

**ESTUDIO FÍSICO-QUÍMICO Y DE ESTABILIDAD DEL ACEITE DE NUEZ DE  
*MACADAMIA TETRAPHYLLA* CULTIVADA EN LA REGION CAFETERA  
COLOMBIANA**

**JOHANNA MARCELA CARVAJAL JARAMILLO**

**DAVID FERNANDO BEDOYA MARTÍNEZ**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA  
PEREIRA  
2010**

**ESTUDIO FÍSICO-QUÍMICO Y DE ESTABILIDAD DEL ACEITE DE NUEZ DE  
*MACADAMIA TETRAPHYLLA* CULTIVADA EN LA REGION CAFETERA  
COLOMBIANA**

**TRABAJO DE GRADO**

**Requisito final para optar el titulo de Tecnólogo en Química**

**JOHANNA MARCELA CARVAJAL JARAMILLO**

**DAVID FERNANDO BEDOYA MARTÍNEZ**

**Director**

**Dra. GLORIA EDITH GUERRERO ALVAREZ**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA  
PEREIRA  
2010**

**NOTA DE ACEPTACION DEL TRABAJO DE GRADO**

**ESTUDIO FÍSICO-QUÍMICO Y DE ESTABILIDAD DEL ACEITE DE NUEZ DE  
*MACADAMIA TETRAPHYLLA* CULTIVADA EN LA REGION CAFETERA  
COLOMBIANA**

**Presentado por:**

**JOHANNA MARCELA CARVAJAL JARAMILLO  
DAVID FERNANDO BEDOYA MARTÍNEZ**

Los suscritos, director y jurados del presente trabajo de grado, una vez realizada la versión escrita y presenciado la sustentación oral, decidimos otorgar:

La nota de \_\_\_\_\_

Con la connotación de \_\_\_\_\_

Para constancia firmamos en la ciudad de Pereira hoy:

Director:

**Gloria Edith Guerrero Álvarez** \_\_\_\_\_

Jurado

**Juan Pablo Arrubla Vélez** \_\_\_\_\_

## DEDICATORIA

*A Dios nuestro creador, que me permitió vivir esta experiencia.*

*A mi padre Gildardo Bedoya Arcila, que desde el cielo ilumina mis  
caminos en la tierra.*

*A mi madre, hermanos y familiares más cercanos, agradezco su apoyo y  
acompañamiento para dar feliz término a esta etapa de mi vida.*

*David Fernando*

*Por ser mi fortaleza y brindarme la oportunidad de vivir cada día,  
Con todo mi amor y cariño a ti Dios.*

*Por ser mi apoyo, estar conmigo incondicionalmente, alentarme y  
brindarme todo su amor, doy gracias a mis padres "Edalva y Gerardo",  
mis hermanos y familiares cercanos.*

*Por su coraje y rectitud fuente de inspiración, el hombre de los  
hombres, a mi querido hermano Luis.*

*Por su esfuerzo, todo su apoyo, la confianza que deposito en mí, aunque  
estando lejos ha estado a mi lado, a mi hermana Nelly y familia.*

*Por sus consejos, regaños, risas, llantos y compartir los  
mejores momentos conmigo todo este tiempo, a mis amigos inseparables.*

*Johanna Marcela*

## **AGRADECIMIENTOS**

A nuestras familias por su apoyo durante este camino ya recorrido.

A la doctora Gloria Edith Guerrero, por su ayuda, orientación y comprensión a lo largo del trabajo. Por compartir sus conocimientos e inspirar admiración.

A Clemencia Villegas, encargada del Banco de Germoplasma del Centro de Investigaciones del Café por suministrarnos las Nueces de Macadamia *Tetraphylla* para este estudio.

Al laboratorio de análisis de aceites de CENIPALMA por prestarnos sus servicios de análisis.

Al laboratorio de Calidad de Productos Naturales de la Universidad Tecnológica de Pereira por la disponibilidad, colaboración y los análisis cromatográficos realizados.

Al personal que conforma las área del almacén, reactivos, laboratorios y demás dependencias de la escuela por su disposición para la elaboración del proyecto.

Al grupo de Investigación de Oleoquímica, tanto profesores como compañeros de trabajo por brindarnos su amistad y ayuda; haciendo nuestra estancia en el grupo una de las mejores experiencias.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	9
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	10
<b>INDICE DE ANEXOS</b> .....	11
<b>RESUMEN</b> .....	12
<b>1. JUSTIFICACION</b> .....	13
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	16
<b>3. ANTECEDENTES</b> .....	17
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	18
4.1. Objetivo General .....	18
4.2. Objetivos Específicos .....	18
<b>5. MARCO TEORICO</b> .....	19
5.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA .....	19
5.1.1. Origen .....	19
5.1.2. Clasificación Taxonómica .....	19
5.1.3. Características .....	19
5.1.4. Hojas .....	20
5.1.5. Flores .....	20
5.1.6. Fruto .....	21
5.1.7. Almendra .....	21
5.2. CONDICIONES AGROCLIMATOLÓGICAS.....	22
5.3. PROPAGACIÓN .....	22
5.4. PLAGAS Y ENFERMEDADES .....	22
5.5. COSECHA .....	23
5.6. ACEITES .....	23
5.6.1. Definición .....	23
5.6.2. Composición Química de los Aceites .....	23
5.6.2.1. Triglicéridos .....	23
5.6.2.2. Composición de la Fracción Insaponificable .....	24
5.6.2.2.1. Vitamina E .....	25
5.6.2.2.2. Carotenos .....	26

5.6.2.2.3. Esteroles .....	26
5.6.2.2.4. Fosfolípidos .....	27
5.7. OBTENCION DE ACEITE .....	27
5.8. CARACTERIZACIÓN FÍSICA PARA ACEITE .....	27
5.8.1. Densidad o Gravedad Especifica .....	27
5.8.2. Índice de Refracción .....	28
5.9. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA PARA ACEITE .....	28
5.9.1. Índice de Acidéz .....	28
5.9.2. Índice de Saponificación .....	29
5.9.3. Índice de Yodo .....	29
5.9.3.1. Aceites Secantes .....	29
5.9.3.2. Aceites no Secantes .....	30
5.9.3.3. Aceites Semisecantes .....	30
5.9.4. Índice de Peróxidos .....	30
5.10. TÉCNICAS DE ANÁLISIS COMPOSICIONAL .....	30
5.10.1. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas .....	30
5.10.2. Cromatografía Liquida de Alta Eficiencia .....	32
5.10.2.1. Columnas .....	32
5.10.2.1.1. Fase Normal .....	32
5.10.2.1.2. Fase Reversa .....	33
5.10.2.2. Detectores .....	33
5.11. OLEOQUÍMICA .....	34
5.11.1. Aceites en la Industria Alimenticia .....	34
5.11.1.1. Nutracéuticos .....	35
5.11.2. Aceites en la Industria Cosmética .....	36
5.11.2.1. Cosméticos .....	36
5.11.2.2. Cosmecéuticos .....	37
<b>6. METODOLOGÍA .....</b>	<b>38</b>
6.1. Muestra de Análisis .....	38
6.2. Tratamiento de la Muestra .....	38
6.3. Extracción y almacenamiento del aceite de nuez de <i>M. tetraphylla</i> .....	38
6.4. Caracterización Física del aceite de nuez de <i>M. tetraphylla</i> .....	38
6.4.1. Determinación Índice de Refracción .....	38
6.4.2. Determinación Densidad .....	38
6.5. Caracterización Química del Aceite de nuez de <i>M. tetraphylla</i> .....	39
6.5.1. Determinación del Índice de Saponificación .....	39
6.5.2. Determinación del Índice de Yodo .....	39
6.5.3. Determinación del Índice de Peróxidos .....	39
6.5.4. Determinación del Índice de Acidez .....	39
6.6. Análisis Composicional del aceite de nuez de <i>M. tetraphylla</i> .....	39
6.6.1. Composición de Ácidos Grasos por CG/EM .....	39
6.6.2. Determinación del contenido de Vitamina E por HPLC .....	40

6.7. Seguimiento de Estabilidad del aceite de nuez de <i>M. tetraphylla</i> .....	40
6.8. Análisis Estadístico .....	40
<b>7. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	41
7.1. Estado actual del Banco.....	41
7.2. Balance de Materia de las Almendras analizadas .....	43
7.3. Contenido de Humedad de las nueces de <i>M. tetraphylla</i> .....	45
7.4. Porcentaje de Aceite de las nueces de <i>M. tetraphylla</i> .....	45
7.4.1. Descripción del Aceite .....	46
7.5. Caracterización Física del Aceite de nuez de <i>M. tetraphylla</i> .....	47
7.5.1. Índice de Refracción .....	47
7.5.2. Densidad .....	47
7.6. Caracterización Química del Aceite de nuez de <i>M. tetraphylla</i> .....	48
7.6.1. Índice de Saponificación .....	48
7.6.2. Índice de Yodo .....	48
7.6.3. Índice de Peróxidos .....	49
7.6.4. Índice de Acidéz .....	50
7.7. Análisis de la Composición del aceite de nuez de <i>M. tetraphylla</i> .....	50
7.7.1. Composición de Ácidos Grasos .....	50
7.7.2. Determinación de Vitamina E .....	55
7.8. Seguimiento de Estabilidad del aceite de nuez de <i>M. tetraphylla</i> .....	56
7.9. Discusión General .....	58
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	60
<b>9. RECOMENDACIONES</b> .....	61
<b>10. ANEXOS</b> .....	62
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	74



## INDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
TABLA 1. Condiciones del cultivo de <i>M. tetraphylla</i> en la región cafetera .....	22
TABLA 2. Plagas y Enfermedades del cultivo de Macadamia .....	22
TABLA 3. Ácidos grasos constituyentes de los triglicéridos .....	24
TABLA 4. Contenido de Humedad de las nueces de <i>M. tetraphylla</i> .....	45
TABLA 5. Porcentaje de aceite extraído de las nueces de <i>M. tetraphylla</i> .....	46
TABLA 6. Índice de Refracción para el aceite fresco de <i>M. tetraphylla</i> .....	47
TABLA 7. Densidad del aceite recién extraído de <i>M. tetraphylla</i> .....	47
TABLA 8. Índice de Saponificación del aceite de nuez de <i>M. tetraphylla</i> .....	48
TABLA 9. Índice de Yodo del aceite de nuez de <i>M. tetraphylla</i> .....	49
TABLA 10. Índice de Peroxidos del aceite de nuez de <i>M. tetraphylla</i> .....	49
TABLA 11. Índice de Acidéz del aceite de nuez de <i>M. tetraphylla</i> .....	50
TABLA 12. Composición lipídica del aceite de nuez de <i>M. tetraphylla</i> .....	50
TABLA 13. Principales fragmentos de los ácidos grasos .....	53
TABLA 14. Resultado de la cuantificación de vitamina E del aceite de de nuez de <i>M. tetraphylla</i> .....	55
TABLA 15. Promedios y Desviación Estandar del Seguimiento de Estabilidad del aceite de nuez de <i>M. tetraphylla</i> .....	56

## INDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
FIGURA 1. Hojas de las especies Macadamia .....	20
FIGURA 2. Inflorescencia de las especies Macadamia .....	20
FIGURA 3. Frutos de Macadamia Formados .....	21
FIGURA 4. Almendras de Macadamia en buenas condiciones .....	21
FIGURA 5. Estructura Química de los triglicéridos .....	24
FIGURA 6. Estructuras Químicas de tocoferoles y tocotrienoles .....	25
FIGURA 7. Estructura Química del B-Caroteno .....	26
FIGURA 8. Estructura común de los Esteroles .....	26
FIGURA 9. Estructura química de los Fosfolípidos .....	27
FIGURA 10. Reacción de hidrólisis de un triglicérido .....	28
FIGURA 11. Reacción típica de Saponificación .....	29
FIGURA 12. Reacción de la adición del yodo .....	29
FIGURA 13. Arboles de <i>M. tetraphylla</i> en la Catalina .....	41
FIGURA 14. Enfermedades fitopatológicas de las hojas y el tallo .....	42
FIGURA 15. Ataque de perforadores a la nuez .....	42
FIGURA 16. Almendras de <i>nuez de M. tetraphylla</i> frescas .....	42
FIGURA 17. Partes de la nuez de <i>M. tetraphylla</i> .....	44
FIGURA 18. Balance de materia del proceso de selección .....	44
FIGURA 19. Aceite de nuez de <i>M. tetraphylla</i> .....	46
FIGURA 20. Perfil cromatográfico de ácidos grasos .....	51
FIGURA 21. Reordenamiento de McLafferty y formación del ion $m/z = 74$ ....	52
FIGURA 22. Obtención del fragmento $m/z = 87$ por escisión .....	52
FIGURA 23. Perfil cromatográfico de vitamina E .....	55
FIGURA 24. Seguimiento de estabilidad del aceite de <i>M. tetraphylla</i> .....	57

## INDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
ANEXO 1. Principales diferencias entre <i>M. tetraphylla</i> y <i>M. integrifolia</i> .....	62
ANEXO 2. Derivatización de Acidos Grasos .....	63
ANEXO 3. Certificado análisis de estandar comercial .....	64
ANEXO 4. Condiciones Climatológicas subestación la Catalina .....	65
ANEXO 5. Especificaciones Técnicas para aceite de Macadamia .....	66
ANEXO 6. Requisitos fisicoquímicos de aceites comestibles establecidos por el ICONTEC .....	68
ANEXO 7. Separación del estándar FAME´s .....	69
ANEXO 8. Espectros de masas de los metilesteres .....	71
ANEXO 9. Seguimiento de estabilidad por semanas .....	73

## RESUMEN

En el presente estudio se evaluaron algunas propiedades físicas y químicas del aceite crudo extraído de nueces de *Macadamia tetraphylla* cultivadas en el eje cafetero Colombiano, provenientes del Banco de Germoplasma del Centro Nacional de Investigaciones del Café. Después de macerar las almendras, se realizó la extracción por método soxhlet con n-hexano como solvente, el extracto orgánico se concentró por rotaevaporación obteniéndose un rendimiento del 53.87% de aceite. Los parámetros físicos determinados para el aceite recién extraído fueron el índice de refracción (1,4607 a 25°C) y la densidad (0,9080 g/ mL a 25°C); se caracterizó químicamente conforme a los métodos oficiales descritos en las normas técnicas Colombianas vigentes; para el índice de saponificación (182,6 meq KOH / g), índice de yodo (52,4 cg/g), índice de peróxidos (0 meq O<sub>2</sub> / Kg) e índice de acidez (0,05 % en ácido oleico - 0,3345 mg KOH / g). Se realizó un seguimiento de estabilidad del aceite, durante dos meses evaluando cada ocho días la variación que tenía en cuanto a índice de acidez e índice de peróxidos, obteniéndose valores bajos lo cual indica una alta estabilidad oxidativa que va directamente relacionada con el bajo porcentaje de humedad (2,87 %) en las almendras y el buen tratamiento de la materia prima. Según el análisis por CG-EM el aceite está compuesto principalmente por ácido oleico (33,054%), ácido palmítico (27,734%), ácido palmitoléico (11,245%), ácido araquidónico (7,539%) y ácido eicosenóico (2,803%). La evaluación del contenido de vitamina E del aceite de nuez de *M. tetraphylla* se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia, encontrándose el  $\alpha$ -tocotrienol en una concentración de 37,364 ppm, como el único isómero detectado en el aceite.

## 1. JUSTIFICACIÓN

La macadamia es originaria de Australia, de los bosques lluviosos del litoral, al sureste de Queensland y nordeste de Nueva Gales del Sur. El primer espécimen de macadamia fue descubierto y recolectado en Septiembre de 1843, en estado silvestre, por el explorador alemán Friedrich Wilhelm Ludwig Leichhardt, cerca a Brisbane “Australia” (1).

Los cultivos de macadamia se basan en dos especies *M. integrifolia* y *M. tetraphylla* (2), aunque a nivel mundial se han reconocido 10 especies de Macadamia, pero sólo estas dos revisten importancia económica por los frutos comestibles, (3).

El consumo de Nuez de macadamia a nivel mundial ha aumentado a través de los años, los principales países productores por orden de importancia son: Australia, Estados Unidos, Sudáfrica, Kenia, Guatemala, Costa Rica y Brasil; en pequeña escala se encuentran: Nueva Zelanda, Colombia, México, El Salvador, Taiwán, Indonesia, Malawi, Singapur, Mozambique y Zimbabue.

Las almendras de nuez de macadamia son ricas en elementos esenciales tales como calcio, hierro, fósforo, magnesio y potasio, además vitaminas como la tiamina (B1), riboflavina (B2), retinol (A1) y niacina (B3). El aceite que contienen las almendras es más del 75% de su peso, no contiene colesterol, y sus niveles de sodio y grasas saturadas son bajos; contiene entre el 80% al 84% de ácidos grasos insaturados principalmente el oleico y palmitoleico, (4,5).

La especie de *M. integrifolia* posee un contenido del 75% de aceite y 4% de azúcar, muy uniforme y de calidad excelente; en relación con la especie de *M. tetraphylla* con un 67% de aceite y entre el 6-8% de azúcar, lo que la hace mas variable en calidad. Las almendras de *M. tetraphylla* contienen típicamente menos aceite y ambas especies son similares una a la otra, pues los mismos compuestos han sido reportados en cada una de ellas y botánicamente están muy vinculadas, comercialmente la especie *M. integrifolia* es la más difundida, ya que la mayoría de

los estudios reportados se centran en su caracterización, propagación e industrialización, (6).

El aceite de macadamia contiene el porcentaje más alto de grasas insaturadas comparado con otros aceites como el de oliva (74%), aceituna y canola, (4,5), por lo tanto muchos grupos de investigadores se han interesado en estudiar su composición y beneficios para la salud, destacando la importancia alimenticia que tiene, ya que la dieta a base de nuez y/o aceite de macadamia ayuda a disminuir el colesterol y el riesgo de enfermedades cardíacas, (7). Los estudios de alimentación humanos han demostrado una reducción de 8-12% en la lipoproteína de la baja densidad (LDL) cuando las almendras se substituyen por grasas más tradicionales en dietas recomendadas, (8).

La cosmética internacional se interesa en el aceite de Macadamia no solo por la presencia ácidos grasos como el palmitoléico, sino también por otros compuestos de gran importancia, por esto se utiliza en una variedad de productos existentes en el mercado, incluyendo barras de labios (5), cremas hidratantes para la piel, jabones y aceites para masajes, (3), bálsamo cosmético y terapéutico usados para el cuidado de la piel (9), crema anticelulítica (10), crema antiarrugas (11), crema para manos (12), crema para quemaduras de sol (13), composición lipofílica para cuidado personal (14), agentes para el cuidado del cabello (15), cosméticos para limpieza facial (16), preparaciones para protección solar (5), entre otros.

Por su amplio espectro de beneficios, la Macadamia es utilizada mundialmente de distintas formas en la industria confitera para la elaboración de chocolates, galletas, pasteles, panecillos, helados y postres. Su consumo también puede ser en forma natural (crudas), asadas, saladas, sazonadas, según el gusto de cada persona, (17). Muchos otros productos incorporan nuez de macadamia en su composición como licores, mermeladas y jaleas, (18).

En Colombia el primer huerto de macadamia lo introdujo Cenicafé, en el departamento del Quindío, al occidente colombiano, en 1969 en la granja de Paraguayito a 1.250 msnm, Buenavista (Quindío). En 1982 se sembraron 135

árboles adicionales, hijos de los anteriores, que iniciaron producción a los 5 años de edad y ahora presentan buen desarrollo, (1). Con base en el buen comportamiento de estos huertos, la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, tomó la decisión de iniciar un proyecto de investigación y fomento de la Macadamia en la zona cafetera en 1987. La mayoría de los cultivos establecidos en el eje cafetero se intercalaron con café, como complemento económico de los primeros cinco años, tiempo a partir del cual comienza la etapa productiva de la Macadamia, (19). En la zona cafetera hay producción durante todo el año, concentrándose 60% de la cosecha entre Junio y Septiembre, (20).

La macadamia, es un producto que aún no es muy conocido en el mercado nacional, y se presenta como una gran alternativa para aquellos agricultores que han pensado en diversificar aún más su producción. Del ALBA S.A es una empresa colombiana certificada, ubicada en Palmira, Valle del Cauca, procesadora de nuez de Macadamia, que elabora productos terminados a nivel industrial para repostería, y comercializándola de forma cruda, asada, cubierta con chocolate, en tortas y helados, e igualmente en forma de mantequilla, aceite, entre otros, (20, 4).

