 11, desarrollándose a temperatura ambiente durante 8 horas y utilizando pasta entera. En esta Tabla se puede apreciar que se alcanzan buenos niveles de destoxificación con una relación pasta: solvente de 1:14 con un sistema estático, ya que de esta forma, los solubles en agua son menores comparado con los resultados correspondientes en un sistema agitado

Tabla No.10.- Efecto en la Destoxificación de la Pasta de
Diferentes Tipos de Extracción.

Experimento Tipo de Extracción	9		10		6
	Estático	Estático	Homogenizado	Agitado	
Tiempo de Extracción	6 Hrs.	14 Hrs.	6 Hrs.	14 Hrs.	6 Hrs.
% de Simondsina	0.45	0.20	0.40	0.17	0.17
% de S - 2 - F	0.21	0.11	0.23	0.10	0.06
% Soluble en H ₂ O	24.0	28.6	29.0	33.0	37.0%

Tabla No.11.- Efecto de la Relación Pasta: Agua y Tipo de Extracción en la Destoxificación de la Pasta.

Experimento Tipo de Extracción	I-A	II-A Agitación	III-A Agitación	IV-A Contfnua	V-A	I-B	II-B	III-B	IV-B	V-B
						E s t á t i c o				
Relación P/V	1:16	1:14	1:12	1:10	1:8	1:16	1:14	1:12	1:10	1:8
% de Simondsina	0.18	0.19	0.30	0.40	0.44	0.21	0.23	0.28	0.28	0.31
% de S - 2 - F	0.07	0.06	0.24	0.28	0.27	0.08	0.08	0.12	0.14	0.12
Soluble en H ₂ O	38.2	34.05	32	30.3	26.8	28.8	28.2	27.8	25.4	24.6

Los tóxicos cuantificados son los residuales en la pasta.

Disminución de la Solubilidad de la Protefna

Debido a que la cantidad de solubles es alto, aún cuando disminuye algo en un sistema de extracción estático, se procedió a determinar la naturaleza de los compuestos que son extraídos junto con los tóxicos mediante un análisis bromatológico de los solubles, tomando como referencia pasta sin tratar. Paralelamente se determinó el análisis bromatológico a solubles y pasta destoxificada a 50°C en un intento por observar el comportamiento de solubilidad de carbohidratos y protefnas a esta temperatura (Tabla 12). De esta forma se observó, que los solubles arrastran 7.10% de la protefna y 29.7% de los carbohidratos presentes originalmente en la pasta, no habiéndose observado resultados muy diferentes en cuanto a solubilidad a 50°C con respecto a temperatura ambiente.

