

DESTOXIFICACION DE LA JOJOBA (Simmondsia chinensis [Link]
Schneider): ELIMINACION DE COMPUESTOS TOXICOS, EVALUACION
BIOLOGICA, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION PARCIAL DE SUS
COMPONENTES PRINCIPALES

por

Luis Angel Medina Juárez

Tesis Aceptada por el

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y ALIMENTOS

Como Requisito Parcial Para Obtener
El Grado de

MAESTRO EN CIENCIAS
DE NUTRICION Y ALIMENTOS

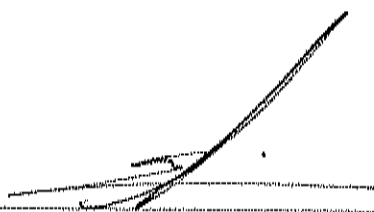
CENTRO DE INVESTIGACION EN ALIMENTOS Y DESARROLLO, A.C

Hermosillo, Sonora

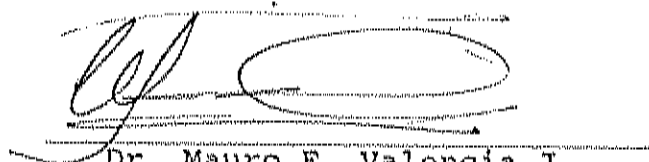
Mayo 1986

APROBACION

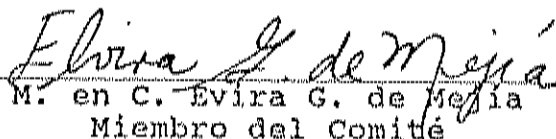
Los miembros del comité designado para revisar la Tesis de Luis Angel Medina Juárez la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Nutricion y Alimentos.



M. en C. Augusto Trejo González
Director de Tesis



Dr. Mauro E. Valencia J.
Miembro del Comité



M. en C. Evisa G. de Mejía
Miembro del Comité

Fecha: 26 de Mayo de 1986

DECLARACION DEL AUTOR

Esta Tesis se ha depositado en la biblioteca, como material de consulta y sujeto a las reglas de la misma.

Se permiten citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Se podrá solicitar permiso para otras mas amplias o la reproducción íntegra del documento para fines académicos, al jefe del Departamento. Bajo cualquier otra circunstancia, se deberá obtener el permiso del autor.

Con amor a:

Mi Esposa e Hijas

Con Profundo Cariño a:

Mis Padres y Hermanos

AGRADECIMIENTO

El más sincero agradecimiento a la Universidad de Sonora y al Sindicato de Empleados Maestros de la Universidad de Sonora (SEMUS) por la beca recibida. Al Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo A.C.(CIAD) por la condonación de la colegiatura. Al Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora(CICTUS). Al Dr. Carlos Peña Limón por el apoyo e interés que mostró durante mi preparación y trabajo de tesis. Al Dr. Mauro E. Valencia J. por el apoyo y asesoría recibida durante mis estudios y trabajo de tesis. Un especial reconocimiento al M. en C. Augusto Trejo González por su Dirección, la cual fué decisiva para la realización de este trabajo. A la M. en C. Elvira G. de Mejía por sus sugerencias. Al personal del Centro de Cómputo del CIAD. Al M. en C. Ricardo Ramonet. Al Sr. Fernando Lubbert A., y a todas aquellas personas que de alguna manera ayudaron a la realización de este trabajo.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN.	x
INTRODUCCION	1
REVISION DE LITERATURA	3
MATERIALES Y METODOS	22
Materia Prima	22
Remoción de la Testa de la Semilla de Jojoba.	22
Desengrasado de Almendra y Pasta de Jojoba.	22
Eliminación de Compuestos Tóxicos de la Jojoba.	23
Análisis de Macrocomponentes de la Semilla, Pasta residual, Harina Desengrasada y Destoxificada de Jojoba.	25
Extracción y Determinación Semicuantitativa de Simmondsina y Simmondsina-2-ferulato.	25
Análisis Semicuantitativo por Cromatografía en Capa Delgada.	26
Determinación Cuantitativa de Compuestos Fenólicos.	26
Evaluación Biológica con Ratas de las Harinas Destoxificadas de Jojoba.	27
Relación Neta de Proteína (NPR).	30
Diseño y Análisis Estadístico.	30
Separación por Solubilidad de las Proteínas y Carbohidratos del Harina Desengrasada de Jojoba	30
Absorción Diferencial Espectrofotométrica de Fenoles de Jojoba	33
Liberación de Antocianidinas	34
Aislamiento por Cromatografía en Columna de los Compuestos Fenólicos del Extracto Isopropanólico del Harina de Jojoba Desengrasada	34

Preparación de la Polivinilpirrolidona (PVP)	34
Eliminación de Partículas finas de PVP	35
Empacado de la PVP en las Columnas de Vidrio	35
Preparación del Extracto Isopropanólico del Harina de jojoba Desengrasada para Cromatografía.	36
Fracccionamiento y Desarrollo Cromatográfico del Extracto Isopropanólico del Harina de Jojoba Desengrasada sobre la Columna de PVP.	36
Cromatografía en Columna.	37
Determinación de los Espectros de Absorción al Ultravioleta del Extracto Isopropanólico del Harina de Jojoba Desengrasada.	37
RESULTADOS Y DISCUSION	38
Eliminación de Compuestos Tóxicos del Harina de Jojoba.	38
Evaluación Biológica del Harina Destoxificada	48
Relación Neta de Proteína.	51
Aislamiento de Proteínas y Carbohidratos de Jojoba de Acuerdo a sus Solubilidades.	54
Características de Solubilidad de las Proteínas de Jojoba en Función del pH.	57
Espectrofotometría de Extractos Alcohólicos de la Testa y Almendra de Semilla de Jojoba	63
Fracccionamiento de los Compuestos Fenólicos del Extracto Isopropanólico del Harina de Jojoba Desengrasada sobre la Columna de PVP	69
CONCLUSIONES	74
Comentarios Finales	76
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	78

LISTA DE CUADROS

Cuadro		página
1	Composición de la Semilla de Jojoba.	10
2	Comparación de la Composición de Aminoácidos (g/100g de muestra) de Pasta de Jojoba con Otros Concentrados Protéicos de uso Comercial.	20
3	Composición de la Dieta Basal Usada para la Evaluación Biológica de la Pasta y Harina Destoxificada de Jojoba.	29
4	Composición de la Pasta y Harina Desengrasada, Pasta y Harina Destoxificada y Testa de Semilla de Jojoba.	43
5	Contenido de Compuestos Cianogénicos y Fenoles en Pasta y Harina Desengrasada, Pasta y Harina Destoxificada y Testa de Semilla de Jojoba . . .	45
6	Contenido Residual de Simmondsina en Productos Destoxificados de Jojoba según Varios Autores. .	46
7	Efecto de la eliminación de Compuestos Tóxicos de las Pastas y Harinas de Jojoba en el Crecimiento y Mortalidad en ratas	48
8	Relación Neta de Proteína (NPR), NPR Relativo de Pasta y Harina de Jojoba.	52
9	Relación Neta de Proteína (NPR), NPR Relativo de Pasta y Harina de Jojoba Destoxificada, Comparada con Caseína y Otras Plantas de Zonas Áridas	53
10	Distribución de Proteínas y Carbohidratos de Jojoba, de Acuerdo a sus Propiedades de Solubilidad.	56
11	Distribución Protéica de Jojoba según Varios Autores.	61

LISTA DE FIGURAS

Figura		
1	Avance del Desierto en el Estado de Sonora . . .	5
2	Distribución Geográfica de Jojoba Silvestre. . .	7
3	Anatomía de la Semilla de Jojoba	9
4	Compuestos Cianogénicos Presentes en Pasta de Jojoba	13
5	Diagrama de Eliminación de Compuestos Tóxicos de la Jojoba	24
6	Esquema de la Extracción de Proteína y Carbohidratos de Harina de Jojoba de Acuerdo a su Solubilidad.	32
7	Curvas de Extracción de Simmondsina y Fenoles con Mezclas Isopropanol- Agua.	40
8	Curva de Extracción de Fenoles de la Jojoba con Isopropanol al 70%, con Relación al Tiempo . . .	42
9	Curvas de Solubilidad de Proteína de Jojoba en Relación al pH	58
10	Curvas de Solubilidad de Globulinas en relación al pH y NaCl	60
11	Espectro de Absorción por Diferencia en la Región UV del Extracto Metanólico de la Testa de Semilla de Jojoba	64
12	Espectro de Absorción de la Antocianidina (Malvidina) de Testa de Jojoba	66
13	Estructura Presuntiva de Taninos, (Proantocianidina) (I), Malvidina (II), y sus productos de Degradación (III).	67
14	Espectro de Absorción por Diferencia en la Región UV del Extracto Isopropanólico de Harina de Jojoba.	70
15	Fraccionamiento Cromatográfico del Extracto Isopropanólico de Jojoba Sobre la Columna de PVP	71

RESUMEN

La jojoba es una planta endémica del Desierto Sonorense, que tiene semillas constituidas en un 50% de una cera líquida llamada aceite de jojoba de gran interés industrial y el 50% residual de otros compuestos, entre los que destaca un 30% de proteína, sin embargo dicho residuo contiene compuestos tóxicos, por lo que hasta ahora ha sido poco utilizada como ingrediente en la formulación de alimento para animales.

Los objetivos del presente trabajo fueron destoxificar la pasta y harina de jojoba, su evaluación biológica con ratas y el aislamiento y caracterización de sus componentes principales.

El proceso de destoxificación consistió en extraer la pasta y harina de jojoba con una mezcla de isopropanol-agua (70:30), logrando reducir los compuestos fenólicos en un 86% y las simmondsinas totalmente, estos dos productos destoxificados después fueron evaluados con ratas resultando tener sus NPR similares a la dieta control ($p > 0.05$).

Se aislaron tres fracciones protéicas de la harina de jojoba destoxificada, la mayor fué la fracción acuosa la cual representó el 61.8% de la proteína total, la segunda fracción fué la soluble en solución salina (0.5M), la cual representó el 23.6% y por último la fracción alcalina (pH=10.0), la cual representó el 14.6% de la proteína. Después se le determinó a cada una de las fracciones la curva de solubilidad en función del pH, con lo que se logró definir las regiones de pH de máxima solubilidad y punto isoeléctrico.

Se empleó una prueba presuntiva para conocer la clase de compuestos fenólicos que estaban presentes en testa y almendra de semilla de jojoba.

Se mostró la evidencia de un compuesto flavonoide en la testa de jojoba, cuya presencia en las hojas de la planta ya ha sido descrita, que apoya aún más la quimotaxonomía de la jojoba dentro de la familia Simmondseeae, este fué malvidina.

INTRODUCCION

La jojoba, Simmondsia chinensis (Link) Schneider, es una planta angiosperma perenne originaria del desierto de Sonora, que en época muy reciente ha recibido gran atención por parte de estudiosos de muchas disciplinas, debido sobre todo a que en sus semillas se encuentra una cera líquida que presenta como característica principal el estar compuesta por ésteres con cadenas de 40 a 44 carbonos cuyos ácidos grasos tienen de 14 a 24 carbonos con 1 ó 2 insaturaciones, por esta razón las propiedades físicas son muy suigéneris para un aceite de origen vegetal, como su resistencia a la rancidez, su pureza y que no tiene olor, [Miwa, 1971].

La jojoba es una planta de reciente interés industrial, lo que ha propiciado que se le cultive en forma intensiva como cualquier otro cultivo comercial, dando como resultado un proceso acelerado de domesticación de la planta, ya que la existente hasta hace poco tiempo era la de habitat silvestre.

Esta planta ha sido diseminada por el hombre prácticamente a todas aquellas latitudes que presentan características ecológicas semejantes a las que imperan en el Desierto de Sonora.

En el momento actual, en Estados Unidos se tienen cultivadas 16,000 Has. y se siguen abriendo más áreas para su cultivo [Yermanos, 1983].

Existe una queja de parte de los industriales internacionales de la jojoba, en el sentido de que no se produce la cantidad de semilla suficiente para hacer más atractivo su proce

samiento y abaratar los costos, pero llegado el momento que seguramente ocurrirá, el aprovechamiento integral de la planta, será un hecho, [Miller, 1978].

Como resultado de la extracción de la cera líquida de la jojoba por cualquier método físico, se obtiene un residuo conocido como "pasta de jojoba", que como en el caso de "pastas" de otras oleaginosas se procura utilizar en la formulación de alimentos balanceados para animales e incluso para la fabricación de nuevos alimentos para el hombre. Todo esto con el fin principal de integrar los procesos industriales y que sean utilizados todos los subproductos, y de esta manera hacer más redituable su industrialización, [Baker, 1970].

La jojoba posee un fruto el cual está constituido en un 50% de una cera líquida llamada aceite de jojoba y el 50% residual de otros compuestos, entre los que se destaca un 30% de proteína, dándole un valor potencial en la alimentación para animales. Sin embargo dicho residuo contiene compuestos tóxicos, lo que hasta ahora ha evitado que sea utilizada como ingrediente en la formulación de alimento para animales, [Bower et al., 1982].

Los objetivos del presente trabajo son:

- Eliminación de los compuestos tóxicos de la pasta y harina de jojoba
- Evaluación biológica de la harina destoxificada
- Aislamiento y caracterización parcial de sus componentes principales.

REVISION DE LITERATURA

La Desertificación en México

La Desertificación es el resultado de la combinación de factores ambientales, económicos, sociales y políticos [Ball, 1983].

Si bién es cierto que en México existen causas naturales que condicionan o favorecen la existencia de zonas áridas y los procesos de desertificación, también lo és, que la actividad humana puede incrementar o detener el efecto nocivo de muchos fenómenos naturales, convirtiéndose frecuentemente en factor determinante de dicho proceso. La desertificación en México avanza a una tasa estimada entre 100,000 a 200,000 Has. por año, [Parodi y Trueba, 1978].

En este país, ha sido frecuente el devastamiento y alteración de los ecosistemas, provocando que los efectos de la aridez sean mayores y la desertificación se convierta en un enemigo del potencial biológico, de la producción agrícola y del bienestar humano.

El caso de la Costa de Hermosillo

En el intento por hacer producir al desierto, el hombre puede volverlo un huerto, y otra vez desierto, si aplica agua en exceso en terrenos mal drenados, como frecuentemente se hace. Esto sucede en el Estado de Sonora, donde más del 50% de su superficie es considerada árida o semiárida y por lo cual se

incluye dentro de las áreas de alto índice de erosión, [Fig. 1]. Debido a que se han adaptado a estas áreas que se caracterizan por su poca precipitación pluvial [250-300 mm.], cultivos de origen tropical, como el algodón, los cuales han provocado erosión debido a una mala administración del agua, a la extracción de los mantos acuíferos en mayores volúmenes que los de la recarga, el abatimiento de los niveles y, finalmente la intrusión salina del mar. Esto es causa además de una explotación intensiva de la tierra sin ningún control ecológico; en otros términos, se hace producir al desierto pero a un costo ecológico muy alto, pues para adaptar estos cultivos tropicales tuvo que haber primero un desmonte de estos terrenos, eliminando toda la flora y fauna natural que existían.

La sobreexplotación de los mantos acuíferos del Distrito de Desarrollo Rural de la Costa de Hermosillo, ha llegado a tal grado, que a petición de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH), se decretó en el Diario Oficial del 25 de enero de 1980 la relocalización de este distrito en zonas donde no existiera dicho problema, con el fin de reducir la extracción de agua del acuífero y disminuir la degradación de sus suelos.

En algunos países se ha detenido el avance de los desiertos, como es el caso de Argelia, donde la meta fué plantar 6 millones de árboles en un cinturón de 1600 Km., que atraviesa la franja norte del desierto del Sahara. Esta nueva vegetación protege contra las tormentas de arena y aumentará la humedad de la superficie. Además, la experiencia de China confirma que los desiertos

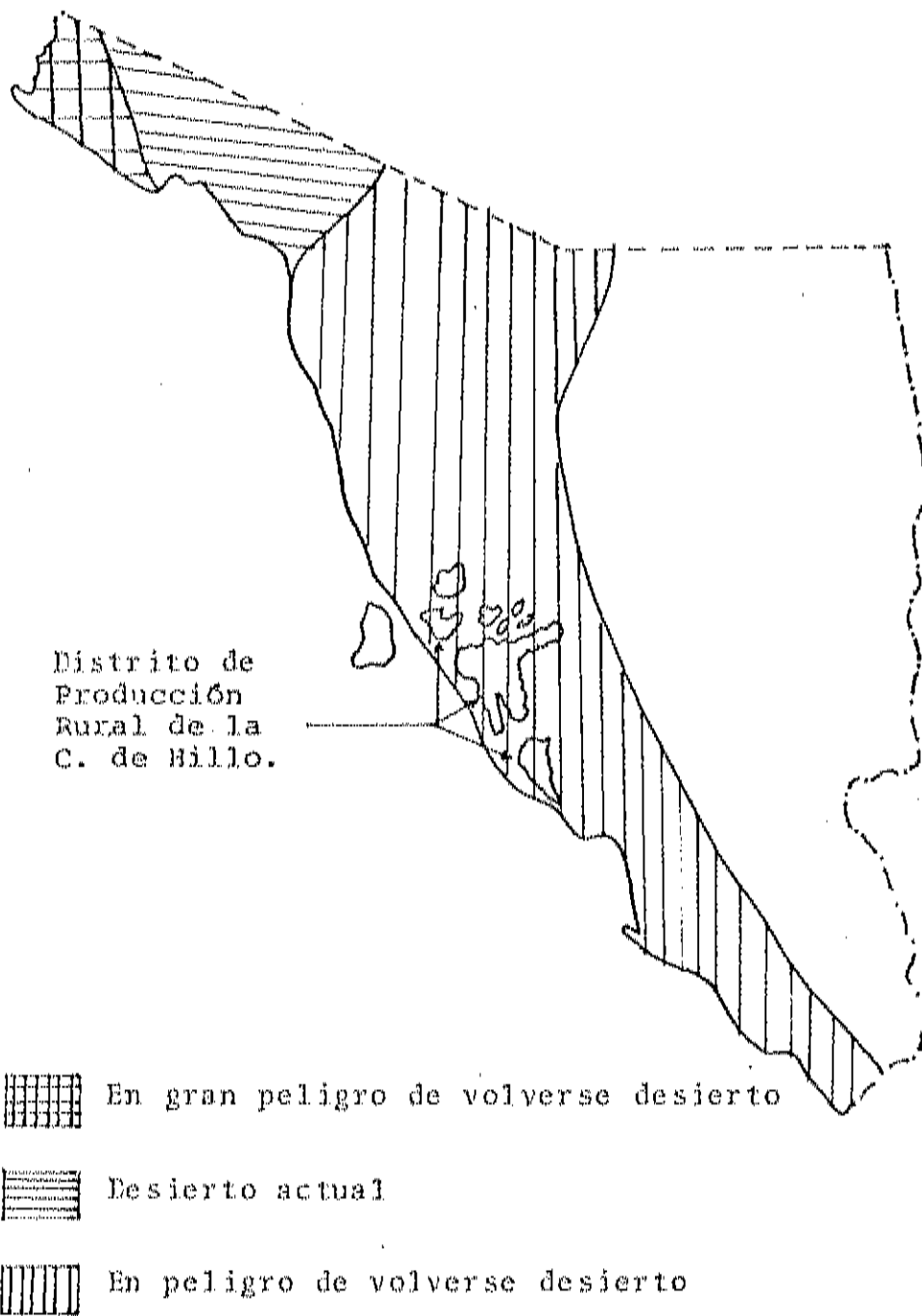


Fig. 1.-Avance del Desierto en el Estado de Sonora.

Tomado de: Campos, 1979.

pueden ser domesticados. Más de la décima parte de su territorio está constituida por desiertos, los cuales han sido transformados mediante la plantación de árboles, pasto, construcción de muros contra viento y arena y el desarrollo de proyectos de conservación de agua; decenas de miles de kilómetros de desierto han sido puestos bajo cultivo y muchos más se han convertido en pastizales, [Moore y Collens, 1982].