Cenicafé introdujo este cultivo al país generando el Banco de Germoplasma, y de manera conjunta con la Universidad del Quindío han desarrollado estudios con el fin de evaluar el comportamiento agronómico del conjunto, e identificar los problemas sanitarios que afectan la producción y causan daño a las plantaciones, (21,22).

A pesar de ser un cultivo adaptado a la zona cafetera, no se tiene un amplio conocimiento de la Macadamia en Colombia y particularmente de la especie *M. tetraphylla*, por ello considerando todos los usos que se le da internacionalmente al aceite de Nuez de Macadamia, y resaltando que en la región cafetera se cuenta con un banco de Germoplasma, se realizó el presente estudio para proporcionar datos sobre las características físico-químicas del aceite extraído, estabilidad oxidativa y composición química para así ampliar el conocimiento y la posible diversificación de la nuez de *M. tetraphylla*, generando bases científicas que promuevan su uso e industrialización.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Del género macadamia, dos especies son las más comerciales la *M. intergrifolia* y la *M. tetraphylla*, la primera especie es la más utilizada internacionalmente y de esta se han realizado varios estudios de la composición química de la nuez; sin embargo sobre la especie *tetraphylla* la información es escasa.

En Colombia, particularmente en la región cafetera existen cultivos de macadamia como otra fuente de ingreso, comercializándose la nuez y su aceite para uso alimenticio; sin embargo no son muchos los estudios realizados en el país sobre macadamia particularmente sobre el aceite que contiene. Teniendo en cuenta esto se plantea si: ¿Es posible ampliar el conocimiento sobre la nuez de macadamia cultivada en Colombia y particularmente sobre la especie *M. tetraphylla* mediante la caracterización física y química del aceite de esta nuez con muestras procedentes del banco de germoplasma de macadamia del Centro Nacional de Investigaciones del Café?



### 3. ANTECEDENTES

A nivel mundial la *Macadamia tetraphylla* es la segunda especie de almendra de macadamia en importancia comercial e industrial.

En cuanto a los estudios sobre la nuez de *M. tetraphylla* se encontraron los realizados por la Universidad de Lincoln, Nueva Zelanda; sobre la identificación de los parámetros que pueden influir en la estabilidad y las características de almacenamiento de cuatro variedades seleccionadas de nueces de esta especie, el rendimiento para el aceite extraído fue del 69 al 78%, se determinó la composición de ácidos grasos obteniéndose como principales el oléico (40,6 al 59%), palmitoléico y el palmítico, se detectaron tocoferoles como el  $\alpha$ -tocoferol (0.8-1.1 mg/g lípidos) y el  $\delta$ -tocoferol (3.5-4.8 mg/g de lípidos) como únicos isómeros de vitamina E, los esterolés principales identificados fueron el sitoesterol (901-1354 mg / g de lípidos),  $\Delta$ 5-avenasterol (82-207 mg / g de lípidos), campesterol (61-112 mg / g de lípidos) y estigmasterol (8-19 mg / g de lípidos). Para conocer sobre la estabilidad del aceite de Nuez de *M. tetraphylla* se evaluó el índice de peróxidos (0,56 a 3,61 meq/Kg) como indicador de la degradación del mismo, (23).

Las investigaciones sobre Macadamia a nivel Nacional son pocas, Cenicafé (Centro Nacional de Investigación del café) ha estudiado la *M. tetraphylla* debido a diversas plantaciones que hay en el eje cafetero, estos estudios se han basado en el manejo de plagas entorno al cultivo, identificación de organismos fitosanitarios, poda y fertilización, formas de reproducción asexual (injerto) y buena producción, entre otros, (21, 22).

En la revisión bibliográfica a la fecha no se encontraron reportes a nivel Nacional sobre el estudio del aceite de la nuez de *M. tetraphylla*.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Estudiar las principales propiedades físico-químicas y la estabilidad del aceite de nuez de *M. tetraphylla*, cultivada en la región cafetera.

### 4.2. Objetivos Específicos

- 4.2.1. Extraer el aceite de nuez de *M. tetraphylla* mediante el método Soxhlet.
- 4.2.2. Caracterizar física y químicamente el aceite de nuez de *M. tetraphylla*.
- 4.2.3. Evaluar la estabilidad del aceite de nuez de *M. tetraphylla* en el tiempo.
- 4.2.4. Determinar la composición de ácidos grasos del aceite de nuez de *M. tetraphylla*.
- 4.2.5. Comparar los resultados obtenidos del aceite de nuez de *M. tetraphylla* según sus propiedades físico-químicas con estudios de otras especies de esta nuez.
- 4.2.6. Proponer un uso potencial del aceite de nuez de *M. tetraphylla* según los resultados de la caracterización.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

#### 5.1.1. Origen

La macadamia originaria de Australia, fue descubierta en 1843 por Friedrich Wilhelm quien la bautizo macadamia en honor a su amigo Jhon McAdam presidente de la Sociedad Filosófica de Victoria, Australia, (24). Ha recibido las denominaciones de nuez de Queensland, nuez de Australia, nuez de Hawai y nuez de macadamia.

#### 5.1.2. Clasificación Taxonómica

DIVISIÓN	Traqueófitas
SUDIVISIÓN	Angiospermas
CLASE	Dicotiledóneas
ORDEN	Proteales
FAMILIA	Proteáceas
GÉNERO	Macadamia
ESPECIES	<i>M. integrifolia</i> , <i>M. tetraphylla</i> (25).

#### 5.1.3. Características

La Macadamia es una dicotiledónea que pertenece a la familia Proteaceae. El árbol es una planta siempre verde, ornamental, de 12 - 15 m de altura por 6 - 12 m de copa. Bajo condiciones ideales vegeta todo el año. Es una planta longeva y algunos ejemplares pueden vivir hasta 100 años.

La macadamia, tiene 10 diversas especies ya identificadas, aunque solamente dos *M. integrifolia* Maiden & Betche y *M. tetraphylla* L. Johnson, gozan de importancia comercial y económica por sus frutos comestibles. Existen diferencias significativas que ayudan a la identificación y distinción de las especies, (ver anexo 1). Crecen bien en áreas con clima apropiado para la producción de café (450-900msnm), siendo *M. integrifolia* la que mejor se adapta a las condiciones tropicales por ser más tolerante a temperaturas extremas.

Un árbol ideal debe presentar precocidad, buena productividad y calidad de las nueces, de 10 a 20 nueces por racimo y uniformidad en el tamaño de la nuez, ramas fuertes con adecuada distribución, de copa redonda o cónica fuerte y resistente al viento, resistencia a plagas y enfermedades, (3, 24, 26).

#### 5.1.4. Hojas



Figura 1. Hojas *M. integrifolia* Izquierda (3 por nudo). *M. tetraphylla* derecha (4 por nudo)

Estas son de forma espatulada, color verde oscuro brillante en el haz y opacas en el envés, de 10 a 30 cm de ancho. La *M. tetraphylla* posee cuatro hojas por nudo, los bordes son aserrados y con espinas; mientras para *M. integrifolia* se presentan tres por nudo y de márgenes lisas, (Ver figura 1).

#### 5.1.5. Flores



Figura 2. Inflorescencia de *M. integrifolia* (izquierda) y *M. tetraphylla* (derecha), (35)

Las flores de la macadamia están agrupadas en inflorescencia, en racimo colgante, de 10 a 25 cm de longitud, con 100 a 300 flores. (27, 28).

Las flores de un racimo se abren en orden, comenzando por las de la base; solo se desarrollan unos 20 frutos de los centenares de flores formadas en el racimo. En la figura 2 se aprecia la diferencia en el color de las flores de las dos especies, para *M. tetraphylla* es roja y para *M. integrifolia* es blanco cremoso, (24, 28).

### 5.1.6. Fruto



Figura 3. Frutos de Macadamia formados y en proceso de maduración, (29).

El fruto (figura 3) es un folículo más o menos esféricos de 2,5 a 5 cm de diámetro con un ápice duro y corto. El pericardio que es carnoso y verde, contiene una nuez; que en *M. tetraphylla* es ligeramente elíptica y la cascara es rugosa, a diferencia de la *M. integrifolia* donde la nuez es redonda de cascara lisa. Las nueces de color café contienen a su vez la almendra que es la parte comestible que madura 7 meses luego de la floración, (30).

### 5.1.7 Almendra



Figura 4. Almendra de Macadamia en perfectas condiciones

Los núcleos o almendras son iguales para ambas especies, estas deben ser de un color crema ligero (ver figura 4), con forma casi esférica y libre de defectos, de rancidez, de daño por insectos, de material extraño, de centros huecos, de decoloración, y de cáscara adherida. Los núcleos de más alta calidad contienen aceite del 72 al del 78% y una humedad de 1.5%, (31).

## 5.2. CONDICIONES AGROCLIMATOLÓGICAS

La macadamia prospera en zonas de bosque húmedo que reúna las siguientes características:

PARAMETRO	CARACTERISTICAS
Temperatura	Entre 18 - 29 °C
Altitud	1000 - 1500 msnm
Precipitación	Lluvias durante todo el año
Humedad Relativa	Alrededor 70 y 80 %
Luminosidad	Aprox. 5 - 8 horas / día
Vientos	No vientos fuertes, velocidad < 4 m/s
Suelos	Sueltos, drenados, fértiles, pH 5 - 6,5

Tabla 1. Condiciones del cultivo de Macadamia en la región Cafetera, (24)

## 5.3. PROPAGACIÓN

La reproducción por semillas no se recomienda por la diversidad genética en las plantas obtenidas. La propagación asexual por injerto es la más aconsejable porque se consigue uniformidad en la producción, precocidad y buena calidad de la almendra.

## 5.4. PLAGAS Y ENFERMEDADES

	PLAGAS	ENFERMEDADES
<b>RAIZ</b>		Putridión de raíz ( <i>Armillaria mellea</i> ) Llaga estrellada ( <i>Rosellinia pepo</i> )
<b>TALLO</b>		Putridión tallo ( <i>Botryodiplodia sp</i> ) Llaga Estrellada ( <i>Rosellinia pepo</i> )
<b>HOJAS</b>	Abeja Negra ( <i>Trigona spp</i> ) Hormiga Arriera ( <i>Atta spp</i> )	Quema de las hojas ( <i>Pestalotia sp</i> )
<b>FRUTO</b>	Perforadores de nuez ( <i>Cryptophlebia sp</i> ) Rata negra ( <i>Rattus rattus</i> ) Ratón doméstico ( <i>Mus musculus</i> ) Ardillas ( <i>Sciurus granatensis</i> )	Mancha de levadura ( <i>Nematospora coryli Peglion</i> ) Putridión de nuez ( <i>Fusarium sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Aspergillus sp</i> )

Tabla 2. Plagas y enfermedades del cultivo de macadamia en la región cafetera, (32).