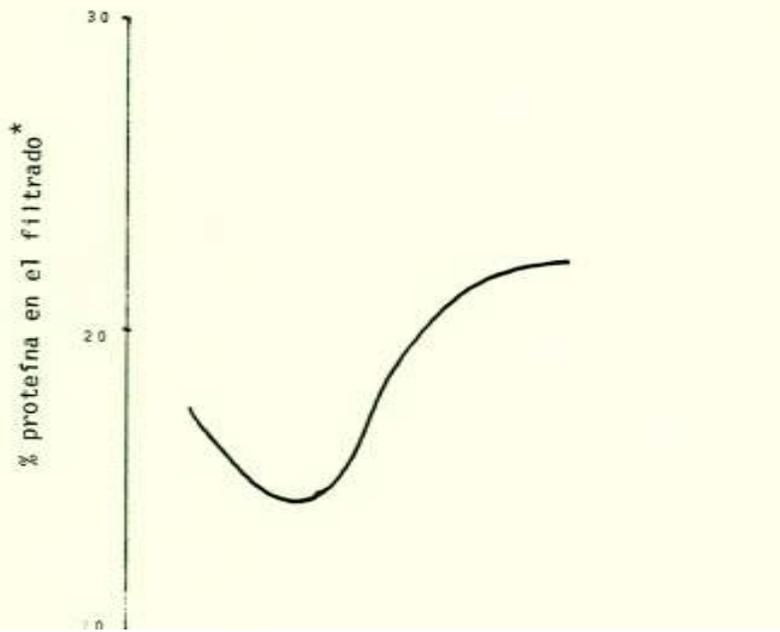
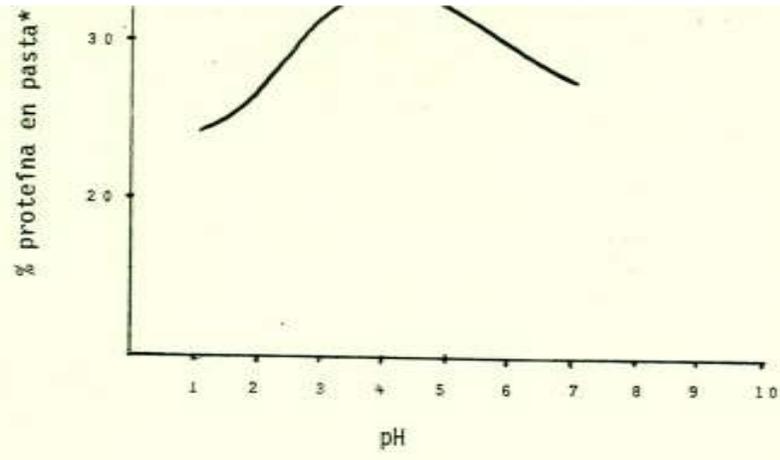
Enseguida se procedió a determinar el punto iso - eléctrico de la protefna en la pasta de jojoba, el cual fué de pH= 4 (fig. 6), manteniéndose este pH durante el proceso de destoxificación, con el fin de disminuir la solubilidad de la protefna en agua. Bajo estas condiciones se logró una disminución de solubilidad siendo la pérdida de protefna en pasta de 4.76%, mientras que en el correspondiente trata - miento sin ajustar el pH ésta fué de 7.10%. Sin embargo al quedar la pasta ácida fué necesario neutralizarla, solubilizándose de nuevo en este paso una cantidad de protefna para obtener

Tabla No.12 Exámenes Bromatológicos Para Evaluar Solubles en Agua de Destoxificación.

P a s t a	% Prote- ína	% Carbo- hidrato	% Ceni- zas	% Fibra Cruda	% Humedad
No tratada	29	50.8	3.7	9.5	4.0
Destoxificada a 21°C	29	46.86	2.28	15.36	4.0
Destoxificada a 50°C	30	47.78	2.32	13.4	4.0
Soluble en agua a 21°C	24.5	68.33	1.42	-	5.75
Soluble en agua a 50°C	25.5	67.12	1.38	-	6.0

Exámenes recomendados por A.O.A.C.

al final una pérdida de proteína en pasta de 7.10%. Debido a que el tratamiento anterior no fue efectivo se optó por recuperar la proteína solubilizada a partir del filtrado obtenido del proceso de destoxificación. Para esto se determinó el punto isoeléctrico de la proteína en el filtrado el cual en este caso fue de pH=3 (fig. 6). El filtrado se ajustó a este pH precipitándose la proteína y recuperándose por filtración para determinar por un lado, el contenido de tóxicos que pudiera haber arrastrado, encontrándose sólo trazas de ellos, y por otro lado el % de proteína recuperada el cual fue de 33%.



CONCLUSIONES

1.- El proceso de destoxificación con agua más efectivo en cuanto a niveles de tóxicos y % de proteína en pasta fué un proceso de extracción estática utilizando pasta entera (sin moler) en una relación pasta/solvente de (1:14) y a temperatura ambiente.

2.- Se obtuvo una pasta destoxificada, ya que los niveles de tóxicos alcanzados con este proceso (0.23% de Simmondsina y 0.08% de S -2- F) son comparables a los de otras pastas de jojoba las cuales al ser incorporadas a la dieta de ratones no fueron tóxicas.

3.- Se recuperó 71.2% de una pasta la cual contiene: 20.65% de proteína, 33.39% de carbohidratos 1.62% de cenizas y 10.93% de fibra cruda, característica que la convierten en un subproducto atractivo para ser utilizado en la alimentación de rumiantes.