Un mecanismo para combatir la desertificación en la región de la Costa de Hermosillo, es a través de un plan de revegetación o restitución del área erosionada con la renovación de la cubierta vegetal, utilizando especies ecológicamente adaptadas a cada zona, ya sean frutales, pastizales y de aprovechamiento industrial como la jojoba, [Oballe, 1980]. Esto se puede lograr con plantas nativas de estas regiones que son resistentes a la alta salinidad del suelo y del agua y también a las altas temperaturas imperantes.

La Jojoba

La jojoba, es una planta silvestre de suelos áridos y originaria de los Estados de Sonora y Baja California en México, y Arizona y California en Estados Unidos, (Fig. 2). Por lo general la jojoba se encuentra a una altura entre 500 y 1,500 m.; sin embargo, en México puede encontrarse en lugares al nivel del mar. El área donde se encuentra distribuida, tiene suelos que son por lo general infértiles y la precipitación varía entre los 100 a 500 mm por año. La jojoba silvestre se haya confinada a un área

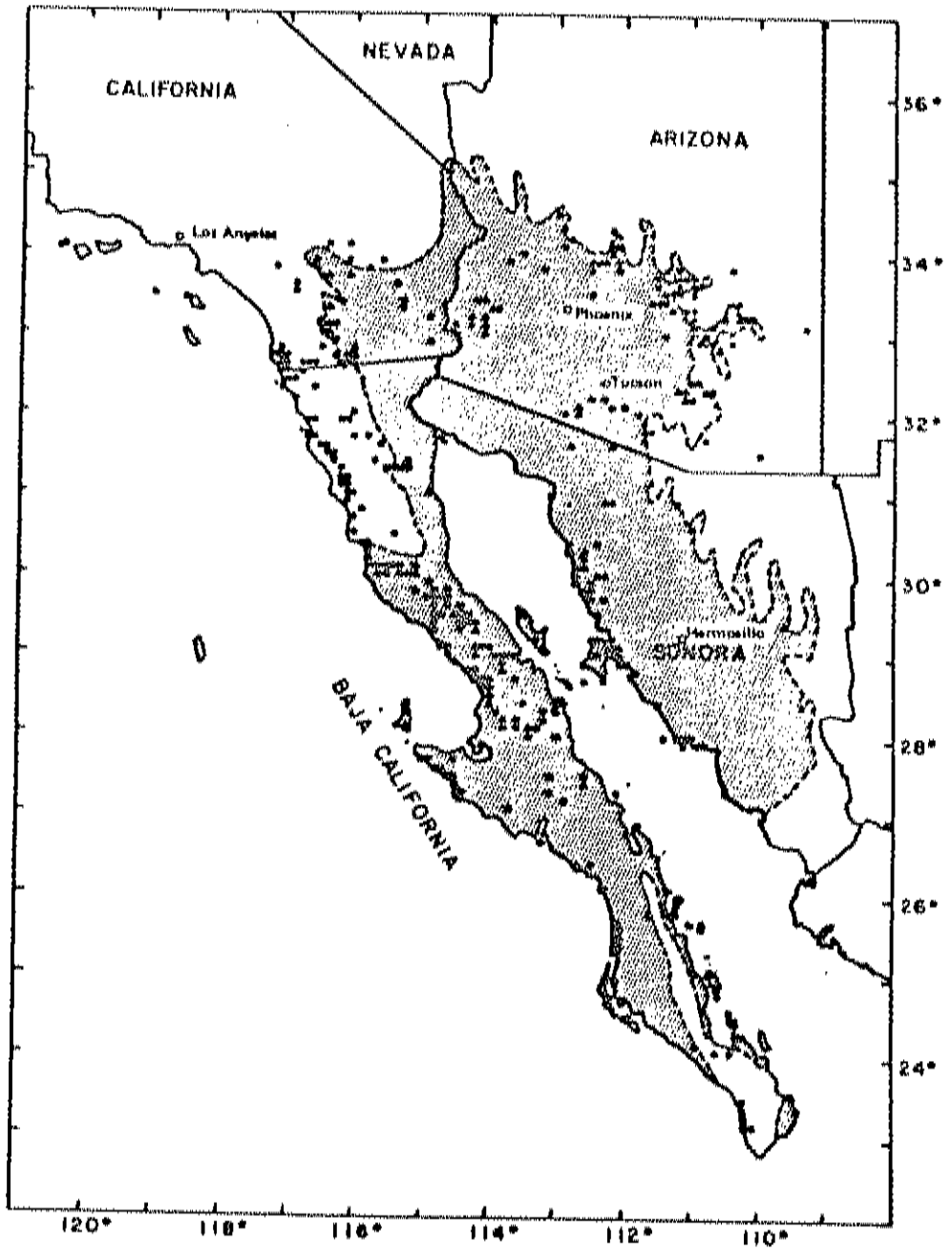


Fig. 2. Distribución Geográfica de Jojoba Silvestre

geográfica donde las temperaturas no son menores a 7°C bajo cero; heladas ligeras tienen un efecto letal para las plántulas; sin embargo, las plantas más desarrolladas no son seriamente afectadas, [Gentry, 1958]. Esta planta crece en diversos tipos de suelos que van desde rocas porosas, hasta suelos arcillosos; desde suelos ácidos hasta alcalinos y posee la capacidad de desarrollarse en suelos con altas concentraciones de sales. Las plantas silvestres de jojoba tienen un rango de adaptación limitada. Sin embargo, tal como ha sucedido con otros cultivos, es de esperarse que a través de mejoramiento genético se desarrolle la capacidad para ser adaptada y cultivada en forma intensiva.

La planta produce un fruto (Fig. 3) con un contenido aproximado del 50% de cera líquida, (Cuadro 1); muy similar al aceite de la ballena esperma, [Sherdroke, 1977]. La composición química de este aceite es diferente a la de otros aceites vegetales, ya que es una cera líquida formada por ácidos y alcoholes con 1 ó 2 insaturaciones y cadenas de 14 a 24 carbonos, [Miwa, 1971]; este aceite tiene un gran potencial como lubricante, pulidor, aislante eléctrico y en la industria de cosméticos, textil y farmacéutica, [Yermanos, 1974].

Existen en el desierto de Sonora aproximadamente 19,000 hectáreas de jojoba bajo cultivo, las cuales fueron establecidas entre 1977 a 1982, [Yermanos, 1983]. De este total el 84.6%, es decir, 16,000 hectáreas se encuentran en los Estados de Arizona y California en Estados Unidos; mientras que en México se han

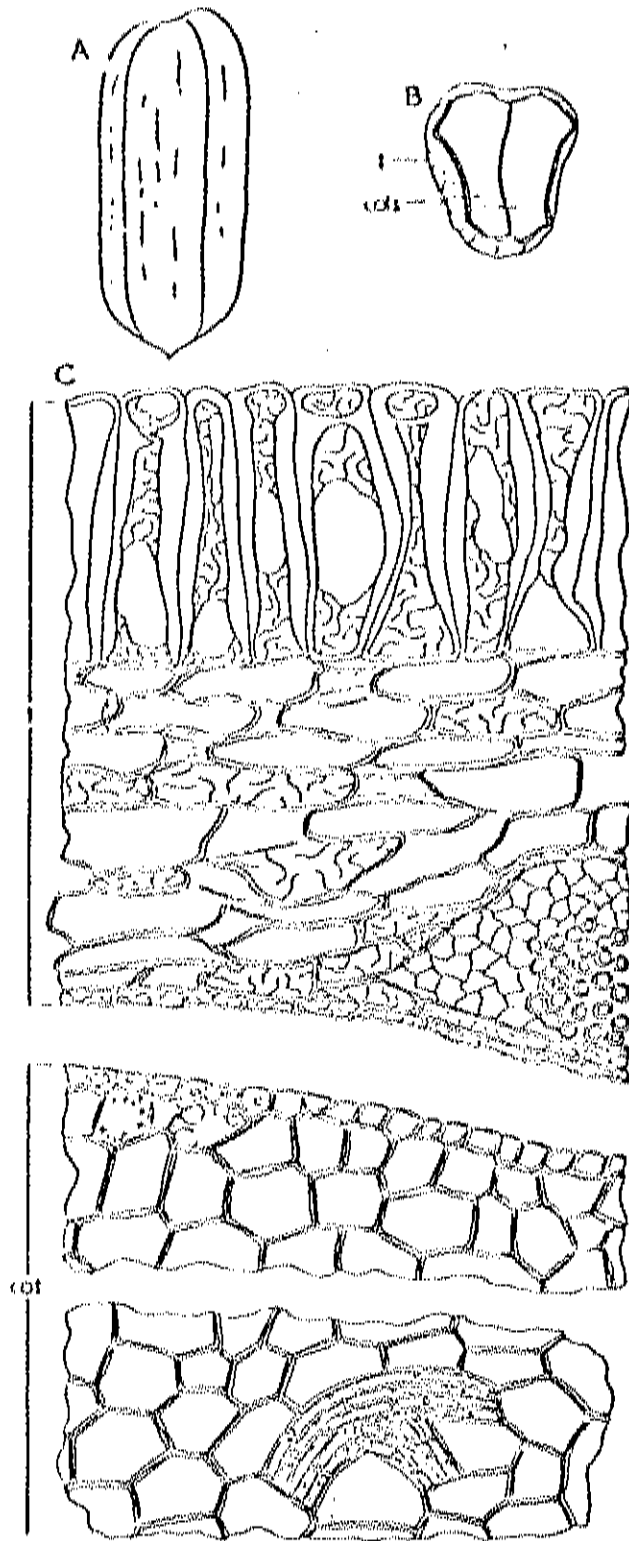


Fig. 3. Anatomía de la Semilla de Jojoba, Testa(t), Cotiledón(cot).

Cuadro 1. Composición de la Semilla de Jojoba

	Semilla %	Testa %
Aceite	52.00	0.70
Pasta residual	46.50	-
Proteína [N x 6.25]	15.00	7.00
Fibra cruda	3.80	15.60
Cenizas	1.50	4.40
Humedad	4.45	10.70
Carbohidratos		
Azúcares reductores	2.90	-
Azúcares no reductores	1.21	-
Azúcares totales	4.11	3.33
Otros polisacáridos	18.80	-

Tomado de: Verbiscar y Banigan, (1978).

establecido 2,025 Has. principalmente en el estado de Sonora. Considerando la edad de las plantaciones (4 a 6 años) en ambos países, la producción de semilla y por supuesto de aceite, se elevará significativamente a partir de 1986, con una producción estimada de 2,500 toneladas de semilla. Esto traerá como consecuencia una gran cantidad de pasta residual de jojoba la cual se podría utilizar como fuente protéica en la alimentación de animales y al mismo tiempo influir económicamente sobre el proceso de extracción del aceite de jojoba, [Murrieta, 1983].

Factores Tóxicos y Antinutricionales en la Pasta Residual de Jojoba

No se encontraron testimonios documentales sobre la utilización de la jojoba como alimento para humanos, en su región de origen; a excepción del uso como planta medicinal entre la tribu Serí de Sonora, [Felger y Moser, 1974]. Se informa su uso antiguo como cosmético para el cabello, y propiedades curativas, [Martínez, 1969].

La toxicidad es el mayor problema que se presenta al tratar de utilizar a la jojoba o su pasta residual como alimento. Esto es atribuido fundamentalmente a la presencia de compuestos cianogénicos (simmondsinas), [Booth et. al., 1974], compuestos polifenólicos e inhibidor de tripsina, [Wiseman y Price 1986].

Simmondsinas

Las simmondsinas son una familia de 4 compuestos que se comportan como factores antinutricionales, que ingeridos por

animales en dietas a niveles sumamente bajos, ocasionan una reducción en el consumo de alimentos, [Verbiscar y Banigan, 1977]; algunos investigadores han utilizado la pasta de jojoba en la alimentación de monogástricos, observando que la pérdida de peso y mortalidad fueron directamente proporcionales al incremento del porcentaje de la pasta en la dieta, [Booth et al., 1974; Verbiscar et. al., 1980; Weber y Reid, 1975].

La simmondsina fué primeramente aislada y caracterizada por Elliger et. al., en 1973, [Fig. 4], ésta es la causante de la pérdida de peso, bajo crecimiento, pérdida de apetito y en algunos casos causa la muerte en ratas y ratones, [Williams, 1980; Verbiscar y Banigan, 1978; Booth et. al., 1974]. Hay estudios en los que se informa que al incluir 15% de pasta de jojoba en la dieta de ratas, éstas mueren en menos de dos semanas. Estudios de Booth et. al., en 1974, con ratas a las cuales se les administró simmondsina pura en 0.30%, arrojaron como resultado la pérdida de apetito y pérdida de peso. El valor LD₅₀ de simmondsina para ratas es de 4g/kg [Elliger et al., 1973].

Se han hecho estudios sobre la toxicidad de la simmondsina, observándose que el radical cianuro bloquea la citocromo oxidasa de la cadena respiratoria, debido a esto hay acumulación de grasa en el hígado, baja el nivel de sodio en los riñones y se reducen las funciones del cerebro, dando como resultado la muerte, [De Bruin, 1976]. En 1980, Williams, suministró a ratones jóvenes una sola dosis oral de simmondsina de 12.95 g/kg en peso: los animales se mantuvieron en observación durante 19 días, y no se

presentó ningún síntoma de toxicidad. A otros se les dieron dosis diarias de 750 mg/kg de peso durante 5 días, observándose cambios no significativos en el peso comparados con el control y no se presentaron otros síntomas de toxicidad. El estudio de Williams, (1980), concluye que probablemente la toxicidad de la pasta de jojoba, no es solo debido a la simmondsina, sino a otros compuestos que junto con la simmondsina provocan pérdida de peso y la muerte en ratas.

Si tomamos en cuenta que la dosis letal de HCN en el hombre es de 0.5 a 3.5 mg/kg de peso (Bourdoux et al., 1980), un hombre con un peso promedio de 60 kg tendría que ingerir de 0.37kg a 2.62kg de pasta de jojoba destoxificada para tomar una dosis letal de HCN, esto es suponiendo que el 100% de simmondsina fuera transformado en el organismo a HCN, lo cual no sucede en ratas.

Compuestos Fenólicos

Taninos

Los taninos, son grupos de compuestos fenólicos con un peso molecular entre 500 y 3,000, que tienen la propiedad de precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas, produciendo sabor astringente al consumirlos, [Gupta y Haslam, 1979]. Estos compuestos se encuentran en muchas plantas, incluyendo: árboles(encino), frutas y pastos. A estos compuestos se les llama taninos, porque convierten la piel del animal en cuero durante el curtido. Existen dos clases de taninos: los hidrolizables (ác. tánico), que se hidrolizan en azúcar y ácido fenólico (ác.

gálico), cuando son tratados con ácido, álcali o enzimas hidrolíticas. El otro grupo es el de los taninos condensados o no hidrolizables, que son polímeros que resultan de la condensación de varias unidades de flavan-3-ol, [Hahn D. H. et al., 1984].

Los taninos y en general los compuestos polifenólicos, se unen a proteínas o carbohidratos formando un complejo de adición que no puede ser metabolizado por los organismos, de ahí que, estos complejos tanino-proteína, puedan ser causantes de pérdida de peso en animales de experimentación, [Glick y Joslyn, 1970]. Estos complejos se pueden formar por medio de puentes de hidrógeno los cuales son reversibles, pero cuando se forman por oxidación o condensación covalente con aminas N-sustituídas, son irreversibles. Los taninos hidrolisables se unen fuertemente a proteínas a pH entre 3 y 4, esta unión se rompe a pH mayor de 5. Los taninos condensados forman uniones a pH entre 7 y 8, esta unión se rompe a pH mayor de 8, [VanSumere et al., 1975].

Una de las formas como se ha logrado reducir el contenido de compuestos polifenólicos en los concentrados protéicos, es lavando a estos con metanol-acetona y metanol-ácido clorhídrico 1N; otro método menos efectivo es utilizando glucosa oxidasa, una combinación entre estos dos métodos parece producir buenos resultados, [Wiseman y Price, 1986].

Los compuestos fenólicos son sintetizados tanto por animales como en plantas. En el caso de los animales la: catecolamina y la indolamina fenólica intervienen en la acción nerviosa; tirosina-dopa en la formación de melanina y la tirosina en proteína. A

diferencia de la poca cantidad de fenoles producidos en animales, en las plantas se produce una gran cantidad de compuestos fenólicos, estos compuestos fenólicos sintetizados en las plantas juegan un papel muy importante en su evolución y adaptación al medio ambiente. La toxicidad de los compuestos fenólicos de las plantas se presenta cuando estas plantas son ingeridas por los animales, ya que los fenoles compiten en las funciones normales que realizan los fenoles sintetizados por los animales. El metabolismo de catecolaminas puede interferirse causando, alucinaciones, espasmos o convulsiones. Cuando la ingesta de fenoles es por largos períodos de tiempo la toxicidad se presenta por interferencia o antagonismo con compuestos vitales como la vitamina K, vitamina E y estrógenos, produciendo en el animal daños en el hígado, [Singleton y Kratzer, 1969].

Existen algunos trabajos que informan sobre los efectos tóxicos de fenoles al incorporarlos a la dieta de animales: en ratones, [Mitjavila et al., 1970], ratas, [Glick y Joslyn, 1970; Jambunathan y Mertz, 1973] y pollos [Chang y Fuller, 1964; Vohra et al., 1966]; sin embargo se han dado dietas a conejos con 3% de ácido tánico, no habiéndose observado ningún efecto adverso significativo con respecto a los conejos alimentados con la dieta patrón, [Ngoupayou et al., 1985].

Flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, algunos son responsables de sabores amargos y de la coloración que presentan las

flores, hojas, semillas y frutos. Estos representan un amplio grupo con una gran diversidad de funciones fisiológicas y bioquímicas, entre ellos, la de regulación del crecimiento, inhibidores de respiración y de actividades enzimáticas, [Robinson, 1983].

También la presencia de compuestos flavonoides se utiliza en la llamada quimotaxonomía, que agrupa a las plantas de acuerdo a su origen, evolución y su colocación en la familia de plantas respectiva o sistemática, [Siegler, 1981].

Inhibidor de Tripsina y Acido Fítico

Otros de los antinutrientes reportados en jojoba son: inhibidor de tripsina y ácido fólico. En el caso del inhibidor de tripsina, Wiseman y Price (1986), informan una concentración de este antinutriente de 4.5 TIU/g, en pasta de jojoba desengrasada, sin embargo aclaran que este inhibidor es fácilmente extraído con solventes. En otro trabajo realizado por Storey et al., (1983), se observó que el inhibidor de tripsina en pasta de jojoba era termolábil y podría ser inactivado hirviendo la pasta de jojoba en agua durante 1 min.

En el caso del ácido fólico, estos dos grupos de investigadores coincidieron en señalar que los niveles de concentración de ácido fólico en pasta de jojoba desengrasada (7.34×10^{-5} - 1.07×10^{-4} g de ácido fólico / g de pasta de jojoba) estaban muy por debajo de los informados para pasta de soya comercial (1.4×10^{-2} g ácido fólico / g de muestra).

Eliminación de Compuestos Tóxicos de la Pasta de Jojoba

Con el fin de eliminar los compuestos tóxicos de la pasta de jojoba, se han probado algunos métodos de destoxificación como: extracción con solventes puros (agua, metanol, isopropanol, y acetona), calentamiento y tratamiento químico transformando el grupo cianometilen en amida, a través del empleo de hidróxido de amonio más peróxido de hidrógeno, [Verbiscar et al., 1980]. Otro método de destoxificación utilizado recientemente es el microbioano, el cual consiste en inocular a la pasta de jojoba con Lactobacillus acidophilus y Lactobacillus bulgaricus; por este método se logra una reducción de simmondsina del 95% al 98%, [Verbiscar et al., 1981]. La pasta de jojoba destoxificada por este método se ha utilizado para alimentar borregos, [Verbiscar et al., 1981], pollos [Ngoupayou et al., 1982], y conejos [Ngoupayou et al., 1985], habiéndose encontrado resultados semejantes a los de animales alimentados con dieta patrón y además haciendo a la pasta de jojoba mas apetitosa.