El conocimiento de las enfermedades asociadas al cultivo de la macadamia en sus diferentes etapas de desarrollo, es un aspecto importante para su fomento ya que es bien sabido que al aumentar las áreas de cultivo de una misma especie se propician condiciones favorables para el surgimiento y aumento de problemas fitopatológicos y entomológicos; en la tabla 2 se relacionan las principales plagas y enfermedades que atacan la macadamia en la zona cafetera, (24, 32).

## **5.5. COSECHA**

Las nueces maduran y se desprenden del árbol. La recolección se realiza en el suelo una o dos veces por semana, para evitar plagas y enfermedades que reducen la calidad de la nuez. Al momento de la recolección las nueces tienen del 25 al 30 % de humedad. La cáscara o pericardio debe removerse inmediatamente y secar las nueces, 24 horas siguientes en un lugar seco y ventilado, para evitar daños, con el fin de disminuir la humedad aproximadamente al 5%, (24, 33).

Seca la nuez, se fractura y se separa de la concha. La condición de la cascara debe ser vidriosa para que al quebrarse queden separados los pedazos y no se dañe la almendra, sino queda prensada la almendra en la concha, (30).

## **5.6. ACEITES**

### **5.6.1. Definición**

Las grasas y aceites son mezclas naturales de triacilgliceroles, llamados también triglicéridos, que son ésteres de una molécula de glicerina con ácidos carboxílicos alifáticos de cadena larga (ácidos grasos). Se diferencian en que las grasas son sólidas y los aceites líquidos a temperatura ambiente, estos últimos son los más comunes y revisten mayor importancia, (34, 35, 36).

### **5.6.2. Composición Química de los Aceites**

#### **5.6.2.1. Triglicéridos**

Desde el punto de vista estructural, un triglicérido puede considerarse formado por la condensación de una molécula de glicerol con tres de ácidos grasos figura 5, para dar tres moléculas de agua y una de un triglicérido.

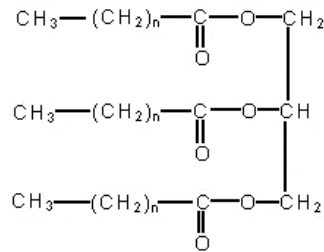


Figura 5. Estructura química de los triglicéridos.

Si los tres ácidos grasos son idénticos, se obtiene un triglicérido simple y si son diferentes uno mixto. Los ácidos grasos más importantes, que constituyen los triglicéridos, se dan en la tabla 3. La composición de las grasas y aceites se suele expresar dando las proporciones de los ácidos grasos globalmente, sin distinguir en que triglicéridos están distribuidos, (36).

NOMBRE	C	NOMBRE SISTEMÁTICO	FORMULA ESTRUCTURAL
<b>ACIDOS GRASOS SATURADOS</b>			
Láurico	12	Dodecanóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
Mirístico	14	Tetradecanóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
Palmitico	16	Hexadecanóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
Estearico	18	Octadecanóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
Araquídico	20	Icosanóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
<b>ACIDOS GRASOS INSATURADOS</b>			
Palmitoléico	16	cis-9-hexadecénico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Oléico	18	cis-9-octadecenóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Linoléico	18	cis-9-12-octadecadienóico	$\text{CH} - (\text{CH}_2)_4 - (\text{CH} = \text{CHCH})_2(\text{CH})_6\text{COOH}$
Linoléico	18	cis-9-12-15-octadecatrienóico	$\text{CH}_3 - (\text{CH} = \text{CHCH}_2)_3 - (\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Araquidónico	18	cis-5-8-11-14-icosatetraenóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4 - (\text{CH} = \text{CHCH}_2)_4 - (\text{CH}_2)_2\text{COOH}$

Tabla 3. Ácidos grasos constituyentes de los triglicéridos, (34, 37).

### 5.6.2.2. Composición de la Fracción Insaponificable

La composición de grasas y aceites es variable, y no solo dependen de la determinada especie animal y vegetal sino también de factores dietéticos y climáticos. Las grasas contienen pequeñas cantidades de vitaminas, fosfátidos (lecitinas), esteroides (colesterol o fitoesterol), colorantes (carotenos, clorofilas, xantofilas), hidrocarburos y agua, (38).



### 5.6.2.2.1. Vitamina E

La Vitamina E pertenece al grupo de vitaminas liposolubles y está conformada por un grupo de ocho vitámeros. Estos se dividen en dos grupos fundamentales cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles que se diferencian en la saturación de la cadena lateral. Se encuentra en aceites vegetales, tales como el del germen de maíz y trigo, de la semilla de algodón, de soya, de girasol, de maní y en guisantes secos como chicharos, garbanzos y lentejas entre otros; siendo el  $\alpha$ -tocoferol el isómero más activo, (40). Todos los tocoferoles derivan del 6-hidroxicromano con una cadena isoprenoide lateral, diferenciándose entre sí tan solo en los grupos de sustitución de los átomos de carbono cinco (R2), seis (R1) y ocho (R); en la figura 6 se indican las formulas estructurales de los principales tocoferoles y tocotrienoles, (41).

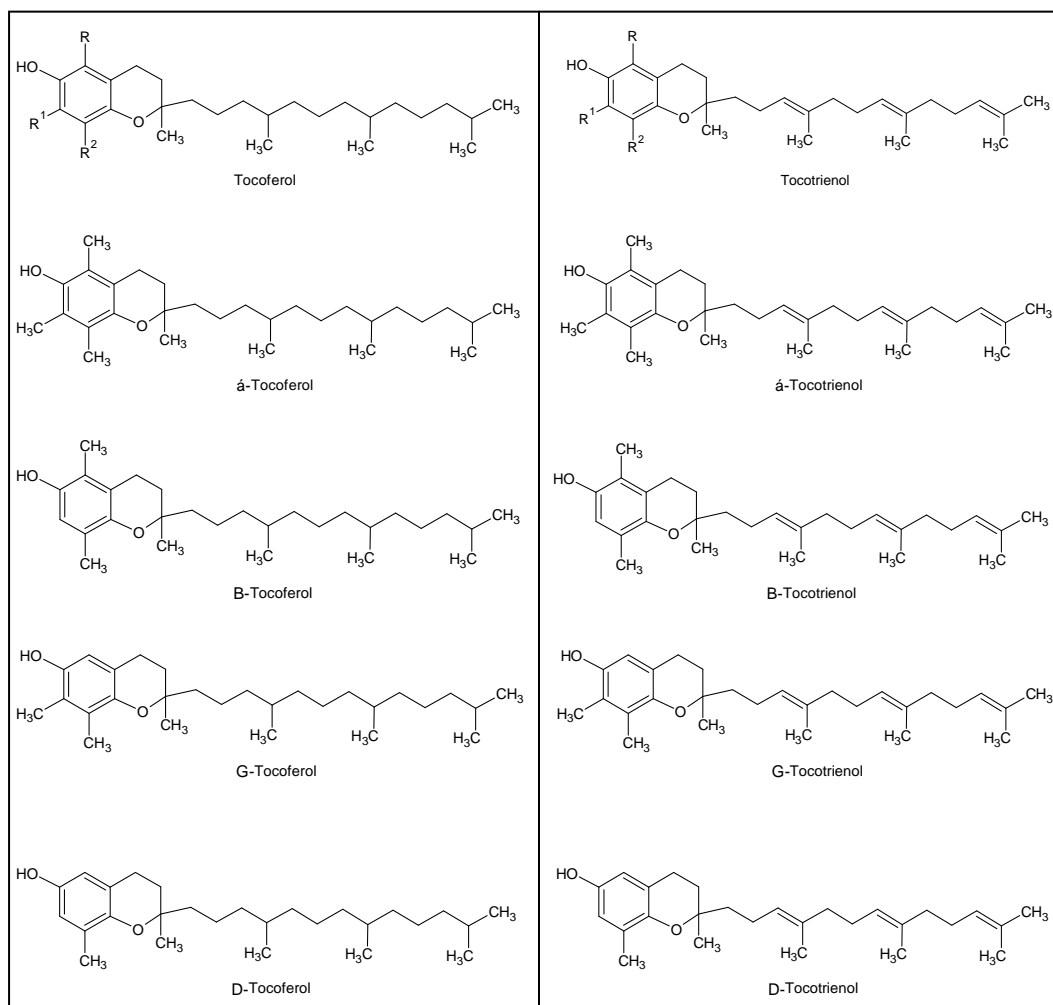


Figura 6. Estructuras químicas de los tocoferoles y tocotrienoles

#### 5.6.2.2.2. Carotenos

Pertencen a un amplio grupo de pigmentos, llamados carotenoides, muy difundidos en los reinos vegetal y animal. Los carotenoides son de color amarillo naranja a púrpura, insolubles en agua pero solubles en grasas y solventes orgánicos.

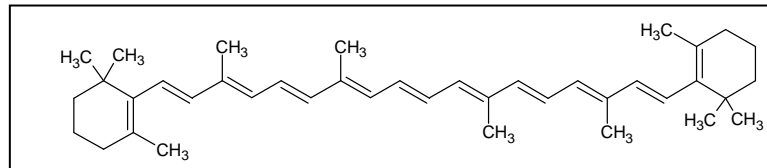


Figura 7. Estructura química del  $\beta$ -caroteno

El  $\beta$ -caroteno, ver figura 7, es uno de los principales carotenoides, tiene una fórmula química muy compleja y se aproxima mucho a la vitamina A, está contenido en importante cantidad en el aceite de palma y en la zanahoria, (41, 42).

#### 5.6.2.2.3. Esteroles

Los esteroides vegetales son alcoholes que derivan del escualeno (como el colesterol), se incluyen dos familias de compuestos, los esteroides propiamente dichos y los estanoles, que son derivados más saturados de los anteriores. Los esteroides más abundantes en los alimentos son el sitosterol, estigmasterol y campesterol (ver figura 8) y pueden encontrarse en forma libre, esterificada con ácidos grasos o como glucósidos.