4.- En este proceso se solubilizaron 7.1% de la proteína originalmente presente en la pasta y 29.67% de carbohidratos junto con casi la totalidad de los tóxicos, recuperándose por precipitación 2.34% de proteína en forma de un concentrado protéico, con 84% de pureza, con posibilidades de ser utilizado en la suplementación de alimentos deficientes en amino-acidos azufrados, como soya y otros cereales, peces

datos toxicológicos dado que este aislado es rico en
tina y metionina.

RECOMENDACIONES

Serfa conveniente hacer estudios tendientes a recuperar los tóxicos de las colas del proceso de destoxificación debido al porcentaje elevado de éstos y a su potencial como inhibidores del apetito.

En la recuperación de aislado de protefna los rendimientos obtenidos en este trabajo fueron bajos por lo que podrfia intentarse en estudios posteriores, mejorar la recuperación de este aislado.

Se recomienda asf mismo hacer un estudio de utilización de protefna en rumiantes en cuyas dietas se incluya pasta de jojoba destoxificada mediante el proceso desarrollado en este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abramovich, R. y otros (1976) Vegetative Propagation of Simmondsia chinensis by Conventional Methods Jojoba Happenings, 17:3.
- 2.- Amber Bioscience Design, Inc. (1977). Reports 1, 2 y 3.
- 3.- B. Radziszewski, Ber. (1884). 17:1284.
- 4.- Elliger, C.A., A.C. Waiss and A. Booth, (1974), "Isolation of a Toxic Factor From Jojoba Meal" Life Sci. 15:1115-1120.
- 5.- Elliger, C.A., A. C. Waiss and A. Booth (1975); Destoxification of Jojoba Meal, U.S. 3, 9, 19, 432. Nov. 11 to. U.S.A. Department of Agriculture.
- 6.- Elliger, C.A., A.E. Waiss and R. E. Lunding (1974) "Structure and Stereochemistry of Simmondsin", J. Org. Chem. 39, 2930.
- 7.- Elliger, C.A., A. C. Waiss and R.E. Lunding (1973); "Simmondsin on Usual 2- Cyanomethylenecyclohexyl Glucoside from Simmondsia Californica", I Chem. Soc., Perk. Trans., 1, Nov. 19, 2202.
- 8.- Elliger, C.A., A.C. Waiss and R. E. Lunding (1974); "Cyanomethylenecyclohexyl Glucosides from Simmondsia californica". Phytochem. 13, 2319.
- 9.- Felger, R.S. and M. Beck (1974), Seri Indian Pharmacopocia, Economis Botanic. 28 (4): 414 - 436.
- 10.- Forti, M. 1976. Cultivation of Simmondsia chinensis (Jojoba), Jojoba Happenings, 17:2.
- 11.- Link, W.E. (1975). American Oil Chemist's Society. Official and Tentative Methods. 3 th ed., rev. Columbus, Ohio (1971-1975).

- 13.- National Research Council, (1977). Jojoba Part 1. Agriculture Development of Jojoba. Comite on Jojoba Production Systems Potential, Board on Agriculture and Renewable Resources. Commission on Natural Resources. Washington, D.C. National Academic of Science.
- 14.- R. Breslow, R. Fairweather and J. Keana, (1967) J. Am. Chem. Soc. 89: 2135.
- 15.- Sherdroke, W.C. Editor, (1977). Jojoba Seeds. Jojoba Happenings. 14: 21.
- 16.- Weber, Charles W. and Boddy L. Reid. (1975) "Toxic Effects of Simmondsia in Growing and Reproducing Mice", Federation Proc. 34:226.
- 17.- Wells, F.B., (1955), J. of Chem. Educ., 32: 157-159.
- 18.- Yermanos, D.M. y C. Duncan (1976) Jojoba Seeds. Phenotypic Whitin Plants Variability in Wax Content and Composition. J. Am. Oil Chem. Soc. 53 (11): 700-704.