Proteínas Contenidas en la Semilla de Jojoba

La soya ha sido uno de los vegetales más estudiados para obtener concentrados y aislados protéicos, estos estudios han servido de base para la obtención de concentrados a partir de otros vegetales. Meyer en (1970), definió a los concentrados de soya como aquellos alimentos que tienen un mínimo de 70% de proteína en base seca y un aislado protéico, como aquel que tiene no menos de 90% de proteína en base seca. Esta definición se

considera que debe aplicarse a concentrados protéicos obtenidos de fuentes diferentes a la soya y no necesariamente a partir de un subproducto de la industria aceitera.

Con base en lo anterior, se obtuvo un concentrado a partir de pasta de jojoba, resultante de la extracción del aceite en dicha semilla y que hasta ahora no tiene ningún uso debido principalmente al contenido de tóxicos, [Cardoso, 1980]. Actualmente existe un gran desarrollo tecnológico en la producción de harinas de pasta residuales de oleaginosas como las obtenidas del cacahuate, algodón, soya, girasol y ajonjolí, las cuales se utilizan en la complementación de alimentos para animales, [Noyes, 1969].

De la misma manera se obtiene una pasta de semilla de jojoba, la cual sería un importante subproducto de la obtención del aceite de esta semilla. Esta pasta contiene de 28-32% de proteína, 28.3% de carbohidratos y 10-12% de fibra cruda, constituyendo un producto con potencial para ser utilizado en la alimentación de animales, [National Research Council, 1985].

En el Cuadro 2, se encuentra el contenido de aminoácidos indispensables de pasta de jojoba obtenida de semilla de la Costa de Hermosillo, comparada con otros concentrados protéicos comerciales. De acuerdo con los datos de este cuadro se observa que el valor nutritivo potencial de la pasta de jojoba, es comparable con la de otros concentrados protéicos, utilizados en la alimentación de monogástricos, [Storey et al., 1983].

La proteína de la pasta de jojoba, fué primeramente estudiada por Samac, et al., (1980), habiéndose obtenido las

Cuadro 2. Comparación de la Composición de Aminoácidos (g /100 g de muestra) de Pasta de Jojoba con Otros Concentrados Protéicos de uso Comercial.(1)

	Pasta de Jojoba(2)	Harina de Algodón	Harina de Cártamo	Harina de Cacahuete
Proteína Cruda	29.0	50.0	42.5	50.0
Arginina	2.73	5.00	3.70	5.0
Lisina	2.10	2.15	1.30	1.7
Metionina	0.32	0.77	0.70	0.45
Triptofano	0.96	0.56	0.60	0.50
Treonina	2.12	1.77	1.30	1.10
Fenilalanina	1.10	3.05	-	-
Leucina	1.86	3.00	-	-
Isoleucina	7.00	1.88	-	-
Valina	1.30	1.78	-	-
Histidina	9.6	1.31	-	-

(1) Tomados de: Patrick y Schaible, (1980); Mc. Donald et al., (1981).

(2) Tomado de: Storey et al., (1983).

siguientes fracciones: 33% de glutelina, 29% de globulina, 35% de albúmina y 0% de prolamina. Un segundo estudio, lo realizó Cardoso en 1980, caracterizando la proteína de la jojoba de acuerdo a su solubilidad. La extracción de la semilla de jojoba fué hecha con agua destilada para obtener albúmina; al residuo se le extrajo con NaCl al 10% para obtener globulinas, al segundo residuo se le extrajo con etanol al 70% para obtener prolaminas y por último con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para obtener glutelinas; resultando que la albúmina fué la mayor fracción con 65% de la proteína total, globulina 21%, glutelinas 6% y prolaminas 8%. Se determinaron las propiedades funcionales de estas proteínas, resultando ser comparables con las de otras oleaginosas.

Un tercer estudio fué realizado por Shah y Stegemann (1983), donde se encontró de 26 a 32% de proteína, de la cual el 80% fué soluble y tuvo un punto isoeléctrico entre 3.9 y 6.4.

En el concentrado protéico de pasta de jojoba obtenido por Wiseman (1983), se redujeron los grupos fenólicos de 81 mg/g en la pasta a 2 mg/g; la simmondsina se redujo de 4.5% a 1% y el inhibidor de tripsina fué inactivado totalmente con temperatura, concluyéndose que los factores antinutricionales fueron eliminados.

Wiseman y Price (1986), obtuvieron concentrados de pasta de jojoba con valores no mayores de 60% de proteína, debido a las altas concentraciones de grupos fenólicos encontrados en la pasta, los cuales interfieren en el proceso.

MATERIALES Y METODOS

Materia Prima

La materia prima utilizada en este trabajo fué semilla de jojoba, cosechada en 1985 en el campo Santa Czarina de la Costa de Hermosillo y fué proporcionada por el Sr. Fernando Lubbert A.. Además se utilizó semilla de jojoba proveniente del Campo Agrícola Experimental de la Costa de Hermosillo del Centro de Investigaciones Agrícolas del Noroeste (CIANO), proporcionada por el M. en C. Ricardo Ramonet, y pasta residual de la extracción de aceite de la planta piloto del Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (CICTUS).

Remoción de la Testa de la Semilla de Jojoba

La semilla de jojoba fué sometida a varios tratamientos térmicos con agua (vapor y agua caliente), para remover la testa. Una vez que se ha separado la testa, el almendra se pone a secar en una estufa de aire forzado a 45 °C por 4 horas y después se desengrasa.

Desengrasado de Almendra y Pasta de Jojoba

Las semillas de jojoba con testa, y sin testa, fueron molidas en una licuadora por 4 min. con hexano como disolvente con una relación semilla /hexano de 1:2; y después se pasaron a un extractor tipo Soxhlet para extraerse con hexano con una relación almendra/solvente 1:6, durante 24 horas. A el harina

desengrasada resultante le fueron eliminados los residuos de hexano por 24 horas a 50 °C, en una estufa de aire forzado. La pasta obtenida de la extracción mecánica del aceite de la semilla de jojoba del CICTUS, tiene un 12% de aceite residual, el cual se extrajo con hexano siguiendo el proceso anterior.

Eliminación de Compuestos Tóxicos de la Jojoba

El harina sin solventes y seca, fué molida en un molino de fricción (Ciclotec 1092, TECATOR AB), obteniéndose un polvo con tamaño de partícula de 0.5 mm. Esta harina fué extraída con isopropanol a diferentes diluciones con agua y diferentes tiempos con una relación solvente/pasta de 10:1, a temperatura ambiente y con agitación con un agitador de flecha (Plysciense Corp., modelo RZR10), esta extracción se repitió tres veces; al cabo de los tiempos de extracción se filtró a través de un embudo Buchner de porcelana y papel filtro Whatman No.1 con presión reducida. Al filtrado obtenido se le determinó proteína soluble y la harina se pasó a secar a una estufa con flujo de aire forzado (Shel-Lab modelo 4), a 45 °C durante 4 horas, Fig. 5. Una vez seca la harina de jojoba se procedió a realizar un análisis de macrocomponentes, y se cuantificaron los tóxicos residuales y el contenido de taninos.

Para lograr las condiciones óptimas para extracción de los tóxicos se tomó en cuenta la influencia que pudieran tener cada uno de los siguientes parámetros:

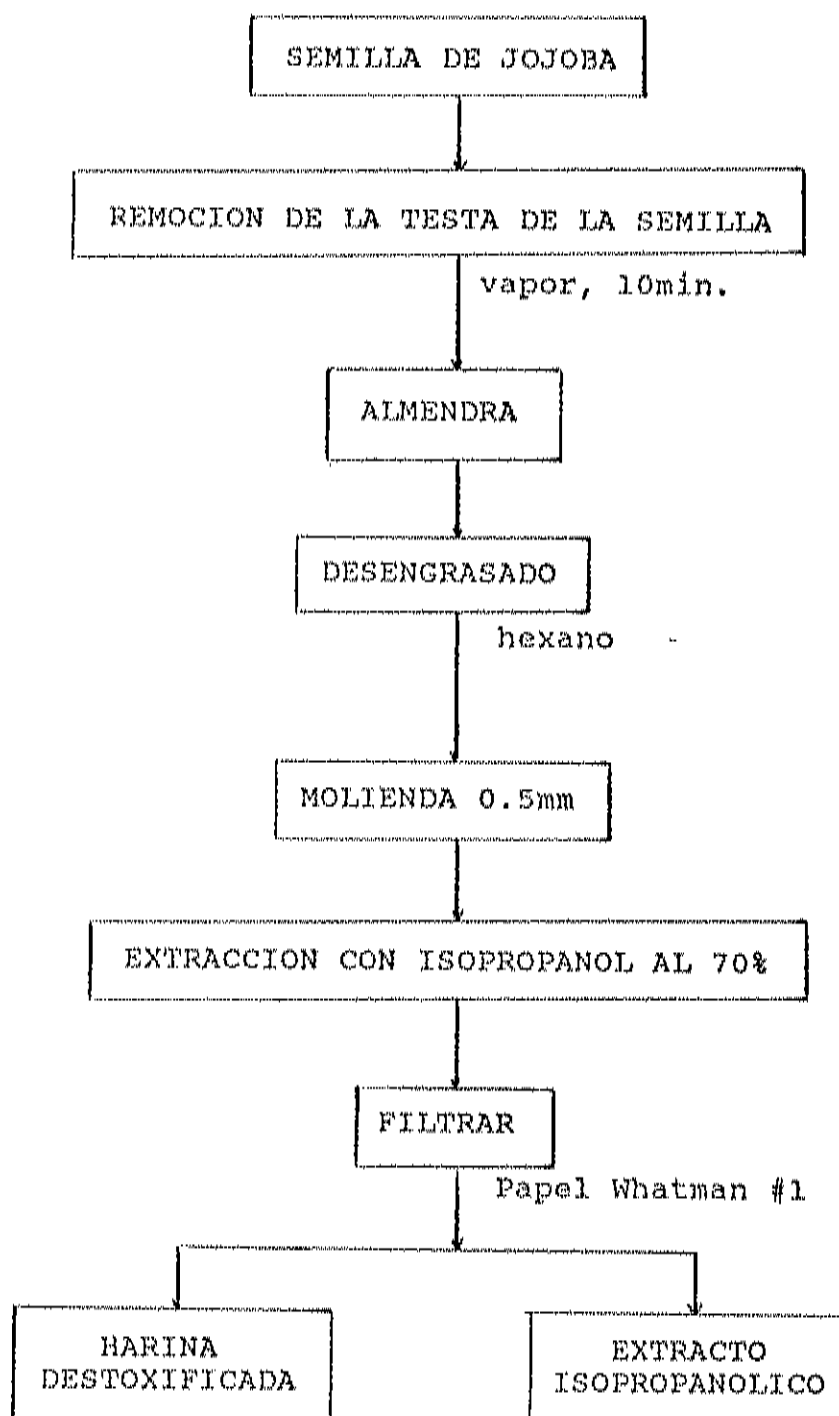


Fig. 5. Diagrama de Eliminación de Compuestos Tóxicos de la Jojoba.

- Relación isopropanol:agua.- Se probaron varias mezclas de isopropanol-agua para lograr el máximo de extracción tanto de taninos como de simmondsina y de simmondsina-2-ferulato.

- Tiempo de Extracción.-Se probaron varios tiempos, desde 2 hasta 14 horas.

- Relación Solvente/Semilla [v/p].-En este caso se probaron varias relaciones desde [10/1] hasta [30/1].

Análisis de Macrocomponentes de la Semilla, Pasta residual, Harina Desengrasada y Destoxificada de Jojoba

A la pasta de jojoba y la harina desengrasada y destoxificadas, se les practicó el análisis de proteína (N x 5.30), extracto etéreo, cenizas, fibra cruda, humedad y extracto no protéico, según técnicas del AOAC [1984], además se determinó en las muestras energía bruta (Kcal/g) por medio de un Calorímetro adiabático Parr, modelo 1241.

Extracción y Determinación Semicuantitativa de Simmondsina y Simmondsina-2-Ferulato

La harina desengrasada 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 la mezcla acetato de etilo-etanol [3:1] y se pasó a través de una columna de 10 cm de diámetro y 30 cm de altura, empacada con 0.5 g 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 el residuo se disolvió después en 4 ml de etanol.

Análisis Semicuantitativo por Cromatografía en Capa Delgada

Se utilizaron cromatofolios de Sílica Gel G de 0.2 mm de espesor que fluorescen a 254 nm (Cromatofolios Al, Merck), sobre estas placas se aplicaron los extractos conteniendo los tóxicos junto con los estándares de simmondsina y simmondsina-2-ferulato, desarrollándose la cromatografía en cámaras rectangulares de vidrio con la mezcla de disolventes, acetato de etilo-etanol [7:3], y revelándose a la luz UV a 250 nm, con vapores de yodo o con ácido sulfúrico al 10% seguido de calentamiento para visualización de las manchas. Este método consiste en una comparación visual de la intensidad de las manchas de los estándares, con respecto a la intensidad de las manchas de las muestras, [Verbiscar y Banigan, 1977].

Determinación Cuantitativa de Compuestos Fenólicos

La determinación de compuestos fenólicos en el harina de jojoba se realizó por el método de Folin-Denis [Joslyn y Goldstein, 1964]. Este método consiste en hacer una extracción con metanol en un matraz erlenmeyer en un agitador de torsión (Wrist Action Shaker, Burrell modelo 75), después se tomó 1 ml del extracto y se puso en un matraz aforado de 100 ml, de aquí se tomó 1ml y se pasó a la celda, después se agregaron 5 ml del reactivo de Folin-Denis y 10 ml de una solución saturada de carbonato de sodio, se dejó reposar por 30 min, después se leyó a

760 nm en un espectrofotómetro Coleman Junior II Modelo 6/35 y su absorbencia se interpoló de una curva preparada con una solución patrón de ácido tánico de [0.1 mg/ml].

Evaluación Biológica con Ratas de las Harinas Destoxificadas de jojoba

Setenta ratas de 25 días de edad (Sprague Dawley), con un peso entre 35g y 45g fueron utilizadas para comprobar la eficiencia del método de destoxificación del harina de jojoba. Cada uno de los animales fueron distribuidos en jaulas individuales de acero inoxidable y condiciones ambientales controladas de 22-23 °C, 55-56% de humedad y períodos de luz y oscuridad de 12 horas cada uno. Se les dió alimento fresco y agua ad libitum y se pesaron cada tres días.

Se formaron siete grupos con 10 ratas cada uno y se distribuyeron de la siguiente manera:

- El primer grupo fué alimentado con una dieta patrón a base de caseína-ANRC.

- El segundo fué alimentado con una dieta libre de nitrógeno, ésto se hizo con el fin de estimar la proteína necesaria para mantenimiento.

- El tercer grupo fué alimentado con una dieta a base de pasta de jojoba, a la cual se le extrajo el aceite con un extractor mecánico y después con hexano.

- El cuarto grupo fué alimentado con una dieta a base de harina de jojoba, obtenida de semilla sin testa y desengrasada con hexano.

- El quinto grupo fué alimentado con una dieta a base de harina de jojoba destoxificada, obtenida a partir de semilla sin testa, desengrasada con hexano y destoxificada con isopropanol al 70% en una relación solvente/harina de 20:1.

- El sexto grupo fué alimentado con una dieta a base de harina de jojoba destoxificada con isopropanol al 70% en una relación solvente/harina de 30:1.

- El último grupo fué alimentado con pasta de jojoba destoxificada, esta pasta se obtuvo de la extracción mecánica del aceite de semilla de jojoba y después fué destoxificada con isopropanol al 70% en una relación solvente/pasta de 30:1.

Todas las dietas fueron hechas en base a 10% de proteína. En la dieta control, este 10% fué proporcionado por caseína. En el caso de las dietas a base de pasta o harina de jojoba, esta fué la única fuente protéica. Las dietas se formularon además con aceite de algodón, mezcla de vitaminas, mezcla de minerales, almidón, dextrosa y colina, de acuerdo al protocolo oficial del PER [AOAC, 1984], como se muestra en el Cuadro 3. Todos los ingredientes excepto el aceite de algodón se obtuvieron de Bioserv, Inc., N.J., USA, 1982. La premezcla de vitaminas contiene lo siguiente en g /kg de dieta: ácido ascórbico 0.45, biotina 0.0002, pantotenato de calcio 0.03, colina 0.633, ácido fólico 0.0009, inositol 0.05, manodiona 0.02, niacina 0.04, PABA 0.05, piridoxina 0.01, riboflavina 0.01, tiamina 0.01, vitamina A 9,000 IU, vitamina B-12 0.01 mg, vitamina D 1,000 IU, vitamina E 25 IU. La premezcla de minerales contiene lo siguiente en g/kg de

Cuadro 3. Composición de la Dieta Basal Usada para la Evaluación Biológica del Harina Destoxificada de Jojoba.

Ingrediente(1)	%
Aceite de algodón	8.0
Vitaminas Premix	1.0
Minerales Premix	5.0
Celulosa	1.0
Agua	5.0
Cr ₂ O ₃	0.2
La proteína se puso en relación de 10% a la dieta y se agregó almidón y dextrosa para completar el 100%.	

(1) Aceite, minerales, celulosa y agua se ajustaron después del análisis de proteína de las harinas, de acuerdo al Método 43.212, del AOAC.

dieta: aluminio 0.0005, calcio 11.08, cloro 4.8, cobre 0.0175, flúor 0.0027, iodo 0.003, hierro 0.385, magnesio 0.3812, manganeso 0.0055, fósforo 2.5305, potasio 5.882, sodio 1.369, azufre 0.1162 y zinc 0.0637.

Relación Neta de Proteína (NPR)

Se realizó de acuerdo con el método de Bender y Doell, (1957), el cual incluye un grupo de animales con dieta libre de nitrógeno. La pérdida de peso corporal de este grupo se suma a la ganancia de peso de cada tratamiento y se relaciona con la proteína ingerida, esta evaluación se propone que sea durante 10 días sin embargo un estudio colaborativo realizado entre 7 laboratorios [Happich et al., 1984], recomienda que el período de la evaluación sea de 14 días, con el fin de obtener menor variación en la prueba.

Diseño y Análisis Estadístico

Se realizó un diseño completamente al azar con dos tratamientos y 10 repeticiones por tratamiento. El análisis estadístico fué a base de análisis de varianza de un criterio de clasificación; cuando estos resultados de acuerdo al diseño especificado rechazaron la igualdad de medias, se utilizó la prueba de rango múltiple SNK, [Snedecor y Cochran, 1982].

Separación por Solubilidad de las Proteínas y Carbohidratos de la Harina Desengrasada de Jojoba

Se suspendió harina de jojoba desengrasada en una mezcla de isopropanol-agua (70:30) y se le agitó durante 24 horas, al cabo

de este tiempo se puso en un tubo de diálisis (Visking); se dializó contra agua desionizada con tres cambios durante 24 hr, para eliminar todos los compuestos solubles de bajo peso molecular y de esta manera obtener las proteínas libres de la presencia de compuestos fenólicos. Una vez que las muestras fueron dializadas, se vaciaron del tubo de diálisis, y se centrifugaron a 1,800g. Se midió el volumen del sobrenadante y a éste se le determinaron proteínas y carbohidratos. El residuo se suspendió en una solución 0.5M de NaCl a pH 7.0, se volvió a centrifugar a 1,800g, se midió el volumen de sobrenadante y se determinaron proteínas y carbohidratos.

El residuo resultante se resuspendió en una solución de NaOH al 18%, se centrifugó a 1,800g, se midió el volumen de sobrenadante y se determinaron carbohidratos, (Fig. 6).