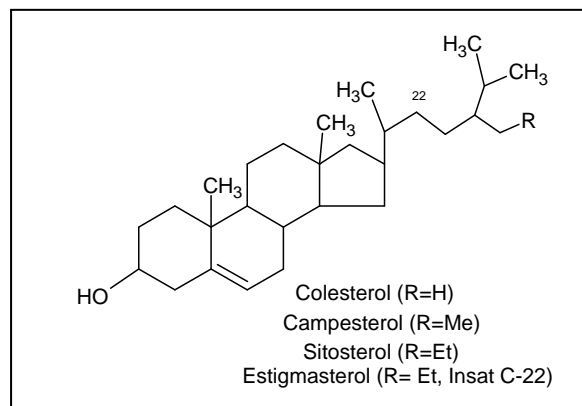


Figura 8. Estructura común de los esteroides.

Los aceites vegetales son las principales fuentes de esteroides vegetales, su contenido difiere dependiendo de variedades y también de las condiciones de cultivo; en menor proporción se encuentran también en cereales, frutos secos y

derivados. Por el contrario, frutas y hortalizas no son en general una buena fuente de estos, (43, 44).

#### 5.6.2.2.4. Fosfolípidos

Los fosfolípidos tienen estructura similar a las grasas porque son ésteres de glicerol (ver figura 9). Sin embargo, a diferencia de ellas sólo contienen dos ácidos grasos; el tercer grupo unido al glicerol es un grupo fosfato, por lo cual los fosfolípidos tienen dos partes diferentes: una cola no polar larga y una cabeza polar de fosfato sustituido. Se encuentran presentes en diferentes tejidos animales, el huevo y la semilla de soya, (41).

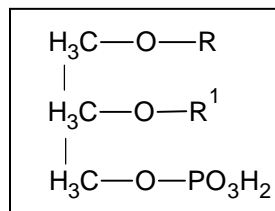


Figura 9. Estructura química de los fosfolípidos

### 5.7. OBTENCION DE ACEITE

El método Soxhlet consiste en una extracción sólido-líquido, que se utiliza generalmente para aislar los componentes lipídicos de una muestra, por medio de un solvente apolar como el Éter dietílico, el Éter de petróleo o el Hexano. Este método de extracción es directo, aplicable a alimentos en general, para la obtención de la fracción de grasa libre de la muestra para su posterior utilización, (48).

### 5.8. CARACTERIZACIÓN FÍSICA PARA ACEITE

#### 5.8.1. Densidad o Gravedad Específica

La densidad relativa se determina picnométricamente, en un aceite es la relación entre su peso y su volumen, esta constante no varía cuando está puro o fresco, pero es afectado por la edad, la rancidez y cualquier tratamiento que se le haga al aceite. La densidad depende de la temperatura y de la presión. Se determina según la norma ICONTEC 336, (45, 46).

## 5.8.2. Índice de Refracción

El Índice de refracción es una constante característica de los compuestos, que contribuyen a su identificación. La técnica instrumental utilizada es la refractometría que se fundamenta en la relación que existe entre el seno del ángulo de incidencia y el seno del ángulo de refracción de un rayo luminoso, a una longitud de onda determinada, que pasa del aire a la sustancia en análisis. Esta se mantiene a una temperatura constante y determinada. Se determina según la norma ICONTEC 286.

La temperatura a la que se reporta el valor para esta constante es a 25°C en el caso de los aceites y 40°C para las grasas sólidas, (47). Puesto que el índice de refracción aumenta a medida que disminuye la temperatura y si la lectura esta a una temperatura inferior o superior debe corregirse según la siguiente fórmula:

$$n_{D}^{25} = n' + 0,0004 (t' - 25)$$

donde:  $n_{D}^{25}$  es el índice de refracción corregido del aceite a 25°C.

$n'$  es el índice de refracción del aceite medido a la temperatura  $t$ .

$t$  es la temperatura de la medición.

## 5.9. CATACTERIZACIÓN QUÍMICA PARA ACEITE

### 5.9.1. Índice de Acidez

El Índice de Acidez representa la cantidad en miligramos de hidróxido potásico necesaria para la neutralización de los ácidos grasos libres presentes en un gramo de grasa (o de ácidos grasos) según la reacción descrita en la figura 10.

El conocimiento del contenido en ácidos grasos libres sirve como prueba de pureza y en ocasiones permite inferir acerca del tratamiento o reacciones de degradación que se hayan producido en la muestra de análisis. El resultado se puede expresar también como porcentaje de ácido oleico ( $C_{18}H_{34}O_2$ ), (48, 49). Se determina según la norma ICONTEC 218.

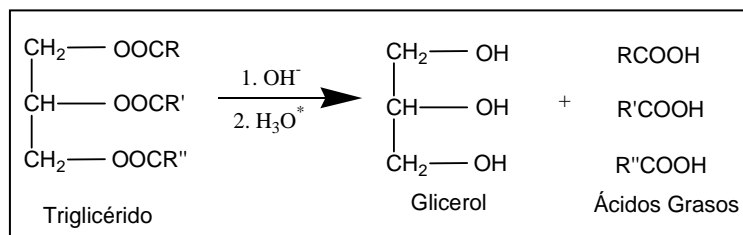


Figura 10. Reacción de Hidrólisis de un Triglicérido.

### 5.9.2. Índice de Saponificación

El Índice de Saponificación representa la cantidad de hidróxido de sodio potásico necesaria para la saponificación de un gramo de grasa, (Ver figura 11).

Es una medida de los ácidos grasos libres y combinados que existen en la grasa y es directamente proporcional a su masa molecular media. El índice de saponificación se utiliza para comprobar la pureza de las grasas y se determina según la norma ICONTEC 335, (48, 50, 51).

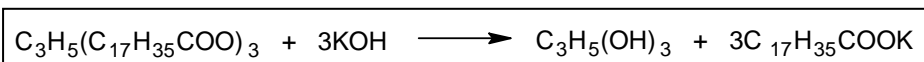


Figura 11. Reacción típica de Saponificación.

### 5.9.3. Índice de Yodo

El índice de yodo es una medida del grado de insaturación de los componentes de una grasa, será mayor cuanto más sea el número de dobles enlaces por unidad de grasa, utilizándose por ello para comprobar la pureza y la identidad de las grasas. Se determina según la norma ICONTEC 283, (48, 52).

El yodo se adiciona a los enlaces dobles de los ácidos insaturados cuantitativamente bajo condiciones controladas, según la reacción presentada en la figura 12.

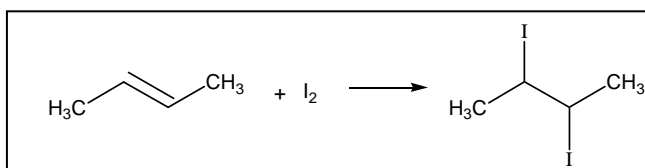


Figura 12. Reacción de la adición de yodo en las insaturaciones de una molécula.

Esta determinación es quizá el mejor método para clasificar los aceites, (50, 53). Según los valores del índice de yodo los aceites se pueden clasificar de la siguiente manera:

**5.9.3.1. Aceites Secantes** (como el de linaza y los del pescado) tienen índices de yodo muy elevados que pasan de 120. Son los que al exponerse a la acción del aire absorben el oxígeno de este y forman películas transparentes semejantes a la goma elástica.

**5.9.3.2. Aceites No Secantes** (como el de oliva, maní y almendras) tienen índices de yodo inferiores a 100. Son los que al exponerse a la acción del aire se mantienen líquidos y se espesan un poco.

**5.9.3.3. Aceites Semisecantes** (como el de algodón, ajonjolí y maíz) tienen índices de yodo intermedios, estos aceites desecan menos que los secantes y su índice de yodo está comprendido entre 100 y 120, (52, 53).

#### **5.9.4. Índice de Peróxidos**

El índice de peróxidos es una medida del oxígeno unido a las grasas en forma de peróxido. Como productos de oxidación primarios se forman especialmente hidroperóxidos, además de cantidades reducidas de otros peróxidos como consecuencia de procesos oxidativos.

Este parámetro permite cuantificar la alteración del aceite causada por la oxidación de los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados con formación de peróxidos que posteriormente se polimerizan y descomponen dando origen a aldehídos, cetonas y ácidos de menor peso molecular, la conservación del aceite es esencial ya que este proceso es acelerado en presencia de luz, calor y humedad. El enranciamiento oxidativo destruye las vitaminas liposolubles, particularmente las vitaminas A y E. Se determina según la norma ICONTEC 236, (48, 53).

### **5.10. TÉCNICAS DE ANÁLISIS COMPOSICIONAL**

#### **5.10.1. Cromatografía de Gases acoplada a Espectroscopía de Masas, (CG/EM)**

La cromatografía de gases es un método físico basado en la distribución de la muestra en dos fases (móvil y estacionaria), y permite la separación de compuestos orgánicos e inorgánicos térmicamente estables y volátiles, este tipo de separación se basa en las diferencias en los puntos de ebullición y la temperatura de la columna. En esta técnica la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de un gas inerte, donde este no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportarlo a través de la columna, (58).

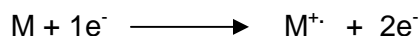
La fase estacionaria es de extensa superficie empacada apretadamente dentro de la columna. Y la fase móvil es un gas inerte que percola alrededor de la fase estacionaria. Existen dos tipos de cromatografía de gases:

- Cromatografía gas-sólido donde se produce la retención del analito en una fase estacionaria sólida como consecuencia de la adsorción física. Los adsorbentes tales como carbón vegetal, gel de sílice y tamices moleculares, es la fase estacionaria en la CG de fase sólida.
- Cromatografía gas-líquido se basa en la distribución del analito en una delgada película líquida sobre la superficie de un sólido inerte, (55).

La asociación de la Cromatografía de Gases con la Espectrometría de Masas permite la separación e identificación de mezclas complejas. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles. Una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elusión sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas, (80, 81)

En la CG acoplada a EM las moléculas del analito luego de ser ionizadas son atraídas o repelidas por un apropiado campo magnético o eléctrico. Existen numerosas técnicas de ionización, pero el impacto electrónico es el más antiguo, común y simple. La fuente de ionización es calentada y bajo vacío la mayoría de las muestras son fácilmente vaporizadas e ionizadas.

Los electrones de alta energía golpean la molécula del analito, causando la ionización y fragmentación. Esto produce en su mayoría iones positivos:



Con ello se forma un ion radical molecular positivo ( $M^{\cdot+}$ ) que corresponde a la masa molecular relativa del compuesto. Adicionalmente el ion molecular  $M^{\cdot+}$ , produce la ruptura de otros enlaces con formación simultánea de *fragmentos iónicos* cargados positivamente, lo cual hace posible determinar la presencia de grupos funcionales especiales o de unidades estructurales por la aparición de fragmentos característicos.

Los analizadores de masa típicos para CG/EM son cuadrupolos, que consiste en cuatro varas hiperbólicas perpendiculares a cada una y las especies iónicas producidas, son separadas por su razón masa-carga ( $m/z$ ) por cualquiera de los dos campos magnéticos o eléctricos del analizador.

El espectro de masa es simplemente un plano de la abundancia de los iones en función del  $m/z$ . Bajo condiciones controladas, las razones de abundancia y  $m/z$  específico que presentan las especies son únicas para cada compuesto. Estos iones pueden ser utilizados para determinar el peso molecular y la estructura química de cada compuesto.

La presentación de datos puede ser de dos maneras; como un total análisis (Scan, TIC-Total ion current) o como un número pequeño individual de iones (SIM-Selected ion monitoring) característicos de un compuesto. Un cromatograma de ion total es usado para identificar compuestos desconocidos, un rango específico de masas es escaneado y todos los picos son reportados, así que los espectros de masas pueden ser usados para identificar cada pico. En SIM (Selected ion monitoring) solo un pequeño número de iones (habitualmente 6) son monitoreados, la cuantificación es mejor y la sensibilidad aumenta considerablemente. SIM no puede usarse para análisis cualitativo (no todas las masas son escaneadas), pero es el mejor modo para el análisis de compuestos designados, (55, 79, 80, 81).

### **5.10.2. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)**

En la cromatografía líquida de alta eficiencia, los componentes de una mezcla son llevados través de una fase estacionaria fijada dentro de una columna mediante el flujo de una fase móvil líquida; la elución de la muestra puede ser por Elución isocrática: en la cual solo hay un solo disolvente de composición constante o por Elución con gradiente: que consiste en un cambio gradual de la composición de la fase móvil durante la separación. Se mezclan proporciones cada vez mayores de un segundo o tercer solvente con mayor fuerza de elución. Los disolventes tienen una polaridad significativamente diferente. La variación de estos está programada. Dichas separaciones están basadas en las diferencias de la velocidad de migración entre los componentes de la muestra, que vienen condicionadas por la naturaleza del analito y su interacción con las fases, (82).

Existen diferentes tipos de cromatografía líquida que se clasifican atendiendo a la interacción que se produce entre la fase estacionaria y el soluto. Según esta clasificación se denominan cromatografías de fase normal, de fase reversa, de intercambio iónico, de exclusión molecular y de afinidad, (57, 58).

#### **5.10.2.1. Columnas**

El diámetro interno de una columna de HPLC es un aspecto crítico que determina la cantidad de muestra que se puede cargar a la columna y también influye en su sensibilidad.

##### **5.10.2.1.1. Fase Normal**

Se caracteriza por separar los compuestos en base a su polaridad. Esta técnica utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil apolar, y se utiliza cuando el



compuesto de interés es bastante polar. El compuesto polar se asocia y es retenido por la fase estacionaria. Las fases estacionarias son normalmente sílice o alumina. La polaridad del disolvente es el principal factor que determina los volúmenes de elución. Con disolventes más polares los solutos se mueven más rápidamente y eluyen en menor tiempo.

#### **5.10.2.1.2. Fase Reversa**

La fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. La fase sólida más común es la formada por grupos no polares unidos a la sílice (-CH<sub>3</sub>, -C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>, -C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>); un ejemplo bien conocido es la cadena de 18 carbonos.

En las separaciones de fase reversa los picos tienden a ser agudos, simétricos y el equilibrio en las reacciones adsorción/desorción tiende a ser rápido, (57, 58).

#### **5.10.2.2. Detectores**

La eficiencia del detector cromatográfico depende de la relación entre la cantidad física medida y la composición del eluyente, así como también de las características de la señal de transferencia, (57, 58, 82) Los detectores más utilizados en HPLC son:

- Detector UV. Hay básicamente tres tipos: Detector de Longitud de Onda Fija, Detector de Longitud de Onda Variable, Detector de Arreglo de Diodos.
- Detector de Índice de Refracción. Existen muchos diseños, pero solamente hay dos tipos: Tipo Deflexión y Tipo Fresnel
- Detector de Fluorescencia. Este detector solamente puede detectar compuestos que tengan fluorescencia nativa o inducida por derivatización.
- Detector de fluorescencia inducida por láser según la fuente de excitación o según el sistema óptico.
- Detectores Electroquímicos. Pueden ser clasificados en tres tipos: Detector Amperométrico, Detector Conductimétrico, Detector Potenciométrico.

## **5.11. OLEOQUÍMICA**

Es una rama de la industria química encargada de estudiar la composición química de los aceites y la utilidad de sus derivados que podrían reemplazar los productos petroquímicos. La Oleoquímica está relacionada con todas las transformaciones químicas de grasas y aceites vegetales o animales para la producción de sustancias como ácidos grasos, esteroides y glicerol, las cuales revisten importancia en la elaboración de jabones, shampoo, detergentes, cosméticos, entre otros, (59).

La cadena de las oleaginosas posee una amplia variedad de productos que van desde la producción agrícola hasta la agroindustrial, y cuenta con insumos vegetales y animales como materia prima. La producción de aceites y grasas tiene como fuentes: material vegetal oleaginoso (frutos, semillas, nueces), entre ellos, ajonjolí, soya, oliva, nueces y almendras entre otros, y material animal (piel, músculos, órganos) de bovinos, porcinos, peces. Las plantas oleaginosas se cultivan tanto en climas templados como en los tropicales, y cada planta produce su composición característica de ácidos grasos, que varía de acuerdo a condiciones geográficas (latitud, clima, altitud y el suelo).

Esta industria es de gran utilidad en la alimentación humana para preparar comestibles como aceites y grasas utilizados en confitería, repostería y preparación de bebidas alimenticias y refrescantes, en el renglón industrial con la fabricación de jabones, cosméticos, lubricantes y pinturas, en la farmacología con la preparación de medicamentos, en la alimentación animal a partir de las tortas, salvados, afrechos y otros subproductos para la elaboración de concentrados.

En Colombia la industria se halla en una etapa incipiente, con pocas firmas desarrollando oleoquímicos básicos (ácidos grasos, sales, esteroides grasos y amidas). La mayoría de industrias nacionales como: farmacéutica, química, cosmética, y jabonera, utilizan oleoquímicos intermedios que no se producen en el país y son importados. La producción nacional de detergentes, dentríficos y shampoo, equivalen al 38% de bienes finales, por ello demandan oleoquímicos y ven en esta industria alternativas viables, que suplen sus necesidades, gracias al desarrollo que ha venido presentando, (59, 60).

### **5.11.1. Aceites en la industria Alimenticia**

El concepto tradicional de que para el mantenimiento de una salud óptima la dieta diaria debe proveer cantidades adecuadas de nutrientes esenciales ha cambiado en los últimos años, por la evidencia cada vez más fuerte de que como una mezcla compleja de sustancias químicas, los alimentos contienen también sustancias fisiológicamente activas que cumplen, al igual que los nutrientes esenciales, una

función de beneficio; contribuyendo a reducir la incidencia de ciertas enfermedades crónicas y por tanto son necesarias para una vida saludable.

El empleo culinario de aceites mejora la degustación de los alimentos y hace mucho más apetecible y sabrosa la comida. Además, desde el punto de vista nutritivo, los aceites enriquecen los alimentos con nutrientes como la vitamina E y grasas simples formadas por diferentes tipos de ácidos grasos.

Las grasas y aceites contribuyen al transporte y absorción de vitaminas liposolubles o solubles en grasa (A, D, E, K) en el organismo. Por tanto, a pesar de ser los alimentos más calóricos, son básicos y de gran importancia que deben estar presentes cada día en la alimentación, eso sí, en las cantidades adecuadas, sin exceso.

#### **5.11.1.1. Nutracéuticos**

Especialistas en nutrición humana, ciencia, tecnología de alimentos y mercadotecnia, investigan activamente esta nueva área y se encuentran formulando nuevos productos que permitan un futuro más saludable para la humanidad, (62).

Los lípidos, son nutrientes importantes en la dieta humana por su aporte de ácidos grasos y aspectos nutraceuticos, los compuestos fitoquímicos presentes en los lípidos vegetales se destacan por su importancia nutricional y nutraceutico entre, debido a la presencia de compuestos como isoprenoides (terpenos), esteroides (fitoesteroles y fitoesteroles), isoprenoides mixtos (tocoferoles y tocotrienoles), ácidos grasos esenciales y ácidos fenólicos, (18, 22).

Recientes trabajos de investigación científica han permitido clasificar a los "fitonutrientes" en grupos de acuerdo a las funciones de protección biológica que ejercen, sus características físicas y químicas. Estos fitoquímicos están presentes en alimentos funcionales, que en la dieta además de exhibir propiedades nutritivas poseen efectos terapéuticos, (63).

Recientemente la biotecnología molecular ha reportado estudios, que han hecho factible diseñar aceites vegetales con aplicaciones novedosas en los alimentos o como agentes nutraceuticos. Esto mediante la transformación genética de las plantas aumentando y/o introduciendo ácidos grasos. Investigaciones conjuntas han propuesto las bases para intentar cambiar el perfil de tocoferoles, con el objetivo de aumentar los niveles de vitamina E en los cultivos de importancia agronómica, lo que mejoraría de manera simultánea el valor nutricional y nutraceutico, (64, 65).

### **5.11.2. Aceites en la industria Cosmética**

Desde fines del siglo XX, la consagración de la cosmética es un hecho innegable por la protección que aporta para controlar el envejecimiento cutáneo, la higiene y el embellecimiento de la imagen personal, (69, 70).

#### **5.11.2.1 Cosméticos**

Las compañías productoras de cosméticos, han descubierto mejores propiedades para la piel en los aceites vegetales, lo que ha ocasionado este gran auge que está viviendo la cosmética, ha conllevado a una gran evolución desde el punto de vista científico tanto a nivel de los productos como de las materias primas oleaginosas.

La importancia de los aceites radica en el efecto que ejercen estos ingredientes biológicamente activos sobre la función barrera y la salud de la piel. Su capacidad de penetrar en la piel depende de su concentración en la formulación, de que pueda mantener la integridad del principio activo, transportarlo en una forma biológicamente activa a la piel, alcanzar el sitio objetivo en una cantidad suficiente para ejercer el efecto y liberarse de su forma adecuada del vehículo que lo transporta, (71).