Una vez que se tuvieron las tres fracciones se cuantificó el contenido de proteína por medio del método de Biuret modificado [Chaykin, 1966], la modificación consiste en adicionar a tubos del espectrofotómetro 2.5 ml de la muestra, e igual volumen del reactivo de Biuret, mezclar bien, dejar transcurrir la reacción por 30 min y leer (Spectronic 20 Bausch and Lomb) a una longitud de onda de 540 nm., se utilizó como referencia una solución patrón de 10.0 mg/ml de albúmina de suero bovino (Merck). Después se procedió a realizar la curva de solubilidad de nitrógeno agregando directamente sobre los tubos de centrifuga 10 ml del sobrenadante de cada separación y se ajustó el pH de 1 a 11, con soluciones de HCl ó NaOH 0.1N según el caso; se dejó reposar 30

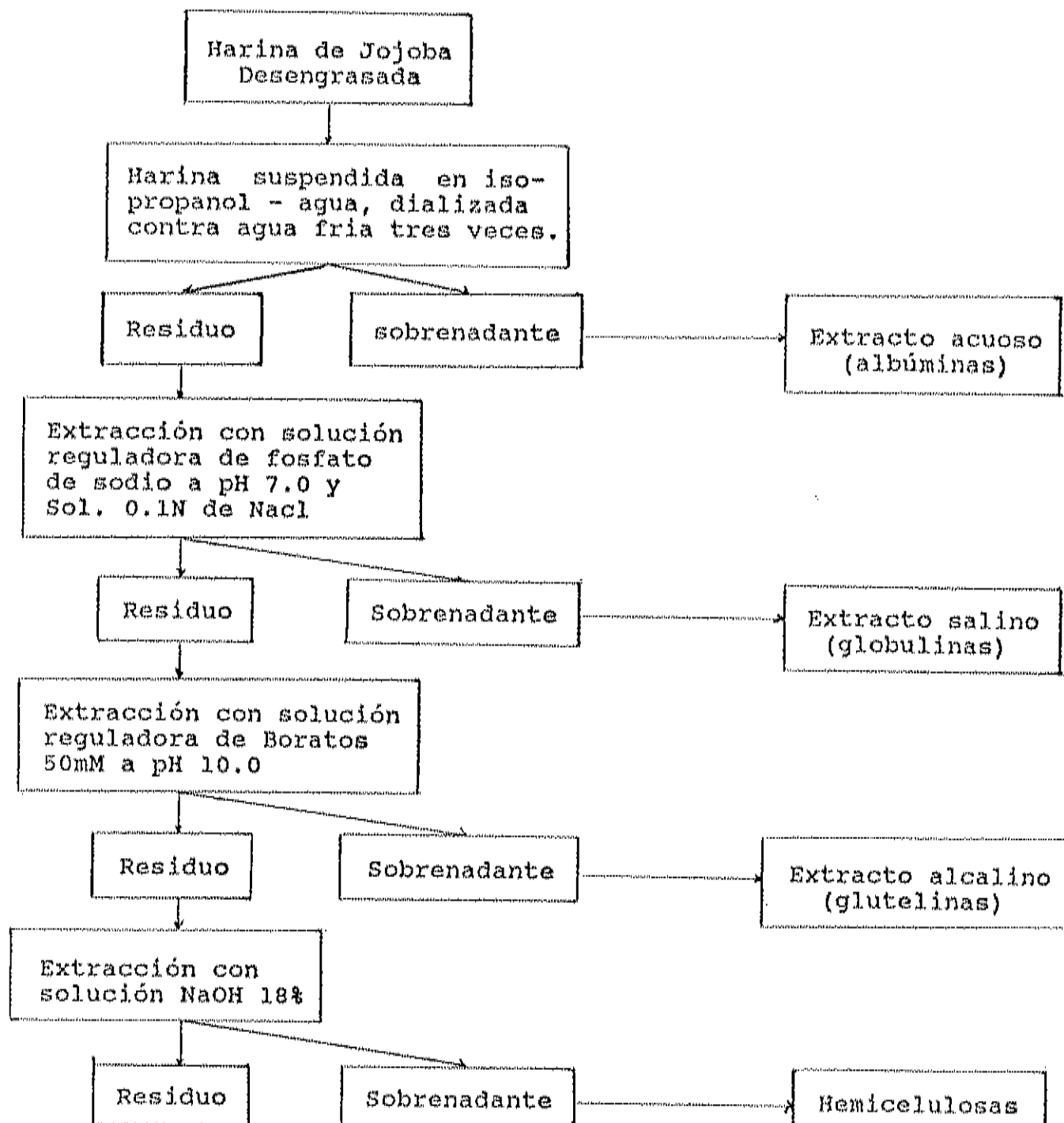


Fig 6 . Esquema de la Extracción de Proteína y Carbohidratos del Harina de Jojoba de Acuerdo a su Solubilidad.

min. y se centrifugó a 1,800g y 4 °C en una centrifuga refrigerada IEC modelo CRU-5000. El sobrenadante se decantó y se determinó el contenido de proteína por el método del Biuret modificado descrito anteriormente.

La determinación de carbohidratos se realizó por medio del método del Fenol-Sulfúrico [Dubois et al., 1956], usando glucosa como sustancia patrón y leyendo a 490 nm en un espectrofotómetro Spectronic 70.

Absorción Diferencial Espectrofotométrica de Fenoles de Jojoba

El método de Folin-Denis mide todas las sustancias fenólicas, ya sean taninos, flavonoides y ácido ferúlico, [Hahn et al., 1984]. Con el propósito de tener más información sobre este tipo de compuestos fenólicos presentes en la testa y almendra de la semilla de jojoba, se utilizó un método espectrofotométrico basado en la capacidad que estos compuestos tienen para absorber a diferente longitud de onda, dependiendo, de si son fenoles simples, complejos o polímeros, [Stafford, 1960; Siegel y Russel, 1979].

El método consiste en medir la absorción al ultravioleta del extracto de la muestra a dos valores de pH: La primera medición se hace a pH 12.3 y esto se logra agregando al extracto una solución de NaOH 0.05 N, la segunda es a pH 7.0 y esto se logra con una solución reguladora de fosfato 0.05 M. Después se hace la diferencia entre el primer y segundo espectro. Los espectros

fueron medidos en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 3 a intervalos de 5 a 10 nm y entre 230 y 450 nm.

Liberación de Antocianidinas

Se tomaron 2 ml del extracto metanólico en tubos de ensaye y se le adicionaron 10 ml de una solución 2N de HCl, se puso en Baño María a 97 °C durante 40 min, al cabo de los cuales, se liberó la antocianidina (aglucón), que después se extrajo con alcohol isoamílico, de donde se tomaron alícuotas para determinar su espectro de absorción en el visible y UV; ya que el compuesto presentó una coloración roja muy intensa, [DeSwardt et al., 1967].

Aislamiento por Cromatografía en Columna de los Compuestos Fenólicos del Extracto Isopropanólico del Harina de Jojoba Desengrasada

El método utilizado para aislar los compuestos fenólicos de harina de jojoba desengrasada, fué el utilizado por Vargas-Estrada, (1976); el cual utiliza resinas de polivinilpirrolidona insoluble y se describe a continuación.

Preparación de la Polivinilpirrolidona (PVP).

Una forma insoluble del polímero de polivinilpirrolidona (Polyclar AT grado farmacéutico), fué el soporte empleado para aislar a los compuestos fenólicos a partir de una solución isopropanólica de harina de jojoba desengrasada, la PVP fué preparada de la siguiente manera:

- Una cantidad de PVP se suspendió y agitó una hora cada vez que se le adicionó tres veces su peso en volumen, de las siguientes soluciones:

- solución de carbonato de sodio al 10% en agua
- solución de ácido clorhídrico al 10% en agua
- agua destilada y desionizada
- acetona pura

- La PVP se secó en una estufa al vacío a 60°C y posteriormente se pasó por un tamiz del número 60.

Eliminación de Partículas finas de PVP

La PVP seca y tamizada se suspendió con 5 veces su peso en volumen en agua desionizada y se dejó reposar durante 15 min, al cabo de este tiempo se decantó el agua. Las partículas de tamaño muy pequeño se eliminaron durante este procedimiento, pues no alcanzan a sedimentar en este intervalo. La operación se efectuó consecutivamente 6 veces.

Empacado de la PVP en las columnas de vidrio

La suspensión acuosa de la PVP se le adicionó de un volumen pequeño de la solución reguladora de glicina - HCl 0.1 M, pH 2.5 con metanol al 10% y con agitación continua; el polímero se vertió a la columna cromatografica de vidrio, cuyas dimensiones fueron 1.7 cm de diámetro y 30 cm de largo, que se coloca en posición vertical, cerrando el tubo de salida y llena a una tercera parte de su volumen con solución reguladora de glicina - HCl 0.1 M, pH 2.5 conteniendo metanol al 10% . La columna se

abrió después de 5 min de que se había sedimentado el polímero sobre el fluido; la columna fué empacada hasta alcanzar una altura de 17 cm. A la columna así preparada, se le hizo pasar la solución reguladora de glicina - HCl 0.1 M, pH 2.5 con metanol al 10%, hasta que los líquidos de salida no presentaran absorbencia a 281 nm.

Preparación del Extracto Isopropanólico del Harina de Jojoba Desengrasada para Cromatografía

Se preparó el extracto isopropílico de harina de jojoba desengrasada de acuerdo al diagrama expuesto en la Figura 4. El extracto se transfirió al matraz del evaporador a sutorio y se evaporó a sequedad con vacío; el residuo se disolvió en la solución del regulador de glicina - HCl 0.1 M, pH 2.5 con metanol al 10%.

Fraccionamiento y Desarrollo Cromatográfico del Extracto Isopropanólico del Harina de Jojoba Desengrasada sobre la Columna de PVP

El extracto isopropanólico de harina de jojoba desengrasada disuelto en la solución reguladora de glicina - HCl 0.1 M, pH 2.5 con metanol al 10%; se colocó sobre la parte superior de la columna, se dejó equilibrar unos minutos antes de establecer la velocidad de flujo.

La muestra se eluyó adicionando la solución reguladora de glicina-HCl y completando el volumen en la parte superior de la columna. Se colocó sobre la columna un tubo de polietileno que alimentó el eluyente por medio de un matraz colocado a un nivel en altura superior a la columna. La solución del matraz, se

cambió cada vez que se hizo cambio de eluyente. Se colectaron fracciones de 10 ml en tubos de ensaye. A los tubos de la elución se les midió la absorbencia en las celdas de cuarzo del espectrofotómetro en la región UV.

Cromatografía en la Columna

En la columna fueron colocados diez mililitros del extracto isopropanólico. Y el sistema de eluyentes que se utilizó, fué el siguiente en orden secuencial de aplicación:

- solución reguladora de glicina - HCl 0.1 M, pH 2.5 con metanol al 10%.

- solución reguladora de acetatos 0.2 M, pH 3.5 con metanol al 10%.

- solución reguladora de acetatos 0.2 M, pH 5.0 con metanol al 10%.

- solución reguladora de citratos de sodio - HCl 0.1 M, pH 6.0 con metanol al 10%.

Determinación de los Espectros de Absorción al Ultravioleta del Extracto Isopropanólico del Harina de Jojoba Desengrasada

A cada una de las fracciones eluidas en la columna cromatográfica se les determinó el espectro ultravioleta en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 3 de doble haz y se puso isopropanol puro en la celda de referencia, para contrarrestar los efectos de absorción del disolvente y el espectro se registró en papel desde 230 hasta 340 nm. Después fueron identificados los picos y graficados para observar el fraccionamiento que realizó la columna de PVP.

RESULTADOS Y DISCUSION

Eliminación de Compuestos Tóxicos del Harina de Jojoba

La mayoría de los estudios sobre pasta de jojoba han sido encaminados a la destoxificación, debido a que, para utilizar la proteína de esta pasta se requiere eliminar los compuestos tóxicos que posee. Estos procesos se han enfocado a la extracción o transformación de la simmondsina. Y no es sino hasta, Williams, (1980), quien informa que la simmondsina no es la única responsable de la toxicidad de la pasta, sino que ésta se debe al efecto combinado de varios compuestos; estos compuestos podrían ser entre otros: fenoles, inhibidor de tripsina y ácido fítico, los cuales comunmente se encuentran en productos vegetales. A partir de entonces se empezaron a buscar otros compuestos en la pasta de jojoba y en 1986, Wiseman, informó hasta 8% de fenoles en pasta de jojoba, lo cual explica el rechazo de los animales a consumir pasta de jojoba, pues estos compuestos le dan un sabor astringente, además forman complejos con proteína reduciendo la calidad nutricional de la pasta.

En el presente trabajo se eligió el uso de isopropanol por las características de solubilidad que presenta hacia los compuestos fenólicos, sobre todo cuando se emplea en mezclas acuosas, y entonces compuestos insolubles en agua modifican sus propiedades de solubilidad; además el isopropanol es miscible en todas proporciones en agua, inclusive forma un azeótropo [Windholz, 1983]. El isopropanol es ampliamente usado como disol-

vente de resinas naturales, gomas laca y creosota, las cuales contienen compuestos fenólicos de muy diversas clases.

Se ha empleado el alcohol isopropílico, como disolvente de fenoles muy solubles en grasas y aceites, también se emplea en la extracción de oleoresinas de especias; tal es el caso de la capsaicina [Vargas-Estrada, 1976]; en la extracción de aceite de limón y para la preparación de extractos fenólicos del lúpulo para la elaboración de cerveza, [Furia, 1980]. También ha sido empleado en la preparación de concentrados protéicos de semilla de girasol, aprovechando su propiedad dual de solubilizar compuestos fenólicos derivados del ácido cinámico y azúcares y por su baja constante dieléctrica (34), la cual atenúa la desnaturalización de proteínas, sobre todo cuando se quieren conservar las propiedades fisicoquímicas, [García-Prado, 1973].

En la Figura 5, se representan los pasos para la eliminación de los compuestos tóxicos de la jojoba, empleando mezclas de isopropanol-agua. Estos extractos fueron examinados a través del análisis de las simmondsinas y compuestos fenólicos; la Figura 7 muestra que la mejor relación de isopropanol-agua, fué precisamente la del 70%; siendo exactamente la misma que empleó García-Prado, (1973), para la eliminación del 92.2% del ácido clorogénico de la harina desengrasada de girasol.

En este trabajo la extracción de fenoles fué del 86% del contenido en la harina de jojoba desengrasada. Y las simmondsinas mostraron solubilidad plena a todas las concentraciones probadas, habiéndose extraído el 99% con la mezcla isopropanol-agua al 70%.

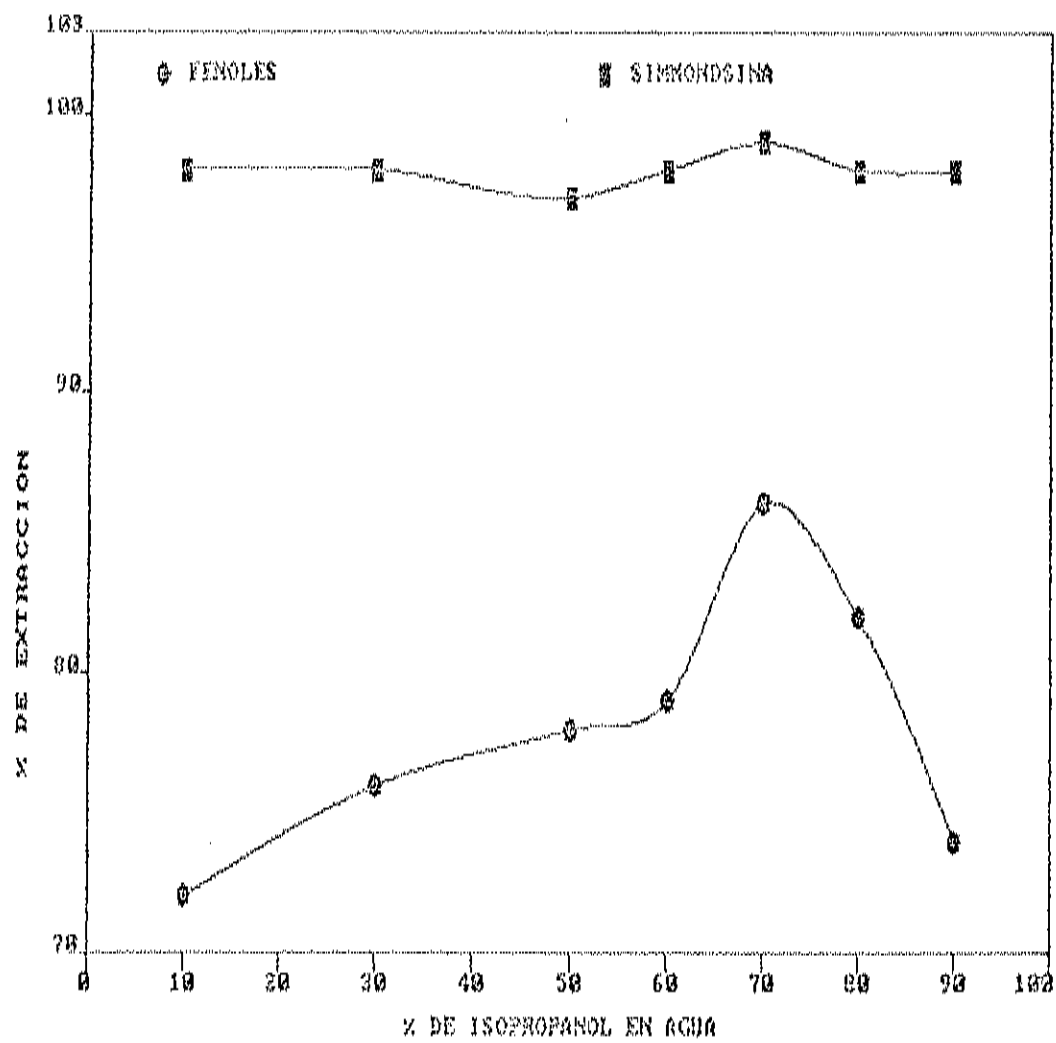


Fig. 7. Curvas de Extracción de Simmondsina y Fenoles con Mezclas Isopropanol-agua.

Con el fin de encontrar la mejor relación de la harina desengrasada a disolvente, se procedió a probar tres niveles: 1:10, 1:20; y 1:30 (peso/volumen), observándose que la mejor relación fué la del 1:30; la determinación analítica de la simmondsina, mostró que con esta relación fué eliminada totalmente de la harina desengrasada. La disminución de la simmondsina en la harina desengrasada tratada con la relación 1:20 fué del 94%, y en la tratada con la relación 1:10 se eliminó el 90% de la simmondsina

El tiempo óptimo de extracción exhaustiva de los compuestos fenólicos de la harina desengrasada de jojoba, fué de 4 horas, ya que tiempos más largos mostraron un comportamiento asintótico, con lo que se extrajo el 86% (43mg), ver Figura 8.

Las pérdidas en peso por el tratamiento con isopropanol al 70%, fueron del orden del 36.5%. La pérdida se debe esencialmente a la disolución de azúcares, oligosacáridos, aminoácidos libres, cera, fenoles y simmondsina, entre otros.

El Cuadro 4, presenta los contenidos en macrocomponentes de cuatro productos de jojoba y la testa; la harina desengrasada y la harina destoxificada presentaron el contenido más alto en proteínas, el cálculo para este contenido se hizo en base a la recomendación de Southgate, (1974), utilizando el factor de 5.30 para el porcentaje de proteína.

Se hizo la determinación del contenido calórico de las distintas preparaciones de harinas de la semilla de jojoba, por medio del calorímetro adiabático, ver Cuadro 4.