Los aceites más utilizados en la producción de preparaciones cosméticas habitualmente son:

- Aceites de origen exótico, de frutos como coco y kukui.
- Aceites de frutos: aguacate, albaricoque, oliva, grosella negra o uva.
- Aceites de frutos secos: almendras, avellana, nueces, nuez macadamia.
- Aceites de semillas, como de calabaza, girasol, kiwi, lino, maíz, trigo, (72)

Esta gama de materias primas de aceites vegetales y otros aceites se utilizan directamente en productos cosméticos como bases y emolientes aceitosos, (73).

Los aceites vegetales son una fuente cruda de fosfáticas, tocoferoles, fitoesteroles y otros ingredientes de interés cosmético. El aceite de sésamo, el de oliva, entre otros aceites son absolutamente únicos por su alto contenido de los ácidos grasos insaturados beneficiosos al estrato corneo de la piel.

El mercado de los aceites vegetales no es solo para uso cosmético sino también cosmeceútico y nutracéutico es ahora muy prometedor debido a la situación global favorable, y a la demanda creciente para los productos oleoquímicos de fabricantes locales y a una tendencia a un proceso más complejo de materias primas, (74).

### **5.11.2.2 Cosmecéuticos**

Los cosmecéuticos o los productos cosméticos que aseguran tener ingredientes “biológicamente activos” se están utilizando de manera creciente en lugar de los procedimientos médicos. El fenómeno de los cosmecéuticos ha tenido un profundo impacto en la industria y en la práctica de la dermatología. En todos los escenarios, los comerciantes experimentados intentan ofrecer una orientación científica para promover estos productos, (71).

Los fitoquímicos presentes en alimentos funcionales de origen vegetal son altamente apreciados y de especial interés en la industria cosmética para la obtención de productos inocuos y efectivos para el tratamiento de diversas enfermedades, ya que exhiben beneficios para el tratamiento de infecciones bacterianas, fúngicas y enfermedades degenerativas como diabetes y cáncer, (63).

Existen diferentes productos cosmecéuticos en el mercado con ingredientes básicos, como vitaminas, antioxidantes, proteínas, hidrantes, entre otros, (24). Aspectos como la concentración de los ingredientes activos, las formulaciones específicas y la adecuada penetración en los puntos donde deben actuar son esenciales y sin embargo varían sustancialmente entre preparaciones.

La parte más importante de cualquier cosmecéutico es el vehículo que transporta el principio activo y son específicamente los aceites utilizados para este objetivo, debido a su naturaleza lipofílica ya que los ácidos grasos son componentes importantes de las membranas celulares y dan permeabilidad, estabilidad y función barrera a la piel, (75, 76).

La tendencia global de la industria cosmética hacia desarrollar medicinalmente cosméticos activos, y productos medicinales orientados como parte de un actual estilo de vida va en aumento. La biotecnología también competirá directamente con los negocios de los productos farmacéuticos y cosmecéuticos. El ángulo más influyente durante los 5 años que vienen será los acoplamientos entre la salud, la belleza, y antienviejecedores. La tendencia grande siguiente de la belleza incluirá empañar los límites entre la cirugía y los cosméticos, (77, 78).

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. MUESTRA DE ANÁLISIS

Se utilizaron nueces de *M. tetraphylla* recolectadas de los doce árboles que hacen parte del Banco de Germoplasma de CENICAFE, localizado en la finca la Catalina (Risaralda). Las cuales fueron trasladadas hasta el laboratorio de Oleoquímica de la Universidad Tecnológica de Pereira para su respectivo análisis.

### 6.2. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Se recolectaron 5 Kg de nuez de *M. tetraphylla*, las cuales se seleccionaron por flotación y se secaron durante tres días a 52 °C en una estufa BINDER. Posteriormente las semillas fueron separadas de la cascara y se llevó a cabo un lavado con jabón tigo; se seleccionaron de nuevo por flotación para así realizar un secado en la estufa a 74 °C por ocho horas. Una vez desecadas, las almendras fueron molidas y almacenadas en frío para la posterior extracción del aceite.

### 6.3. EXTRACCIÓN Y ALMACENAMIENTO DEL ACEITE DE NUEZ DE *M. tetraphylla*.

La extracción del aceite de *M. tetraphylla* se realizó por el método soxhlet, extracción sólido-líquido empleando como solvente n-hexano en una relación muestra: solvente (1:10). Este proceso se realizó por un periodo de cuatro horas, cambiando el solvente cada dos horas. El extracto orgánico, se concentró por rota-evaporación y el aceite obtenido se almacenó en frascos ámbar para evitar su rápida degradación a causa de la luz ultravioleta y a temperatura ambiente, para su posterior análisis.

### 6.4. CARACTERIZACIÓN FÍSICA DEL ACEITE DE NUEZ DE *M. tetraphylla*.

#### 6.4.1. Determinación del Índice de Refracción.

Se realizó por medio de un refractómetro a temperatura ambiente, según la metodología propuesta en la norma ICONTEC 268, (25).

#### 6.4.2. Determinación de Densidad

Se realizó según la metodología propuesta en la norma ICONTEC 432, (23).

## **6.5. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ACEITE DE NUEZ DE *M. tetraphylla*.**

### **6.5.1. Determinación del Índice de Saponificación.**

Se realizó según la metodología propuesta en la norma ICONTEC 235-2, (29), reportando los resultados de KOH requeridos para saponificar un gramo de aceite.

### **6.5.2. Determinación del Índice de Yodo.**

Se realizó según la metodología propuesta en la norma ICONTEC 283, (30), reportando los resultados de yodo por gramo de muestra.

### **6.5.3. Determinación del Índice de Peróxidos.**

Se determinó según la metodología propuesta en la norma ICONTEC 236, (29), expresando los resultados en miliequivalentes de oxígeno por kilogramos de grasa.

### **6.5.4. Determinación del Índice de Acidez**

Se determinó según la metodología propuesta en la norma ICONTEC 218, (33).

## **6.6. ANÁLISIS COMPOSICIONAL DEL ACEITE DE NUEZ DE *M. tetraphylla*.**

### **6.6.1. Composición de Ácidos Grasos del Aceite de nuez de *M. tetraphylla* por CG-EM**

Se realizó el análisis composicional de los derivados metilados del aceite (en el anexo 2 se describe el procedimiento de derivatización de metilésteres utilizado de acuerdo a anteriores investigaciones), por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, empleando un estándar comercial de mezcla de metilésteres de Ácidos Grasos marca RESTEK Catálogo 35068 (Ver Anexo 3) de acuerdo a estudios anteriores. El análisis se llevó a cabo en un equipo Shimadzu (GCMS-QP2010), las condiciones de análisis fueron las siguientes:

Columna Capilar: Restek Famewax (Crossbond-PEG) (Fase Polar, Etilenglicol)  
30 metros, 0.32mm, 0.25um  
Catalogo: 12498 Serial: 814877

Programación de Temperatura: Temperatura inicial de 80 °C / 4 minutos.  
Luego se incrementa hasta 240 °C con  
una rata de 3 °C / minuto.

Inyector: Automático AOC-20i Autoinyector Shimadzu.  
Temperatura Inyección: 225 °C.  
Modo Inyección: con división de flujo (Split).

Gas Portador: Helio  
Flujo Total: 98.40 mL/min  
Presión: 10.00 kPa

Detector: Espectrómetro de Masa (MS-QP2010)  
Temperatura: 250 °C  
Potencial de Ionización: 70 eV.  
Modo ionización: Impacto Electrónico.

#### **6.6.2. Determinación del contenido de Vitamina E del aceite de nuez de *M. tetraphylla* por HPLC.**

Se realizó el análisis de los tocoferoles y tocotrienoles presentes en el aceite fresco mediante el análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), empleando un detector de fluorescencia (FL) y una columna Merck, Chromolith RP-18e (4.6 x 100 mm). La determinación se basó en la metodología descrita por Pascal et al, 2004 con modificaciones realizadas en CENIPALMA por el Laboratorio de análisis y caracterización de Aceites. Para la cuantificación de tocoferoles y tocotrienoles se empleó el método de estándar externo, utilizando patrones certificados de CALBIOCHEM (Tocotrienol Set Cat. No.613432) y CALBIOCHEM (Tocopherol Set Cat. No.613424).

Fase móvil: metanol – agua (80:20) aumentando en un tiempo de 17 minutos a 100% metanol con un flujo de 2,5 mL/min. La detección se realizó a una longitud de onda de 323 nm.

#### **6.7. SEGUIMIENTO DE ESTABILIDAD DEL ACEITE DE NUEZ DE *M. tetraphylla*.**

Se llevó a cabo mediante el análisis periódico del índice de acidez y de peróxidos del aceite obtenido. En un periodo de dos meses evaluando los parámetros cada ocho días.

#### **6.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Se realizó un análisis descriptivo o análisis de varianza simple, y cada procedimiento se hizo por triplicado, empleando Excel Office 1997-2003 como software para el tratamiento de los datos.



## 7. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 7.1. ESTADO ACTUAL DEL CULTIVO DE *M. tetraphylla*.

El centro de investigaciones de CENICAFE, cuenta con el Banco de Germoplasma localizado en la subestación la Catalina en el departamento del Risaralda, las condiciones climáticas se describen en el anexo 4. El banco está conformado actualmente con doce árboles por especie (*intergrifolia* y *tetraphylla*) sembrados en dos hectáreas intercalados con café, como se observa en la figura 13.



Figura 13. Árboles de *M. tetraphylla* en la subestación la Catalina

Como se aprecia en las figura 13, al momento de la toma de muestras los árboles estaban sin control de malezas y plagas; la última poda y fertilización realizada se llevó a cabo hace tres años; la recolección de las nueces no se realiza periódicamente lo que ocasiona la presencia de diferentes patógenos, como perforadores de nueces.

Por otra parte el tronco y las hojas del cultivo presentaban problemas fitopatológicos como se observa en la figura 14, las plagas y enfermedades están afectando también el fruto del árbol ver figura 15. Todos estos factores incidieron en la calidad de las nueces.



Figura 14. Enfermedades fitopatológicas de las hojas y el tallo del árbol de nuez de *M. tetraphylla*.



Figura 15. Ataque de perforadores a la nuez de *M. tetraphylla* del Banco de Germoplasma.