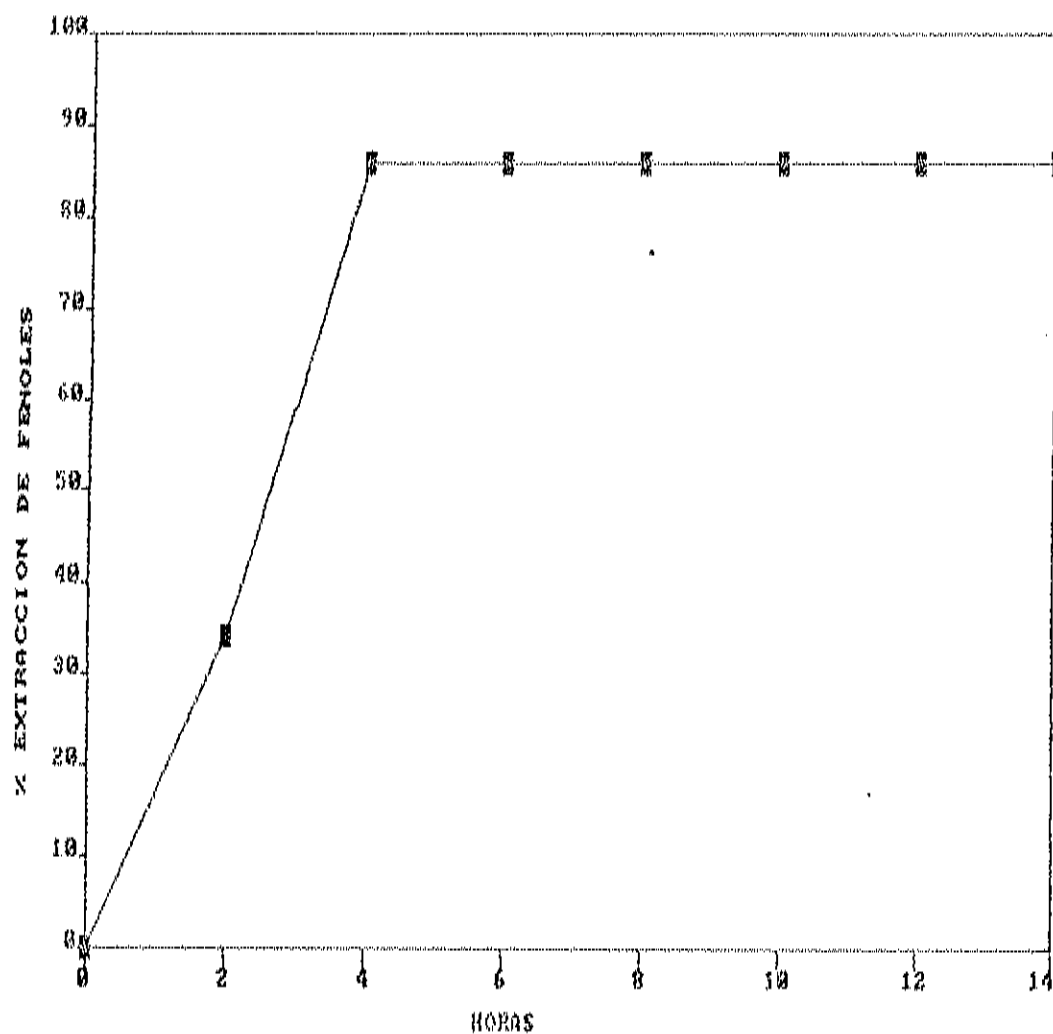


Fig. 8.. Curva de Extracción de Fenoles de la Jojoba con isopropanol al 70%, con relación al tiempo.

Cuadro 4 . Composición de la Pasta y Harina Desengrasada, Pasta y Harina Destoxificada y Testa de Semilla de Jojoba.

Componente	Pasta Desengrasada (Expeller) %	Pasta Destoxificada (Isop. 70%) %	Harina Desengrasada (Hexano) %	Harina Destoxificada (Isop. 70%) %	Testa de Semilla de Jojoba(1) %
Proteína (N x 5.30)	24.6±0.7	27.5±1.0	33.0±1.0	42.4±1.2	6.0±0.5
Humedad	4.0±0.5	4.0±0.7	4.2±0.5	2.5±0.3	10.0±1.0
Grasa	10.0±0.2	0.5±0.2	0.6±0.1	0.5±0.1	0.7±0.1
Fibra cruda	9.5±1.0	11.0±1.2	8.0±0.9	9.0±1.2	15.6±1.2
Cenizas	3.7±0.5	4.0±0.8	3.9±0.6	4.1±0.7	4.4±1.0
Carbohidratos(2)	48.8	53.0	50.27	41.53	63.30
Energía bruta (Kcal/g)	-	-	4.6±0.03	4.9±0.07	-

(1) La testa representa el 15±2% de la semilla entera

(2) Por Diferencia

En este trabajo los valores del contenido calórico determinados con la bomba calorimétrica Parr, fueron de 4.63 y 4.89 Kcal/g para harina de jojoba desengrasada y destoxificada, respectivamente. Estos valores se asemejan mucho a los informados en la literatura consultada sobre jojoba.

El valor calórico de jojoba ha sido determinado por Ngoupayou et al., (1982), quienes obtuvieron un valor de 2.88 Kcal/g para un nivel de 10% de jojoba en una dieta para pollos; fué determinado el valor calórico para pasta de jojoba, [Storey et al., 1983], con un valor de 3.3 Kcal/g.

Otro valor calórico fué determinado para jojoba destinada a dietas para ovejas, siendo de 4.57 Kcal/g, para niveles de jojoba del 10%, esta formulación empleó jojoba extraída con hexano, [Lisk y Brown, 1985].

En el Cuadro 5, se muestran los contenidos de simmondsina de los productos de semilla y testa de jojoba. Es notable el hecho de que la harina desengrasada y tratada con isopropanol al 70% no presentó simmondsinas residuales, por lo que se logró la eliminación completa de estos compuestos.

En el Cuadro 6, se comparan los contenidos de las simmondsinas residuales para productos destoxificados de jojoba bajo diferentes tratamientos. Otros autores han empleado disolventes puros para destoxificar la pasta de jojoba que solo han disuelto compuestos tóxicos de naturaleza muy polar, [Verbiscar et al., 1980; Wiseman y Price, 1986].

Cuadro 5 . Contenido de Compuestos Cianogénicos y Fenoles en Pasta y Harina Desengrasada, Pasta y Harina Destoxificada y Testa de Semilla de Jojoba.

	Pasta Desengrasada (Expeller) (%)	Harina Desengrasada (Hexano) (%)	Pasta Destoxificada (Expeller) (%)	Harina Destoxificada (Isop. 70%) (%)	Testa de Semilla de Jojoba (3) (%)
Simmondsina (1)	4.6±0.70	6.2±0.70	<0.1	<0.1	0.31±0.09
Simmondsina-2 ferulato (1)	1.8±0.30	0.85±0.30	<0.1	<0.1	0.12±0.09
Fenoles (2)	-	1.12±0.12	0.14±0.04	0.16±0.03	6.50±0.01

(1) Por cromatografía en capa delgada [Verbiscar y Banigan, 1977], el método no detecta contenidos por debajo de 0.1%
 (2) Por el método de Polin-Denis [Joslyn y Goldstein, 1964]
 (3) La testa representa el 15±2% de la semilla entera

Cuadro 6. Contenido Residual de Simmondsinas en Productos Destoxificados de Jojoba según Varios Autores.

Tratamiento(1)	% de tóxicos		% de proteína
	simmondsina	simmondsina -2-ferulato	(N x 6.25)
metanol	0.05	0.01	28.2
acetona	0.63	0.05	31.3
isopropanol	2.90	0.40	32.2
agua, pH 3.2	ND	0.43	22.5
135°C, 15 h	0.27	0.18	26.7
amoníaco	0.19	0.03	40.9
H ₂ O ₂ -NH ₄ OH	ND	0.03	32.4
agua(2)	0.10	0.08	29.0
fermentación(3)	0.13	0.24	29.5
isopropanol 70%(4)	<0.1	<0.1	31.7

(1) Verbiscar et al., (1980), cuantificación por HPLC

(2) Medina y Yeomans, (1980), cuantificación por TLC

(3) Verbiscar et al., (1981), cuantificación por HPLC

(4) Presente trabajo, cuantificación por TLC

Todos los tratamientos dejan simmondsinas residuales, especialmente de la simmondsina-2-ferulato; es posible que con el tratamiento con isopropanol al 70%, se haya eliminado a este compuesto hasta un nivel de <0.1%, debido a su naturaleza fenólica.

Con relación a la disminución de compuestos fenólicos de pastas de jojoba, la información publicada aparece muy recientemente, y en particular Ngoupayou et al., (1985), logró niveles de eliminación de tan sólo el 22%, por fermentación de la pasta de jojoba con Lactobacillus acidophilus.

Cuando a la pasta de jojoba se le trató con glucosa oxidasa a pH de 6.5, sólo se le disminuyó el 71.4% de compuestos fenólicos, [Wiseman y Price, 1986].

Es conocido el hecho de que la cascarilla o testa de semillas, presenta un gran contenido de compuestos fenólicos amargos y astringentes, además de compuestos fenólicos coloridos [Gupta y Haslam, 1979]; el caso de la jojoba es el mismo. En el Cuadro 5 se muestra que la testa tiene 6.5% de fenoles, comparado con el 1.12% del harina desengrasada.

En estas circunstancias, fué menester remover la testa de la semilla con el objeto de disminuir la contribución que de fenoles hiciese esta porción al producto por destoxificar, ya que el 15±2% del peso de la semilla completa es testa.

Para tal propósito las semillas completas se sujetaron a un tratamiento con vapor, durante 10 min; al cabo de este tiempo la cascarilla o testa fué eliminada, también se hicieron

tratamientos con agua hirviendo durante 10min. El tratamiento con vapor fué seleccionado considerando que la testa se desprende con mayor facilidad.

El almendra obtenido se desengrasó con hexano y se obtuvo una harina con un rendimiento del 51% en peso y con una cantidad de cera líquida residual del 0.6%. Con este contenido tan bajo de cera, se garantizó hasta donde fué posible que se disminuyeran los efectos tóxicos que se han informado que se presentan en ratones alimentados con niveles mayores del 2% de cera de jojoba, [Verbiscar et al., 1980].

Una vez alcanzadas las condiciones óptimas de eliminación de compuestos tóxicos, se realizó un experimento con dos kilogramos de almendra de jojoba, con el fin de tener harina de jojoba destoxificada, en cantidad suficiente para la preparación de la dieta para ratas y realizar los ensayos biológicos.

Evaluación Biológica del Harina Destoxificada

Como podemos observar en el Cuadro 7, la dieta con un menor contenido de tóxicos condujo a un mayor consumo de alimento por las ratas, mayor ganancia de peso y todas sobrevivieron durante el ensayo; esto significa que el proceso de eliminación de tóxicos fué efectivo, ya que este proceso además de reducir los tóxicos, hace más apetitosa la harina de jojoba destoxificada.

Se observó durante el tiempo que duró el ensayo, que las ratas del experimento con las dietas a base de pasta y harina de jojoba sin destoxificar, se rehusaron a consumir las dietas

Cuadro 7. Efecto de la Eliminación de Compuestos Tóxicos de las Pastas y Harinas de Jojoba en el Crecimiento y Mortalidad en Ratas.

Dieta	Días	Tóxicos en la Dieta(1) (%)	Cambio de Peso (g)	Alimento Consumido (g)	Mortalidad (%)
P. de Jojoba Desengrasada(2)	1	2.40	-	-	20
	4	2.40	-10.1+1.2	11.5+2.0	100
H. de Jojoba Desengrasada(3)	4	1.82	-5.0+0.9	14.6+3.2	20
	9	1.82	-7.0+1.7	26.3+3.0	100
H. de Jojoba Destoxificada(4)	9	0.10	-0.1+0.7	39.0+3.2	30
	12	0.10	3.5+1.0	59.0+5.5	50
H. de Jojoba Destoxificada(5)	12	<0.01(7)	16.8+3.0	97.3+2.7	0
P. de Jojoba Destoxificada(6)	12	<0.01	10.8+3.4	82.1+10.2	0

- (1) Simmondsina y Simmondsina-2-Ferulato
 (2) Pasta de Jojoba Desengrasada con Expeller
 (3) Harina de Jojoba Desengrasada con Solventes
 (4) Harina de Jojoba Destoxificada Solvente/Harina (20:1)
 (5) Harina de Jojoba Destoxificada Solvente/Harina (30:1)
 (6) Pasta de Jojoba Destoxificada Solvente/Pasta (30:1)
 (7) No Detectados por Cromatografía de Capa Delgada, el método no detecta valores por debajo de 0.1%.

después de haberlas empezado a consumir en las primeras horas del experimento, lo que parece indicar que tanto la toxicidad de las simmondsina como el sabor astringente de las dietas a base de pasta y harina de jojoba sin detoxificar fueron los causantes de la muerte de las ratas.

De acuerdo a las características insípidas que presentan las simmondsinas, éstas no parecen ser las únicas responsables de la muerte de las ratas, este fenómeno de rechazo al consumo de las dietas se ha observado también por Verbiscar et al., (1981), con novillos, borregos, y ratas; en donde los animales incluso son capaces de seleccionar discriminadamente las partículas de pasta de jojoba en la dieta y alimentarse con el resto.

Por otro lado en apoyo a esta observación, Williams en 1980, dosificó simmondsina a dietas de ratones jóvenes y observó que la toxicidad no es solamente debida a estos compuestos, aún a concentraciones más elevadas, que las contenidas en forma natural en la jojoba; y advierte que la toxicidad no es sólo debida a la presencia y acción toxicológica de la simmondsina, sino que parece ser a una acción conjunta o sinérgica de otros compuestos, entre éstos se citan: inhibidor de tripsina, ácido fítico y compuestos fenólicos, [Storey et al., 1983; Wiseman y Price, 1986].

Un punto interesante de especulación es el hecho, de que, entre los muchos compuestos que presentan sabores amargos y astringentes, se encuentran involucrados los compuestos fenólicos, [Van Sumere et al., 1975]. Por otro lado la astringencia al

paladar, se dá en términos de fenoles por la presencia de pro-antocianidinas, siendo por demás relevante la observación de que, a medida que aumenta el peso molecular de estos compuestos, se incrementa la astringencia, [Haslam, 1981].

Si esta hipótesis fuese cierta, la eliminación de los compuestos fenólicos de la jojoba por el tratamiento con isopropanol al 70%, pudo haber mejorado la aceptación de los productos destoxificados por las ratas.

Relación Neta de Proteína

Una vez que se comprobó con los experimentos con ratas que los compuestos tóxicos de la jojoba habían sido eliminados, se procedió a evaluar nutricionalmente la harina de almendra de jojoba. La evaluación nutricional consistió en el cálculo del NPR de acuerdo con el método de Bender y Doell, (1957), modificado en cuanto al tiempo (12 días). Esta metodología permite el uso de materiales protéicos de baja calidad, los cuales no necesariamente promueven crecimiento. En este experimento el factor de mantenimiento se cálculo en base a la pérdida promedio de peso del grupo de ratas alimentadas con una dieta libre de nitrógeno el cual fué de 12.59g a los 14 días. Los resultados de la evaluación se muestran en el Cuadro 8, donde se puede observar que no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los valores de NPR estimados para harina pasta de jojoba destoxificadas y caseína. Los valores de R-NPR muestran de nuevo la similitud entre los grados de destoxificación de la pasta y harina de jojoba.

Cuadro 8. Relación Neta de Proteína (NPR), NPR Relativo de Pasta y Harina de Jojoba. (1)

Dieta	NPR*	R-NPR
Caseína (2)	3.40±0.70a	100
P. de Jojoba Destoxificada	2.83±0.50a	83.2
H. de Jojoba Destoxificada	2.74±0.23a	80.6

(1) NPR calculado a los 12 días, en base a la ecuación de Bender y Doell, (1957)

(2) NPR calculado a los 14 días

* En los valores con letras iguales no hay diferencia significativa ($p < 0.05$)

En el Cuadro 9 se comparan la pasta y harina de jojoba destoxificadas con otras fuentes protéicas provenientes de plantas de las zonas áridas, donde se observa que la pasta y harina de jojoba destoxificadas tienen valores de NPR superiores a Cucurbita foetidissima, [Scheerens y Berry, 1986]; Zostera marina y Pachycereus pringlei, [Valencia et al., 1985]. Por lo tanto estos resultados confirman que la jojoba presenta un mejor valor nutritivo cuando sus compuestos tóxicos son eliminados.

Resultados similares informa Storey et al., (1983), en los cuales se dice que el contenido de aminoácidos indispensables de harina de almendra de jojoba, cumple con los requerimientos de animales monogástricos tales como, aves y puercos.

Aislamiento de Proteínas y Carbohidratos de Jojoba de Acuerdo a su Solubilidad

En experimentos previos para el aislamiento de las proteínas de jojoba a partir del tratamiento con isopropanol al 70%, se encontró que al medir el contenido protéico del sobrenadante por el método del Biuret, [Chaykin, 1966], se producían coloraciones verdosas que interferían con la determinación de proteína por este método. Por lo que se optó por dializar a todo el extracto isopropanólico, (sólido y líquido), a través de tubo Visking para diálisis, con el fin principal de eliminar los compuestos fenólicos, además de otros compuestos de bajo peso molecular que se encontraran en la jojoba, entre otros: azúcares, sales minerales, aminoácidos libres, simmondsina e inclusive el isopropanol.

Cuadro 9. Relación Neta de Proteína (NPR), NPR relativo de Pasta y Harina de Jojoba Destoxificada, Comparada con Caseína y Otras Plantas de Zonas Áridas.

Dieta	ganacia de peso g/día	NPR(1)	R-NPR
Control (Soya + Met)	0.61	4.00	100
<u>Cucurbita foetidissima</u> (2)	0.42	2.74	68.5
Caseína	-	4.7+0.03	100
<u>Zostera marina</u> (3)	-	2.2+0.30	47.3
<u>Pachycereus pringlei</u> (3)	-	1.3+0.19	26.6
Caseína	-	3.40+0.70	100
P. de Jojoba Destoxificada	0.9+0.28	2.83+0.50	83.2
H. de Jojoba Destoxificada	1.4+0.25	2.74+0.23	80.6

(1) NPR se estimó en base a la ecuación de Bender y Doell, (1957).

(2) Valores tomados de Scheerens y Berry, (1986). Esta evaluación fué hecha con ratones.

(3) Valores tomados de Valencia et al., (1985).

De esta manera, al término de la diálisis, se obtuvo un volumen de dializado que se incrementó 3 veces, con relación al volumen inicial de isopropanol al 70%

A esta fracción soluble en agua se le denominó albúmina, de acuerdo a la definición de proteínas por sus características de solubilidad, [Wall, 1964].

Esta fracción representa el 61.8% de las proteínas totales extraídas de la jojoba; y en esta fracción soluble en agua, el contenido de carbohidratos fué del 38.3%, de los carbohidratos totales contenidos en el dializado, esta fracción está compuesta básicamente de hemicelulosas de tipo xiloglucana, [Watanabe et al., 1978], con un peso molecular aproximado de 125,000.

Del residuo de la extracción de albúminas, se hicieron extracciones secuenciales de las otras fracciones protéicas (ver Figura 6); primero con NaCl 0.5M con el fin de aislar las globulinas, habiéndose obtenido alrededor de un 23.6% de las proteínas solubles totales. Y de la extracción con la solución alcalina pH 10.0 de boratos, se obtuvieron 14.6% de glutelinas: y de carbohidratos se extrajeron 6.2 y 18.8% con las dos soluciones extractoras en ese respectivo orden. El residuo de esta última extracción se le trató con una solución al 18% de NaOH, con el fin de extraer el resto de las hemicelulosas, y produjo un 37.4%, como carbohidratos. Los resultados resumidos de estas extracciones aparecen en el Cuadro 10.

Cuando se observó el color rojizo del extracto de carbohidratos de 18% de NaOH de la marcha del aislamiento de

Cuadro 10. Distribución de Proteínas y Carbohidratos de Jojoba de Acuerdo a sus Propiedades de Solubilidad. (1)

Fracción(2)	Proteína (g)	Azúcares (g)
Soluble en agua	1.57 (61.8)	0.73 (38.3)
Soluble en Sol. Salina 0.5M, pH=7.0	0.60 (23.6)	0.12 (6.2)
Soluble en Regulador de Boratos 50mM, pH=10.0	0.37 (14.6)	0.35 (18.1)
Soluble en NaOH, 18%	-	0.72 (37.4)
Total	2.54	1.92

(1) Las cifras en paréntesis representan porcentajes del total.

(2) Muestra de harina de almendra de jojoba desengrasada: 10.0g.
Proteína(Nx5.30)= 33%

proteínas y carbohidratos, se creyó que la coloración la podrían impartir las proantocianidinas; sin embargo cuando se registró el espectro de absorción de luz de una alícuota al espectrofotómetro, se encontró que apareció un pico máximo bien definido a 277nm y ningún pico en el visible por lo que se sospechó que se trataba de compuestos fenólicos liberados del residuo hemicelulósico, y cuando se compararon estos máximos, con los de productos de degradación de proantocianidinas, se comprobó que este fué el mecanismo de su formación, y entre otros compuestos, el ácido syringico podría ser ese producto, [Jurd, 1972]. No se aisló e identificó a esos compuestos.

Es conocido el hecho de que tratamientos a pastos con soluciones de NaOH por arriba de la concentración 1N, liberan compuestos fenólicos unidos a los carbohidratos que componen la pared celular; y específicamente sugieren que existen enlaces éster entre carbohidratos de tipo hemicelulósico, con unidades de fenoles de lignina, [Tanner y Morrison, 1983].

Características de Solubilidad de las Proteínas de Jojoba en Función del pH

En la Figura 9 se muestran los contornos de la solubilidad de las fracciones protéicas de la jojoba con relación al ambiente de pH. En la región de pH de mínima solubilidad, tanto globulinas como albúminas mostraron un punto isoeléctrico (pI) de 3.0, mientras que las glutelinas presentaron un pI de alrededor de 4.5-5.0, aunque esa solubilidad mínima representa el 50% de esa fracción.

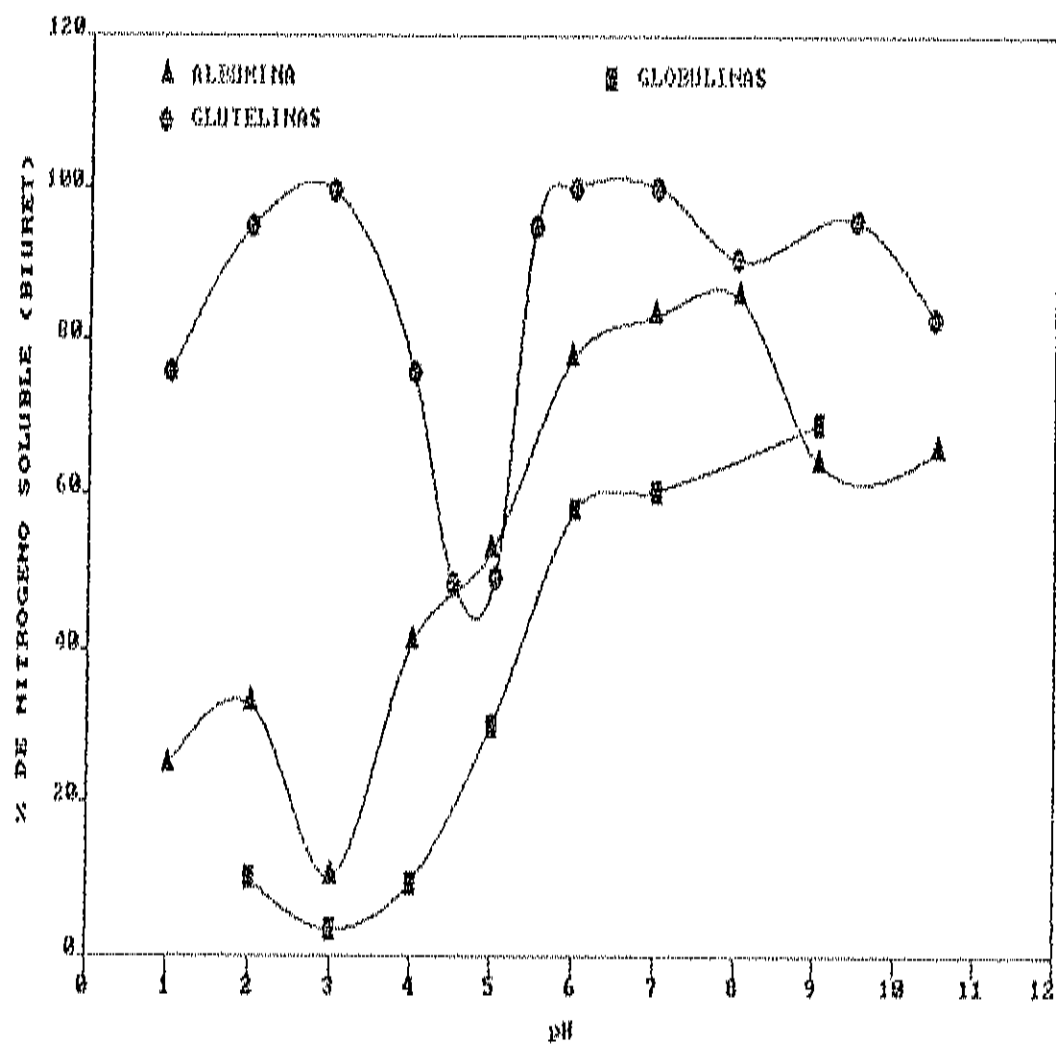


Fig. 9. Curvas de Solubilidad de Proteína de Jojoba en Relación al pH.

Por lo que respecta a los valores de pH de máxima solubilidad para las tres fracciones parece estar este valor en las cercanías de 7.0. Sin embargo la fracción de glutelinas presenta también otro valor de pH en la región ácida y está alrededor de pH 3.0.

Cuando se preparó el perfil de pH para la fracción de globulinas, se encontró que el patrón de comportamiento no definía ni mínimos, ni máximos de solubilidad; por lo que se infirió que el ambiente iónico salino estaba influyendo en ese comportamiento; por lo que hubo necesidad de eliminar el NaCl, por vía de diálisis. Sólo fué así como se pudo concretar la influencia que sobre esta fracción tenía el pH, Fig. 10.

Como se observa en el Cuadro 11, pocos han sido los trabajos publicados hasta la fecha con relación a la separación protéica de jojoba; y básicamente dos son los grupos de investigación que tienen un fuerte ascendiente en el tema que nos ocupa, estos son los grupos que dirigen el Dr. Storey y el Dr. Price.

Por lo que respecta a la conducta de las fracciones protéicas en relación a la influencia que tiene el pH sobre su solubilidad, sólo Cardoso, (1980) y Wiseman y Price, (1986), informan que albúminas y globulinas tienen su pI muy cercano, alrededor de 4.0 y 3.0 respectivamente; las glutelinas lo presentan en un intervalo de pH de 3 a 4; y que la máxima solubilidad de las tres fracciones se presenta en las regiones de pH, uno a 2.0 y otro arriba de 8.0.

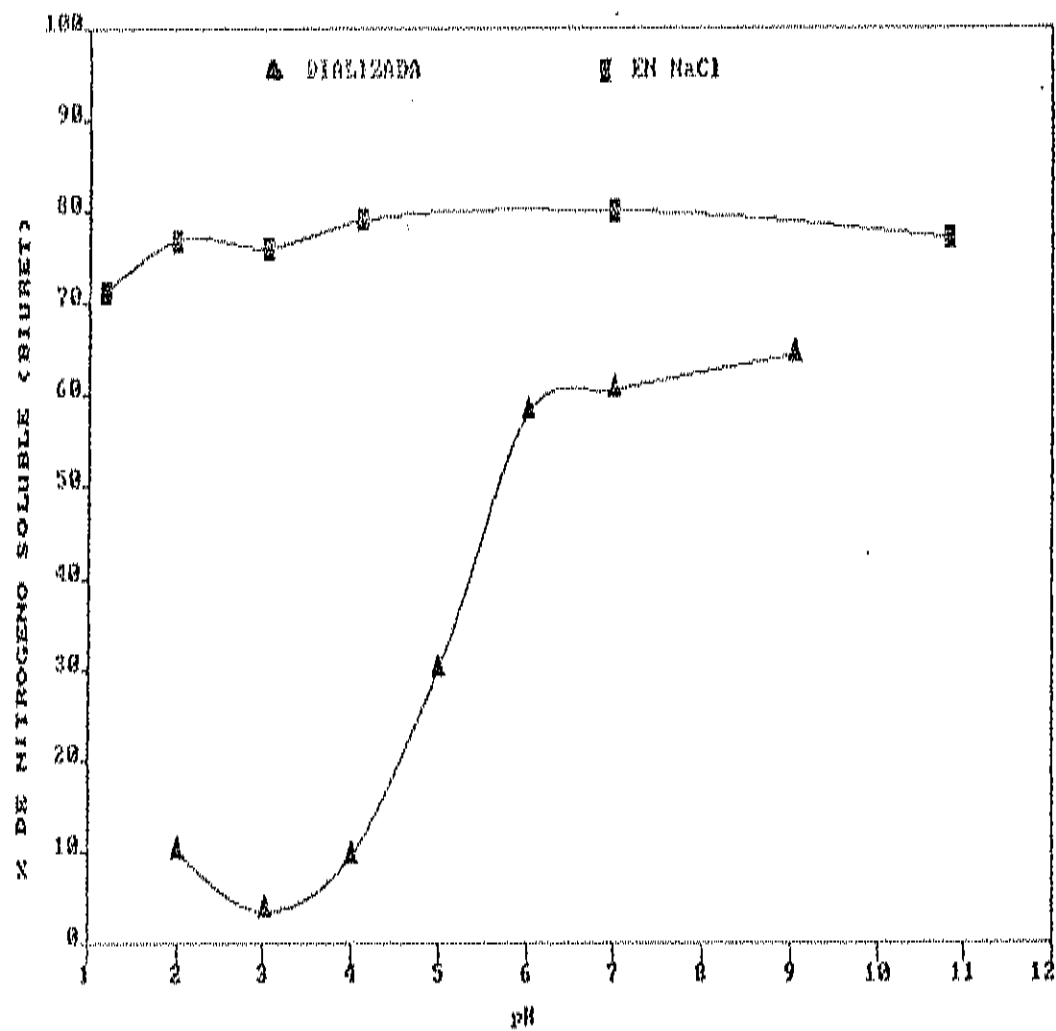


Fig.10 . Curva de Solubilidad de Globulinas en relación al pH y NaCl.

Cuadro 11. Distribución Protéica de Jojoba según Varios Autores

Referencia	Fracción Protéica			
	Albúmina	Globulina	Glutelina	Prolamina
Cardoso, (1980)	65.0	21.0	6.0	8.0
Samac et al., (1980)	35.0	29.3	32.7	-
Storey et al., (1983)	42.6	12.9	44.0	-
Shah y Stegemann, (1983)	80.0	-	-	-
Wiseman y Price, (1986)	57.3	37.7	-	-
Presente Trabajo	61.8	23.6	14.6	-

La metodología empleada por Wiseman y Price, (1986), se basa primordialmente en la técnica clásica de Osborne; mientras que Storey et al., (1983), modifica el primer paso cuando trata de eliminar los compuestos lipídicos, tratando a la semilla descascarada con una mezcla de disolventes (en el primer caso cloroformo y en el segundo éter de petróleo y en ambos casos combinado con metanol), con lo cual no lograron extraer los compuestos fenólicos, y sí, en cambio han producido alteraciones importantes en las características de solubilidad de las proteínas; en el trabajo de Samac et al., (1980), obtienen en un solo paso la fracción conjunta de albúmina y globulina, cuyo valor se asemeja al de la fracción de albúmina de Cardoso, (1980) y del presente trabajo. Storey et al., (1983), modifica el segundo paso de la extracción protéica y obtiene mas albúmina que en su primera publicación, pero no alcanza los valores publicados por el grupo de Price y de este trabajo. En contraste, Wiseman y Price, (1986), saben que tienen que remontar la problemática que representa la presencia de compuestos fenólicos, y que tienen que modificar sus primeras experiencias, [Cardoso, 1980]; y lo hacen con parcial éxito, ya que no fueron capaces de eliminar totalmente estas interferencias, no solo para efecto de medición, sino de propiedades de solubilización a diferentes valores de pH de las fracciones protéicas obtenidas, [Wiseman y Price, 1986].

Por lo que respecta a las condiciones experimentales del presente trabajo, la principal y más importante contribución a la

separación de las fracciones protéicas de la jojoba, se dió cuando:

- Se eliminó una fuente importante de compuestos fenólicos, como lo fué la remoción de la testa, ya que representa el 6.5% de compuestos fenólicos.

- El empleo de la mezcla de disolventes isopropanol-agua, cuya primer función fué la de solubilizar a los compuestos fenólicos contenidos en la harina desengrasada de la almendra de jojoba; y fué precisamente la mezcla de isopropanol al 70%, la que disminuyó hasta el 86% el contenido de fenoles.

- Ya que la medición de proteínas del extracto isopropanólico por el método colorimétrico del Biuret resultaba inadecuado para este propósito, se decidió eliminar esa interferencia, utilizando la técnica de la diálisis, con lo que se fueron en las aguas de cambio de la diálisis, no sólo fenoles, sino otros componentes de bajo peso molecular, permeable a la membrana.

Por lo que se presume que este es el paso fundamental para la eliminación de compuestos fenólicos y que las proteínas de la jojoba no sufren modificaciones importantes en sus características fisicoquímicas.

Espectrofotometría de Extractos Alcohólicos de la Testa y Almendra de Semilla de Jojoba

En la Figura 11, se muestran los espectros diferenciales de absorción del extracto metanólico de la testa de semilla de jojoba en la region UV, y que de acuerdo a la discreta absorción de luz, se pueden dividir regiones para cada grupo de compuestos

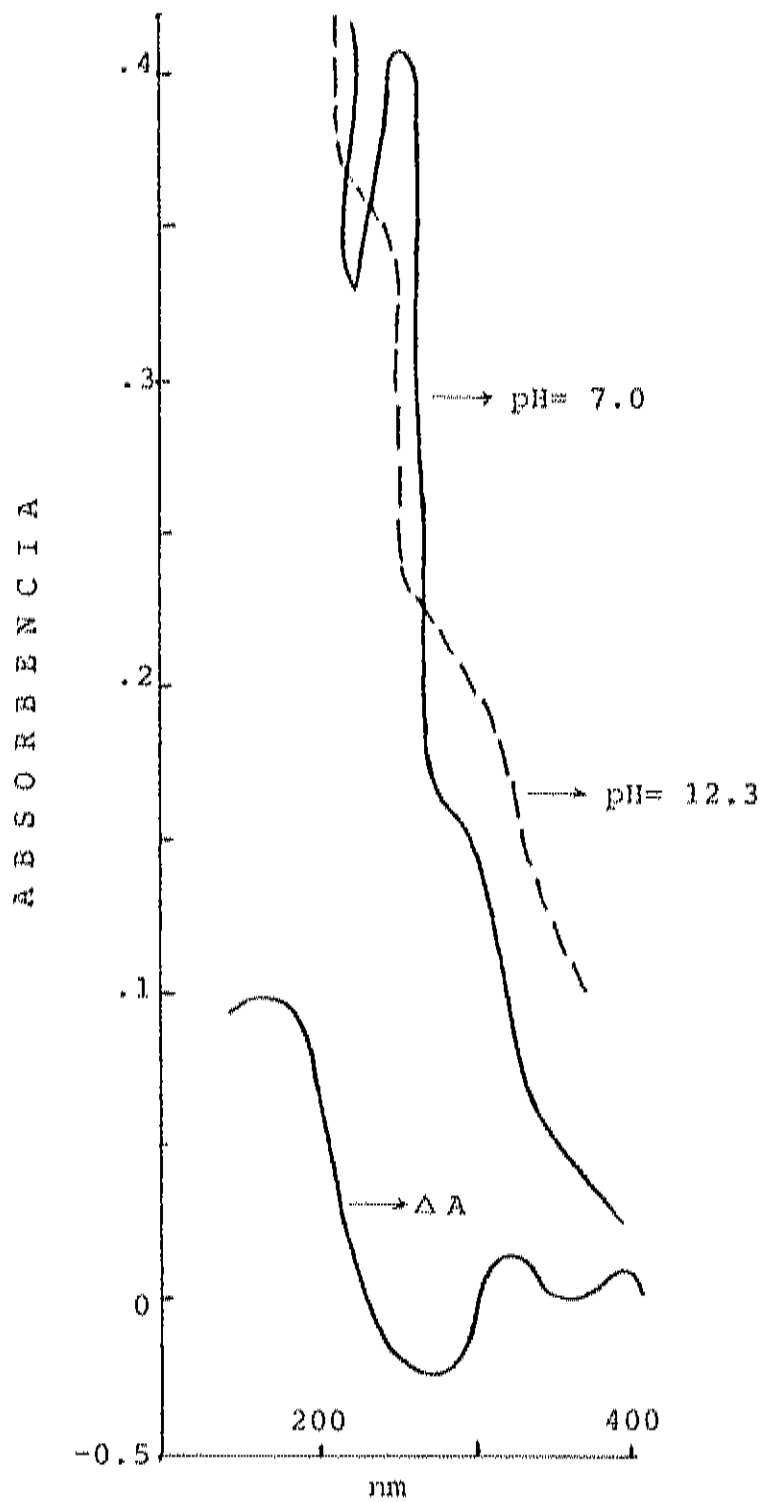


Fig. 11. Espectro de absorción por diferencia en la región UV del Extracto Metanólico de la testa de Semilla de Jojoba.

fenólicos, [Stafford, 1960], la región comprendida entre los 300 y 350nm en donde los grupos cromóforos aparecen, representan a fenoles complejos y polifenoles.

En la búsqueda de estos compuestos fenólicos, se revisó la literatura para tal propósito, y aunque el extracto metanólico mostraba una ligera coloración café rojiza, no se apreciaba que existieran compuestos polifenólicos, por lo que se tomó la decisión de someter el extracto de la testa a una hidrólisis ácida, practicando la metodología para la liberación de antocianidinas, que son compuestos de tipo flavonoide que forman polímeros, y que inclusive pudieran formar parte constitutiva de las ligninas ó también de los taninos condensados [Haslam, 1981]; Un espectro de absorción típico de esta fracción se presenta en la Figura 12, cuyos máximos se registran a 279.5, 460 y 543 nm en metanol-HCl al 0.01%.

Dentro de las 6 antocianidinas encontradas en plantas como glucósidos, la malvidina y petunidina coinciden en su absorción en la región visible y lo exhiben alrededor de 543nm, sin embargo en presencia de AlCl₃ al 5% en etanol, se presenta un cambio de absorción para petunidina, debido a un desplazamiento al azul; la malvidina no presenta tal traslado de absorción, ó desplazamiento batocrómico, prueba por demás concluyente para diferenciar a estos dos compuestos (flavan-3,4-dioles), [Brevillard y Delaporte, 1977]. La fracción fenólica aquí aislada parece corresponder con malvidina, que es la antocianidina del diglucósido de antocianina (Fig 13); y aunque no se tuvo el compuesto puro para

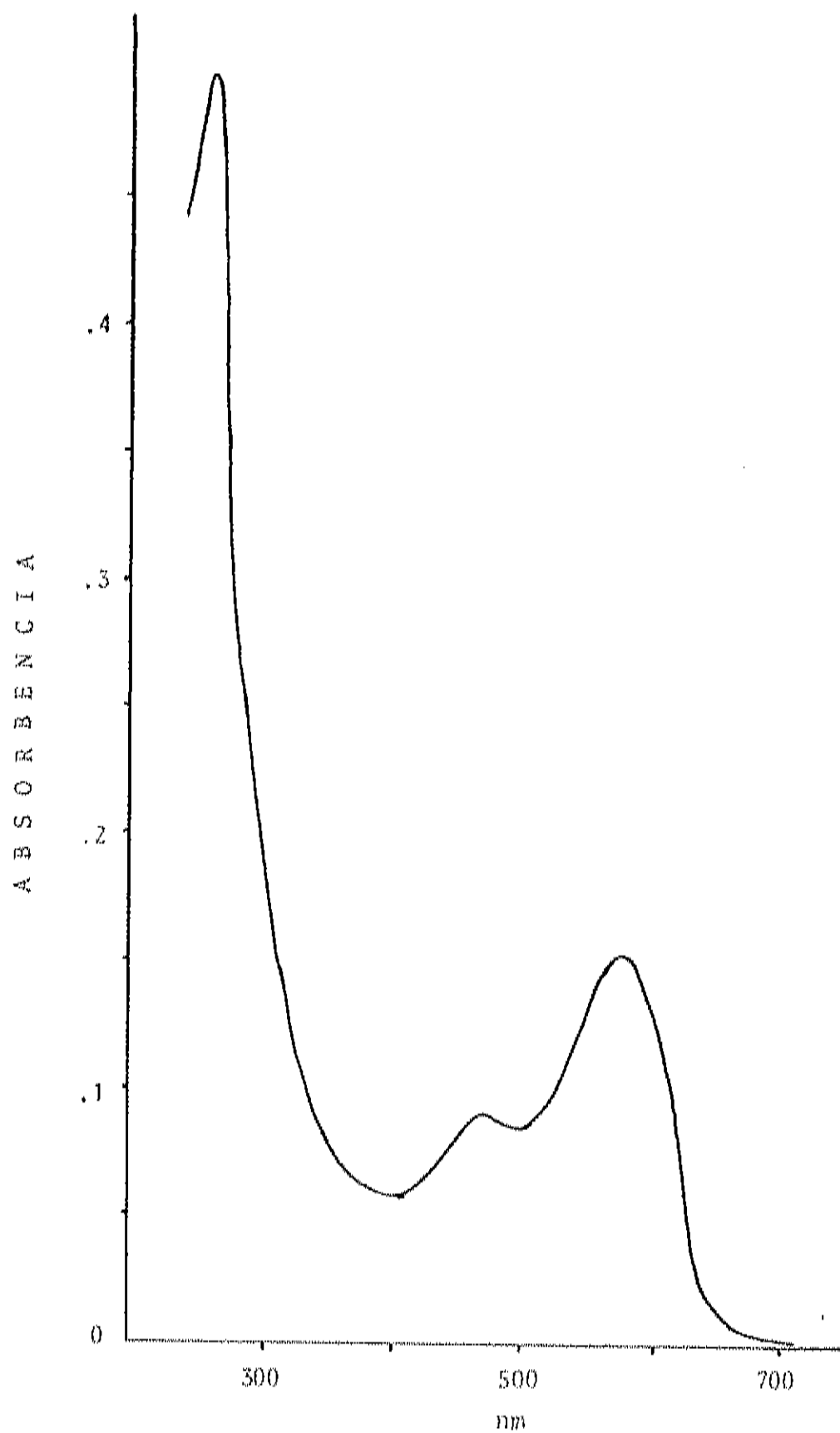


Fig. 12. Espectro de Absorción de la Antocianidina(Malvidina) de Testa de Jojoba.

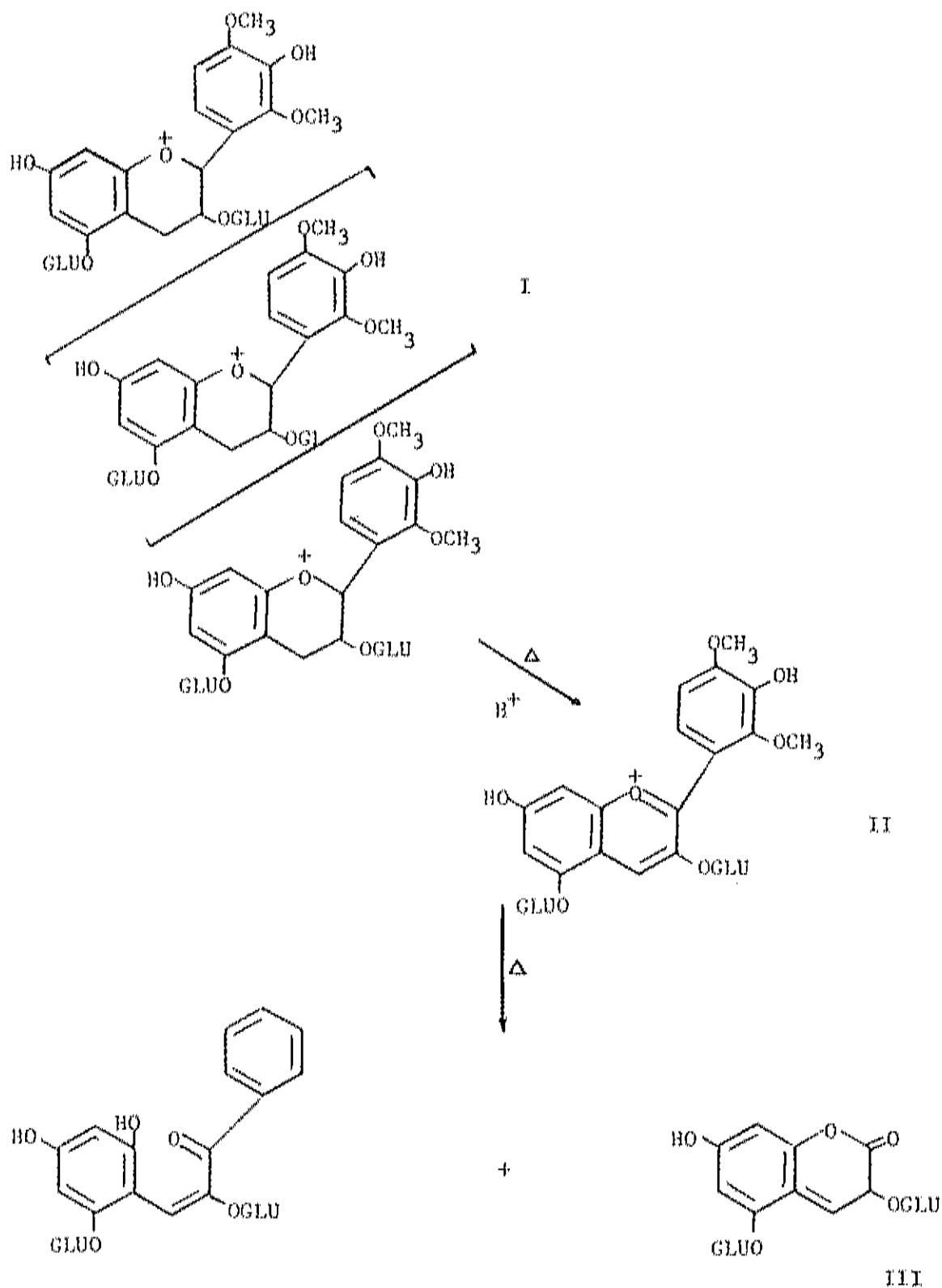


Fig. 13 Estructura Presuntiva de Taninos, Proantocianidina(I), Malvidina(II) y sus Productos de Degradación(III).

comparar propiedades espectrofotométricas, su identificación queda en un estado tentativo. Aunque por otro lado, para este mismo compuesto, ya ha sido pronunciado su hallazgo en las hojas de la planta de jojoba, [Sharp, 1974]; esa autora examina la importancia que tiene la presencia de una proantocianidina (malvidina), con relación a la clasificación taxonómica de la jojoba y concluye que la planta no debe clasificarse dentro de la familia Buxaceae, ya que los otros miembros de esta familia no presentan este tipo de compuestos. Y existen estudios en los que en base a características anatómicas, colocan a la jojoba en la familia Simmondsiaceae con un solo miembro: la Simmondsia chinensis (Link) C.K. Schneider.

La presencia de antocianinas y antocianidinas en las plantas ha sido tomado por largo tiempo como un indicador en la sistemática vegetal, sobre todo por su naturaleza colorida [Singleton y Esau, 1969] y su facilidad para que sea utilizado como carácter común dentro de algunas familias; sobre todo estas coloraciones debidas a pigmentos aparecen en el exterior de frutas y flores.

Sin embargo la presencia de proantocianidinas, se ha relacionado más con el proceso de lignificación y la síntesis de taninos, (Bate-Smith y Lerner 1954); así como a la impartición de astringencia al gusto de animales y del hombre; proponiéndose que a medida que aumenta el grado de polimerización de estos compuestos, también lo hace su astringencia, sin embargo no se conoce que porción de las proantocianidinas complejas es la que está involucrada en esa sensación astringente del material

vegetal, [Haslam, 1981]. La presencia de esta clase de compuestos fenólicos, también a dado lugar al punto de vista fitogenético que establece que a medida que la planta desarrolla su sistema vascular, deja de sintetizar estos compuestos; ya que por ejemplo los helechos presentan cantidades muy importantes de estos metabolitos secundarios, [Bate-Smith y Lerner, 1954].

Se ha involucrado a estos compuestos como promotores del crecimiento, promoviendo división y alargamiento celular en cultivo de tejidos vegetales, [Steward y Shautz, 1956], Y también como antagónico de la acción de giberelinas [Green y Corcoran, 1975].

En la Figura 14 se presenta el espectro diferencial de absorción al UV del extracto isopropanólico del harina desengrasada de jojoba, mostrando absorbencia en la región de los fenoles simples y fenoles complejos, pero no los polifenoles. Por lo que un fraccionamiento tentativo de fenoles podría diseñarse, debido a que se trataría de compuestos no involucrados como parte constitutiva de estructuras y que además fuese necesaria la modificación a la metodología para extraerlos.

Fraccionamiento de los Compuestos Fenólicos del Extracto Isopropanólico de la Harina de Jojoba Desengrasada sobre la Columna de PVP

A los 10ml del extracto isopropílico concentrado de la almendra de jojoba se les fraccionó sobre la columna de PVP, como se puede observar en la Fig. 15, en donde aparecen graficados el número de fracciones del eluido, contra la absorbencia;

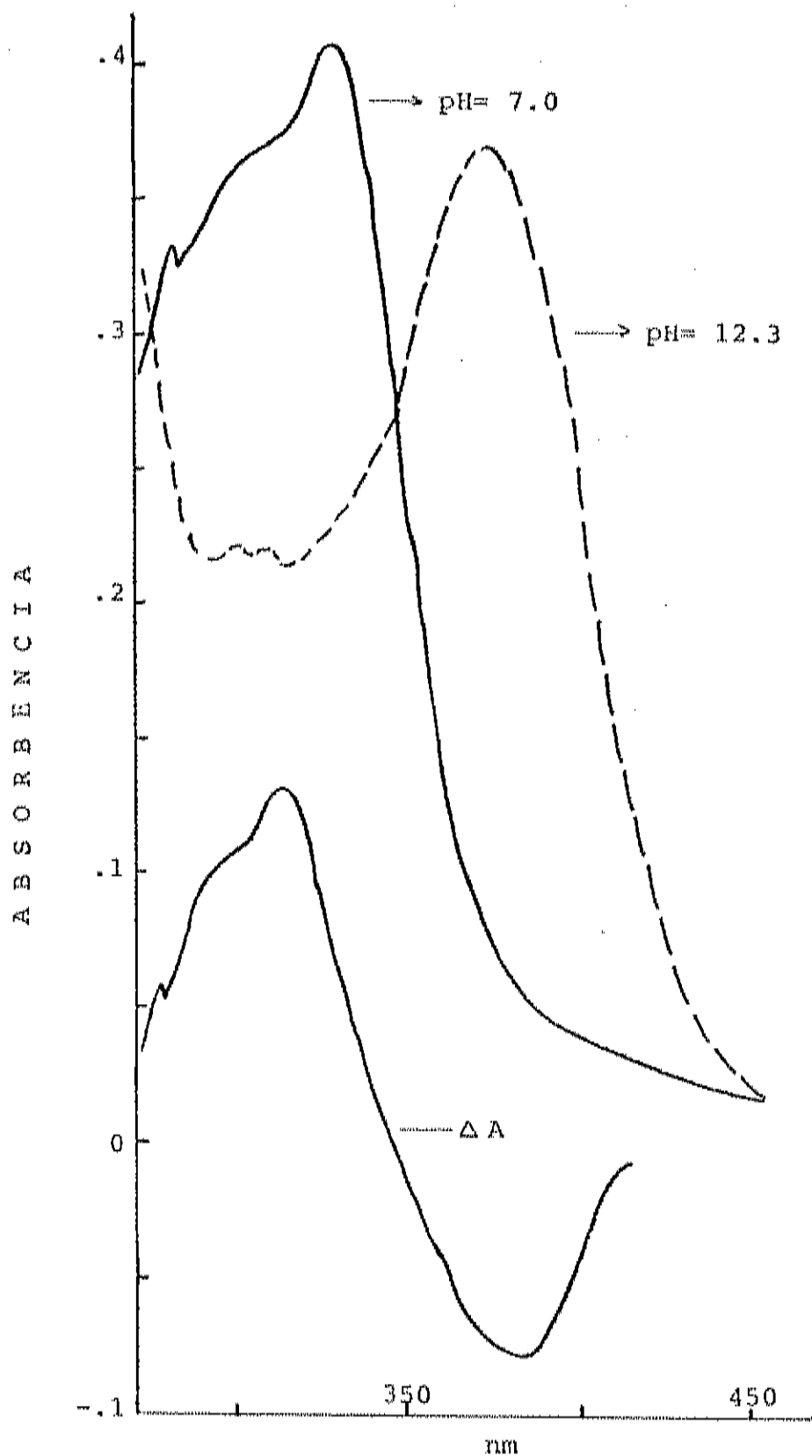


Fig.14 Espectro de Absorción por diferencia en la región UV del Extracto Isopropanólico del Harina de Jojoba

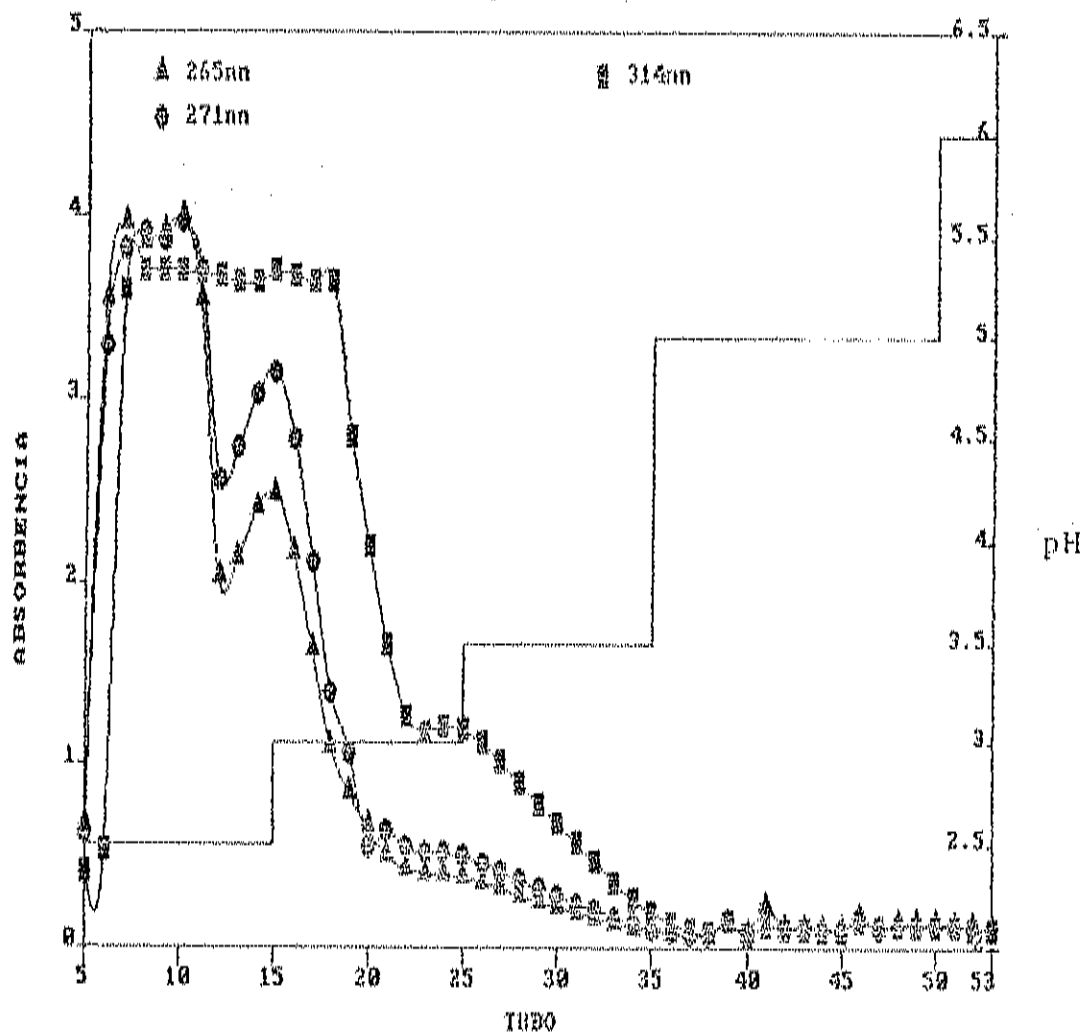


Fig. 15 . Fraccionamiento Cromatográfico del Extracto isopropanólico de Jojoba sobre la Columna de PVP.

cada fracción colectada fué de 10ml por tubo, e individualmente se le registró un espectro de absorción en la región UV que fueron imprescindibles para efectos del dibujo de esta Figura.

Como se aprecia también de la Figura 15, aparecen trazados en forma escalonada el gradiente de pH de las soluciones eluyentes, que van de pH 2.5 a 6.0, y el número total de fracciones fué de 53.

Prácticamente todos los compuestos fenólicos que absorben en el UV, fueron eluidas desde valores de pH de 2.5 a 3.5; pareciendo que existen 3 picos máximos de absorción y que corresponden a compuestos que absorben a las siguientes longitudes de onda: 260, 265, 271, 314, 322 y 325nm.

Este tipo de experimentos son de tipo corroborativo con relación a la naturaleza fenólica de los compuestos extraídos con isopropanol del harina desengrasada del almendra de jojoba; no se hicieron intentos ulteriores con el fin de identificar individualmente a dichos compuestos.

Es de notar también que la columna de PVP se sobresaturó de los compuestos que absorben al UV en la región de pH de 2.5 a 3.0, por lo que podrían realizarse experiencias para optimizar condiciones de elución e identificación de los fenoles responsables de la absorción en la región UV.

Cuando se registró un espectro de absorción al UV del extracto isopropanólico directamente, se presentó un barrido que mostraba máximos no definidos a: 220, 265, 272, 299.5 y 322nm, por lo que se resolvieron por el uso de la PVP otras dos

longitudes de onda de absorción, a 314 y 325nm. El método cromatográfico es relativamente simple y la elución con gradiente de pH remueve los fenoles de la PVP, y se ha mostrado que su resolución es excelente, inclusive para la separación de homólogos en la misma serie de compuestos fenólicos, [Vargas-Estrada, 1976].

CONCLUSIONES

- La novedad de la metodología establecida en este trabajo para la destoxificación de la jojoba, residió fundamentalmente en el supuesto de que la simmondsinas no eran los únicos compuestos tóxicos y que podría haber otros de tipo fenólico; por lo que, el empleo de un disolvente ad hoc para tal fin resultó ser el isopropanol al 70% en agua; entre los compuestos tóxicos eliminados se encuentran las simmondsinas y compuestos aromáticos, cuyos contenidos fueron removidos en un buen porcentaje, los compuestos fenólicos en un 36% y la simmondsina hasta niveles no detectables por el método utilizado para su cuantificación. Se comprobó que las simmondsinas no son los únicos compuestos tóxicos de la semilla de jojoba, sobre todo considerando que la eliminación de los fenólicos mejoró la aceptabilidad de las dietas por las ratas y que no se presentó ningún deceso de animales. La pérdida de compuestos durante la destoxificación fué del orden del 36.5%.

- El empleo de la diálisis como estrategia para disminuir esta pérdida se hizo necesaria. De esta manera no se pierden polímeros de alto peso molecular y sí en cambio pequeñas moléculas interferentes y tóxicas.

- Se pudieron aislar las proteínas sin modificación sustancial de sus características fisicoquímicas, como solubilidad y efecto de pH. No se hicieron intentos por aislar la fracción de prolamina, considerando que fue solubilizada desde el principio del tratamiento con isopropanol. La extracción de

proteína se estimó en un 33% con relación al peso seco de la muestra. Por lo que probablemente en la fracción de albúminas estén contenidas las prolaminas. Esta fracción es la más abundante de las contenidas en jojoba.

- El aislamiento de carbohidratos contenidos en cada fracción aislada de proteínas fué determinada, encontrándose que se solubilizó alrededor de 63.3%; se presume que se trata de hemicelulosas; cuando a la porción residual final de la extracción de proteínas se le trató con NaOH al 18%, se liberaron las hemicelulosas unidas a fenoles, consistiendo en el 36.7% de los carbohidratos totales que quedaron dentro del tubo de diálisis (no dializables), la coloración rojiza que presentaron se debió a la presencia de fenoles degradados que absorbieron a una sola longitud de onda: 277nm.

- Se implementó una manera sencilla para determinar el tipo de compuestos fenólicos que estaban presentes en la testa y almendra de jojoba, de acuerdo a su absorción diferencial a los valores de pH en la región UV. La testa mostró fenoles complejos y polifenoles, y la almendra, simples y complejos. En intentos para caracterizarlos parcialmente se encontró un compuesto fenólico no descrito para la testa, malvidina, aunque harían falta pruebas confirmatorias en relación a un estándar puro. Por otro lado se evidenció la naturaleza fenólica de los compuestos contenidos en el extracto isopropanólico del almendra de jojoba, por métodos espectrofotométricos y cromatográficos.

Comentarios Finales

A través del desarrollo de la investigación sobre jojoba aquí presentada, huelgan las justificaciones sobre la necesidad de seguir explorando las líneas apenas tocadas superficialmente y en forma limitada; por lo que se sugiere se estudiaran aquellas áreas imperativas que se señalan a continuación:

- Se han presentado los fundamentos experimentales para la elaboración de concentrados y aislados protéicos de jojoba, por lo que se hace necesario, el diseño experimental básico para la utilización de la semilla completa en lugar de la pasta para la obtención de la proteína; y el escalamiento y optimización de operaciones a nivel de planta piloto para la extracción del aceite y destoxificación de la pasta.

- El procedimiento practicado a la jojoba con el fin de eliminar los compuestos tóxicos y antinutricionales, evaluado biológicamente con ratas, espera ser evaluado con animales de importancia económica. Y completar el perfil de aminoácidos, ya sea con metionina suplementaria ó cereales; la jojoba se asemeja a las leguminosas en cuanto a calidad de proteína.

- Elucidar cual de los compuestos fenólicos es el responsable del rechazo de las ratas al consumo de dietas elaboradas a base de semilla de jojoba. Y si existe acción sinérgica de fenoles sobre el efecto toxicológico de la simmondsina.

- La composición en compuestos fenólicos de la jojoba presenta un reto de investigación muy interesante, sobre todo cuando se relaciona con la eterna dualidad: estructura-función.

- Las proteínas aisladas por esta metodología aguardan ser caracterizadas bajo la óptica de sus propiedades biológicas, funcionales y fisicoquímicas.

- Los azúcares tan suigéneris de la jojoba necesitan de ser identificados y caracterizados desde diferentes puntos de vista, tanto como las proteínas.

- Es necesario relacionar la composición de la semilla de jojoba con las características que presenta la planta para soportar las condiciones de stress que le impone la ecología del desierto y tratar de entender los mecanismos fisiológicos y bioquímicos de la tremenda adaptabilidad al ecosistema.

- De la fauna silvestre que se alimenta con semilla de jojoba, solo un roedor ha coevolucionado con la planta, por lo que estudios de evaluación biológica con el alimento destoxificado, sería de gran utilidad para observar preferencias y discriminación de uno y otro producto.

- Se han examinado muestras de semilla de jojoba que presentan testa de diferente grosor y color, por lo que una selección de la jojoba en función de las características de la testa es deseable. Sobre todo considerando que la testa presenta una cantidad elevada de compuestos fenólicos, por la contribución que éstos harían a la pasta residual destinada a la alimentación animal. Es necesario una selección de la semilla de jojoba haciendo uso de algunos de los criterios esbozados, con la finalidad de apoyar programas de fitomejoramiento para jojoba.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- A.O.A.C., 1984. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, 4^o ed., Washington D.C..
- Baker, H.G., ed., 1970. Plant and Civilization, 2^o ed., Wodsworth Publishing, Inc., Belmont, Calif.
- Ball, N., 1983. Sequía y Dependencia en el Sahel, en Salud e Imperialismo. Siglo XXI editores, México D.F.
- Bate-Smith, E.C., 1954. Leuco-Anthocyanidins: 1. Detection and Identification of Anthocyanidins Formed from Leucoanthocyanins in Plant Tissues, *Biochem. J.*, 58:122.
- Bate-Smith, E.C. y N.H. Lerner, 1954. Leuco-Anthocyanidins: 2. Systematic Distribution of Leuco-Anthocyanins in Leaves, *Biochem. J.*, 58:126.
- Bender, A.E. y B.H. Doell, 1957. Biological Evaluation of Proteins: A new aspect, *Brit. J. Nutr.*, 11:140.
- Bishop, C.T., S.T. Bayles y G. Setterfield, 1958. Chemical Constitution of the primary Cell Walls of Avena Coleoptides, *Plant Physiol.*, 33:283.
- Booth, A.N., C.A. Ellinger y A.C. Waiss, 1974. Isolation of a Toxic Factor from Jojoba Meal. *Life Science*, 15(6):1115.
- Bourdoux, P., M. Mafuta, A. Hanson y A.M. Ermans, 1980. Cassava Toxicity: The Role of Linamarin, en A.M. Ermans, N.M. Mbulamoko, F. Delange y R. Ahluwalia eds., Role of Cassava in the Etiology of Endemic Goitre and Cretinism, International Development Research Center, pp. 15.
- Bower, N.W., R. Storey, P.L. O'Connell y W.J. Utz, 1982. Nutritional Evaluation of the Jojoba Plant: Elemental Analysis of the Seed Meal. *J. Agric. Food. Chem.*, 30:392.
- Brouillard, R. y B. Delaporte, 1977. Chemistry of Anthocyanin Pigments. 2. Kinetic and Thermodynamic Study of Proton Transfer, Hydration, and Tautomeric Reactions of Malvidin 3-glucoside. *J. Amer. Chem. Soc.* 99:8461.
- Campos, E., 1979. Por los desiertos del Mundo, en *Desierto y Ciencia*, Centro de Investigaciones en Química Aplicada, No. 1, octubre, Saltillo, Coahuila.
- Cardoso F.A., 1980. Extraction, Characterization and Functional Properties of Jojoba Protein. Ph.D. Dissertation de la University of Arizona. No. 360.

- Chang, S.I. y H.L. Fuller, 1964. Effect of Tannin Content of Grain Sorghum on their Feeding Value For Growing Chicks. *Poultry Sci.*, 43:30.
- Chaykin, S.M., ed., 1966. *Biochemistry Laboratory Techniques*, John Wiley & Sons, Inc., New York, pp.17.
- Chiang, B.X. y J.A. Johnson, 1977. Measurement of Total and Gelatinized Starch by Glucoamylase and O-Toluidine Reagent, *Cereal Chem.* 54:429.
- DeBruin, A.. 1976. *Biochemical Toxicology of Environmental Agents*. Elsevier, pp.484.
- DeSwardt, G.H., E.C. Maxie y V.L. Singleton, 1967. Some Relationships Between Enzyme Activities and Phenolic Components in Banana Fruit Tissues, *S. Afr. J. Agric. Sci.*, 10:641.
- Diario Oficial, Viernes 25 de Enero de 1980. Me'xico D.F.
- Dubois, M., A.K. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith, 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related substances, *Analyt. Chem.*, 28:350.
- Elliger, C.A., A.C. Waiss y R.E. Lunding, 1973. Simmondsin on Usual-2-Cyanomethylenecyclohexil Glucoside From *Simmondsia Californica*, *J. I.Chem. Soc., Perk. Trans.*, 1 Nov., 19:2202.
- Felger, R.S., y M.B. Moser, 1974. Seri Indian Pharmacopoeia, *Economic Botany*, 28:414.
- Furia, T.E., ed., 1980. *CRC Handbook of Food Additives*, 2 ed., Vol. II, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, pp.327.
- García-Prado, A., 1973. Obtención de un Concentrado y un Aislado Protéico a Partir de Semilla de Girasol, Tesis Profesional, ENCB, IPN, México, D.F., pp.43.
- Gentry, H.S., 1958. The Natural History of Jojoba (*Simmondsia chinensis*) and Its Cultural Aspects, *Econ. Bot.*, 12:261.
- Glick, Z. y M.A. Joslyn, 1970. Food Intake Depression and other Metabolic effects of Tannic Acid. *J. Nutr.* 100:509.
- Glick, Z. y M.A. Joslyn, 1970. Effect of Tannic Acid and related compounds on the Absorption and Utilization of Proteins in the Rat. *J Nutr.* 100:516.
- Green F.B. y M.R. Corcoran, 1975. Inhibitory Action of Five Tannins on Growth Induced by Several Gibberellins, *Plant Physiol.*, 56:801.

- Gupta, R.K. y E. Haslam, 1979. Vegetable Tannins - Structure and Biosynthesis, pp.15-24, en J.H. Hulse ed., Polyphenols in Cereal And Legumes. Proceedings of the 36th. Annual Meeting of the Inst. of Food Technologists. St. Luis Missouri, 10-13 June.
- Hahn, D.H., L.W. Rooney y C.F. Earp, 1984. Tannin and Phenols of Sorghum, Cereal Quality Lab. Dept. of Soil & Crop. Sciences., Texas A&M University, 29(12):776.
- Hall, R.L., 1973. Toxicants Occurring Naturally in Spices and Flavors, pp.448-463, en National Academy of Sciences ed., Toxicants Naturally in Foods, 2^o ed., National Academy of Science, Washington, USA.
- Happich, M.L., C.E. Bodwell, R. Hackler, L. Phillips, J.G. Derse, P.H. Elliott, J.G. Hartnagel, R.E. Hopkins, D.T. Kapiszka, E.L. Mitchell, G.V., G.F. Parsons, E.E. Prescher, E.S. Robaldek, y M. Wonack, 1984. Net Protein Ratio Data: AACC-ASTM. Collaborative Study, J. AOAC, 67:255.
- Harborne, B.J., 1976. Function of Flavonoids in Plants, pp.736-778, en T.W. Goodwin, ed., Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, 2^o ed., Vol. 1, Academic Press, Inc., New York.
- Haslam, E., 1981. Vegetable Tannins, pp.527-556, en E.E. Conn ed., The Biochemistry of Plants, Vol. 7, Secondary Plant Products, Academic Press, Inc., San Francisco.
- Hillis, W.E., y T. Swain, 1959. The Phenolic Constituent of Prunus domestica. II. The Analysis of Tissue of the Victoria Plum Tree, J. Sci. Food Agric., 10:135.
- Jambunathan, R. y E.T. Mertz, 1973. Relationship between Tannin Levels, Rat Growth and Distribution of Proteins in Sorghum. J. Agr. Food Chem., 21:692.
- Joslyn, M.A., y J.L. Goldstein. 1964. Astringency Principles: Changes in Phenolic Content in Persimons During Ripening and Processing. J. Agric. Food Chem., 12:511.
- Jurd, L., 1972. Some Advances in the Chemistry of Anthocyanin-type Plant Pigments, pp.123-142, en C.O. Chichester, The Chemistry of Plant Pigments, Academic Press, New York.
- Martinez, M., 1965. Las Plantas Medicinales de México. Ediciones Botas., México, pp.443.
- Mc.Donald, P., R.A. Edwards y J.F.D. Greenhalgh, 1981. Animal Nutrition, 3^o ed., Longman Inc., New York, pp.442.

- Medina, J.L. Y H. Yeomans, 1982. Destoxificación de la Pasta de Jojoba. pp.336-344. en M. Puebla, ed., Memorias: IV Reunion Internacional de la Jojoba.
- Meyer, E.W., 1970. Oilseed Protein Concentrates and Isolates. Symposium, Oilseed Processors Challenged by World Protein Need. World Congress, Chicago, U.S.A..
- Miller, W.P., 1978. Markets, Economics and Future Growth of A Jojoba Agro-Industry An Overview, pp.269-278, en D.M. Yermamos, ed., 3^o International Conference on Jojoba, Riverside, Calif.
- Mitjavila, S., G. De Saint-Blanquat y R. Derache, 1970. Effect of Tannic Acid on Intestinal Absorption. Food Cosmetol. Toxicol., 8:27.
- Miwa, T.K., 1971. Jojoba Oil Wax Esters and Derived Fatty Acids and Alcohols: Gas Chromatographic Analysis, J. Amer. Oil Chemists Soc., 48:259.
- Moore, F. y J. Collins, 1982. Podemos Detener el Desierto?. en Comer es Primero, Siglo XXI Editores, México D.F..
- Murrieta X., 1983. Desarrollo y Perspectivas de la Jojoba en el Desierto Sonorense. Primer Encuentro Nacional de Jojoba, S.P.V. Catamarca, Argentina.
- National Research Council, 1985. Jojoba: New Crop for Arid Land, New Material for Industry. National Academy Press, Washington D.C..
- Ngoupayou, J.D.N., P.M. Malorino y B.L. Reid, 1982. Jojoba Meal in Poultry Diets, Poultry Sci., 61:1692.
- Ngoupayou, J.D.N., Ph.M. Malorino, W.A. Schurg y B.L. Reid, 1985. Jojoba Meal in Rabbit Diets, Nutrition Reports International, 31(1).
- Noyes, R., ed., 1969. Protein Food Supplements, Noyes Development Corporation, New Jersey, USA.
- Ovalle, I., 1980. La Jojoba en el Programa de Capacitación y Empleo para el Fomento de Recursos Naturales en Zonas Marginadas. en M. Puebla ed., Memorias: IV Reunion Internacional de la Jojoba.
- Parrodi, A.R., J. Trueba, 1978. Factores Ecológicos y Sociales de la Desertificación en México, en La Desertificación en México, Instituto de Investigaciones en Zonas Desérticas, Univ. Autonoma de San Luis Potosi, San Luis Potosi.

- Patrick, H. y Ph. J. Schaible, 1980. Poultry: Feeds and Nutrition, 2^o ed., Avi. Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut, pp.316.
- Robinson, T., ed., 1983. The organic Constituents of Higher Plants, 5^o ed., Flavonoids and Related Compounds, Cordus Press, Amherst Ma., pp.191.
- Samac, D., T.E. Sage, C.V. Lovejoy and R. Storey, 1980. Protein Content, Trypsin Inhibitor and Nitrogen Metabolism in Jojoba Seed. Jojoba Happenings, 33:11.
- Samac, D. y R. Storey, 1980. Proteolytic and Trypsin Inhibitors Activity in Germinating Jojoba Seed. Plant Physiol., 68:1339.
- Scheerens, J.C. y J.W. Berry, 1986. Buffalo gourd: Composition and Functionality of Potential Food Ingredients, Cereal Foods World, 31(2):183.
- Shah, A. y H. Stegemann, 1983. Protein of Jojoba Bean (*Simmondsia chinensis*), Extraction and Characterization by Electrophoresis. J. Agron. and Crop. Science, 152:39.
- Sharp, P.B., 1974. Anthocyanin in *Simmondsia chinensis*: Genetic and Taxonomic Implications. M. of S. Thesis, University of Ariz., No. 386.
- Sherdroke, W.C., ed., 1977. Jojoba Seed. Jojoba Happenings. 14:21.
- Siegel, N.R. y K.E. Russel, 1979. Soluble Polyvinylpyrrolidone and Bovine Serum Albumin Adsorb Polyphenols from Soybean Suspension Cultures, Plant Physiol., 63:206.
- Siegler, D.S., 1981. Secondary Metabolites and Plant Systematics, pp.139-171, en E.E. Conn ed., The Biochemistry of Plants, Vol. 7, Secondary Plant Products, Academic Press, Inc., San Francisco, USA.
- Singleton, V.L., y P. Esau, 1969. Advances in Food Research, Supplement 1, Phenolic Substances in Grapes and Wine, and their Significance, Academic Press, New York.
- Singleton, V.L., F.H. Kratzer, 1969. Toxicity and Related Physiological Activity of Phenolic Substances of Plant Origin, J. Agr. Food Chem., 17:497.
- Snedecor, G.W. y W.C. Cochran, 1980. Statistical Methods, 17 ed., The Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, pp.157.

- Southgate, D.A.T., 1974. Guide Lines for the Preparation of Tables of Food Composition, S. Karger. Basel (Switzerland), pp.27.
- Stafford, H.A.. 1960. Diferences Between Lignin-like Polymers formed by Peroxidation of eugenol and Ferulic acid in leaf sections of Phleum. Plant Physiol. 35:108.
- Storey, R., N. Bower, C. Lovejoy y R. Tagget, 1983. Analysis of Selected Nutritional and Antinutritional Factors in Jojoba Seed From the United States and México. 25, en A.E. Cesnick, ed., Jojoba and its Uses, Through 1982, Proceedings of the Fifth International Conference of Jojoba and its Uses. University of Arizona, College of Agriculture, Office of Arid Lands Studies and Division of Continuing Education, Conference Department, Tucson Arizona.
- Steward, F.C. y E. M. Shantz, 1956. The Chemical Induction of Growth in Plant Tissue Cultures, pp.165-186, en R.L. Wain y F. Wightman eds., The Chemistry and Mode of Action of Plant Growth Substances, Academic Press, Inc. New York.
- Tanner, G.R. y I.M. Morrison, 1983. Phenolic-Carbohydrate complex in the Cell Walls of Lolium perenne, Phytochemistry, 22:1433.
- Valencia, M.E., J.L. Atondo y G. Hernández, 1985. Ntritive Value of Zostera marina and Cardon (Pachycereus pringlei) as Consumed by The Seri Indians in Sonora México, Ecol. of Food and Nutrition, 17:165.
- Van Sumere. C.F., J. Albercht, A. Dedonder, A. De Poeter y I. Pé, 1975. Plant Proteins and Phenolics, pp.212-256, en, J.B. Harborne y C.F. Van Sumera, eds., The Chemistry and Biochemistry of Plant Proteins, Vol. 11, Academic Press, New York.
- Vargas-Estrada, M. del C., 1976. ESTUDIOS Sobre Capsaicina y Vitamina C en Frutas del Género Capsicum. Purificación Cromatográfica y Caracterización del Principio Pungente de Frutos Capsicum, Tesis Profesional, ENCB, IPN, México, D.F., pp.87.
- Verbiscar, A.J. y T.F. Banigan, 1977. Jojoba Seed Meal as an Animal Feed, Quarterly Report, March-May 1977, Anver Bioscience Desing, Inc., 1-10.
- Verbiscar, A.J. y T.F. Banningan, 1978. Composition of Jojoba Seed and Foliage. J. Agric. Food Chem. 26:1456.
- Verbiscar, A.J., T.F. Banningan, C.W. Weber, B.L. Reid, J.E. Trei, E.A. Nelson, R.F. Raffauf y D. Kosersky, 1980. Detoxi-

- fication of Jojoba Meal. *J. Agric. Food Chem.* 28:571.
- Verbiscar, A.J., T.F. Banigan, C.W. Weber, B.L. Reid, R.S. Suingle, J.E. Trei y A.E. Nelson, 1981. Detoxification of Jojoba Meal by Lactobacilli. *J. Agric. Food Chem.* 29:296.
- Vohra, P., F.M. Kratzer y M.A. Joslyn, 1966. The Growth depressing and Toxic effect of Tannins to Chicks. *Poultry Sci.*, 45:135.
- Wall, J.S., 1964. Cereal Protein, pp.315-341, en H.W. Schultz, ed., *Symposium on Foods: Proteins and their Reactions*, The Avi. Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut.
- Watanabe, T., K. Takahashi y K. Matsuda, 1978. Carbohydrates of Seed: Isolation and Characterization of Xyloglucan, pp.83-105, en, D.M. Yermanos, ed., *Proceedings 3rd International Conference on Jojoba*.
- Weber, C.W. y B.L. Reid, 1975. Toxic Effects of *Simmondsia* in Growing and Reproducing mice. *Fed. Proc.* 34:226.
- Williams, R.R., 1980. The Toxicity of Simmondsin, a Glycoside Found in Jojoba. M.S. thesis, University of Arizona, No.141.
- Windholz M., ed., 1983. *The Merck Index*, 10o ed., Merck & Co., Inc., Rahway, N.J., pp.749.
- Wiseman, O.M., 1983. Purification and Characterization of Protein Concentrates from Jojoba (*Simmonsia chinensis*) Pressed Meal. Ph. D. Tesis de la University of Arizona .
- Wiseman, O.M., y R.L. Price, 1986. Characterization of Protein Concentrates From Jojoba (*Simmondsia chinensis*), *Cereal Chem.*, en Prensa.
- Yermanos, D.M., 1974. Agronomic Survey of Jojoba in California. *Econ. Bot.* 28:160.
- Yermanos, D.M., 1983. Creating a new Source of Plant Lipids en Biosynthesis and Function of Plant Lipids. en W.W. Thomson y M. Gibbs, *American Society of Plant Physiologist*, Rockville, Maryland, USA, pp.250.