Es de notar que los ataques producidos por las plagas a las nueces son problemas comunes en los cultivos tropicales; algunos de los patógenos existentes en el trópico han encontrado en la Macadamia un nuevo hospedero susceptible, estas razones hacen que se requiera de ciertos cuidados fitosanitarios para prevenir o combatir las enfermedades y plagas que lo atacan, (83). Sin embargo para el estudio se utilizaron nueces que no presentaron daño alguno ver figura 16, según el proceso de selección y limpieza descrito en la metodología.



Figura 16. Almendras de nuez *M. tetraphylla* Fresca.

## 7.2. “BALANCE DE MATERIA” DE LAS ALMENDRAS ANALIZADAS DEL CULTIVO DE NUEZ *M. tetraphylla*

En las figuras 17 y 18, se esquematizan todos los procesos de selección realizados a la nuez de *M. tetraphylla*, con el fin de establecer un balance de materia, desde las nueces recolectadas hasta las almendras que se emplearon para la extracción del aceite. El 9,92% de las muestras colectadas se desecharon como nueces huecas; las nueces en buen estado tenían un contenido de humedad aproximado del 22,82%. De toda la materia prima el 26,06% son almendras y solo el 15,26% son almendras en base seca de primera calidad.

El porcentaje de almendras malas representa el 6,05%, lo cual indica que a pesar de la preselección de las nueces por apariencia la incidencia del mal manejo del cultivo afecta hasta la almendra. El mayor porcentaje (50,54%) de materia prima la representa el cuesco, indicando esto que es un subproducto de gran importancia en este proceso y poniendo en evidencia por el proceso de selección realizado porque la macadamia se estima como la nuez más costosa a nivel mundial.

Por la etapa de lluvia en el momento de recolectar la materia prima no se pudo determinar el porcentaje de pericarpio que contiene la nuez de *Macadamia tetraphylla*, pero otros estudios demuestran que está alrededor de un 50%, por lo que constituye el principal desecho de la misma.

Los resultados obtenidos en el balance son semejantes a los reportados por otros estudios, con porcentajes de 53,4% para pericarpio, 2,3% de nuez en concha mala, la concha representa el 67,4 % del peso total de la nuez, un 25,5% corresponde a la almendra de primera calidad, el 4,3% a la almendra de segunda calidad y el 2,9% a la almendra tercera calidad; y estos son hasta ahora los mejores registros para el proceso, pero se debe tener en cuenta que la materia prima con la cual se trabajó provenía de un Banco de Germoplasma sin fines comerciales, que aunque presenta problemas fitosanitarios y entomológicos se tiene la certeza del material genético que no se tiene en un cultivo comercial.

Los productores comerciales han prestado gran interés por optimizar el proceso y obtener la menor pérdida de la materia prima.; teniendo en cuenta que de acuerdo al cultivar y la época de la cosecha cada valor puede variar. Acorde a lo consignado en la figura 18, es de notar que existen diferencias significativas en el porcentaje de las almendras de primera calidad obtenidas en el proceso, debido al mal estado del cultivo de *M. tetraphylla* en la subestación La Catalina, (83, 84).



Figura 17. Partes de la Nuez de *M. tetraphylla*.

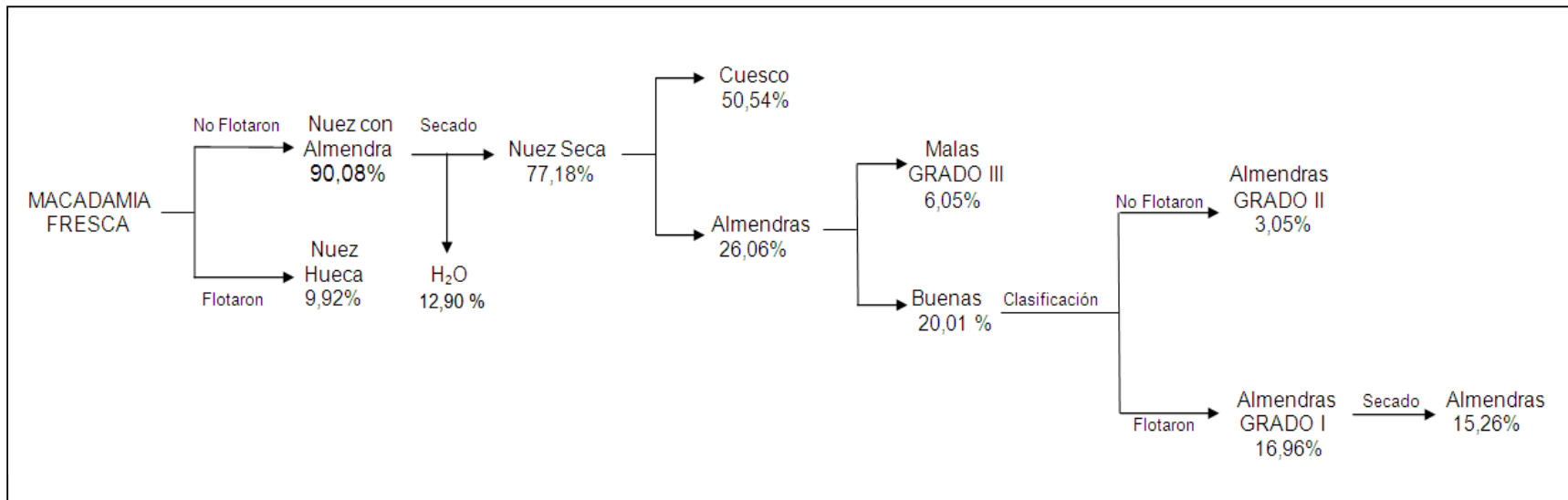


Figura 18. Balance del proceso de selección de las almendras de *M. tetraphylla* en el Laboratorio.

Internacionalmente en lugares como Costa Rica y Hawai se han desarrollado investigaciones para aprovechar el pericarpio de la Macadamia, demostrando su potencial uso como desecho en fertilizantes, compost y algunas combinaciones con materia orgánica para el mismo cultivo, y así mejorar el suelo, la capacidad de retención de agua, nutrientes y sistema radicular del árbol hasta incluso para usarse en el vivero, (85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95). El cuesco o conchas de nuez de Macadamia son especialmente buena materia prima para la producción de carbón a presiones elevadas, igualmente para la producción de biomasa, (93). Sin embargo la mayor novedad de la utilización del cuesco de macadamia está dada por la preparación de carbones activados, (94, 95).

Todas las aplicaciones mencionadas anteriormente y el alto porcentaje de desecho que se obtiene en el procesamiento de la Nuez de Macadamia, inducen el gran uso de la Macadamia como una cadena agroindustrial.

### 7.3. CONTENIDO DE HUMEDAD DE LAS NUECES DE *M. tetraphylla*.

Humedad Almendra	
Ensayo	%
1	2,920
2	2,770
3	2,890
<b>Promedio</b>	2,860
<b>Lim. Superior</b>	2,920
<b>Lim. Inferior</b>	2,770
<b>Desviación Estándar</b>	0,079

Tabla 4. Contenido de Humedad de las nueces de *M. tetraphylla*.

En la tabla 4, se observan los datos obtenidos para el contenido de humedad de las nueces de *M. tetraphylla*, con un promedio de 2,86%, este valor está dentro de los parámetros recomendados por otros autores, quienes indican una humedad inferior al 5%, para impedir la degradación oxidativa de las almendras, (85, 96).

### 7.4. PORCENTAJE DE ACEITE DE LAS NUECES *M. tetraphylla*

Los porcentajes de rendimiento obtenidos en la extracción por método soxhlet y extracción en frío (agitación magnética) se comparan en la tabla 5. El promedio del aceite extraído por soxhlet fue de 53,87 %, mientras que el extraído por método frío fue de 50,65 % en el que además se observó una cantidad apreciable de partículas en suspensión lo que implicó una filtración posterior, según las desviaciones estándar obtenidas, los valores son aceptables y reproducibles.

Contenido de Aceite (%)		
Ensayo	Extracción en Caliente	Extracción en Frio
1	54,57	50,31
2	53,35	50,98
3	53,69	49,62
<b>Promedio</b>	53,87	50,65
<b>Lim. Superior</b>	54,57	50,98
<b>Lim. Inferior</b>	53,35	49,62
<b>Desviación Estándar</b>	0,6296	0,4738

Tabla 5. Porcentaje de aceite extraído de las nueces de *M. tetraphylla* por dos métodos.

Estudios en los cuales los métodos, tiempos y solventes utilizados en la extracción del aceite difieren de los empleados en este trabajo, reportan porcentajes para *M. tetraphylla* entre el 69 al 78 % y para *M. integrifolia* de 74,25 al 79,8 %, indicando mejores rendimientos con las metodologías utilizadas, (23, 97, 98, 99, 100); por tanto se requieren otros estudios en los cuales se empleen las mismas condiciones de extracción para así realizar una mejor comparación. Cabe resaltar que lo que buscaba el presente estudio era obtener aceite para su caracterización, y no realizar una extracción exhaustiva a la nuez de *M. tetraphylla*, (31).

#### 7.4.1. Descripción del aceite de nuez de *M. tetraphylla*.

El aceite extraído (figura 19), fué de color amarillo muy claro, de olor dulce agradable y sin cuerpos extraños en suspensión.



Figura 19. Aceite de nuez de *M. tetraphylla* recién extraído.

## 7.5. CARACTERIZACIÓN FÍSICA DEL ACEITE DE NUEZ DE *M. tetraphylla*.

### 7.5.1. Índice de Refracción

Como se aprecia en la tabla 6, el índice de refracción encontrado para el aceite recién extraído de *M. tetraphylla* fue de 1,4607 a 25°C, con una desviación estandar de 0,0003 indicando reproducibilidad y confiabilidad de los datos. El valor corregido a 20°C es de 1,4625 que se encuentra dentro de las especificaciones técnicas para el aceite de nuez de *M. intergrifolia* virgen y refinado establecidas por olvea, (ver anexo 5),

Índice de Refracción a 25 °C	
Ensayo	n <sub>D</sub>
1	1,4610
2	1,4605
3	1,4605
<b>Promedio</b>	1,4607
<b>Lim. Superior</b>	1,4610
<b>Lim. Inferior</b>	1,4605
<b>Desviación Estándar</b>	0,0003

Tabla 6. Índice de Refracción del Aceite fresco de *M. tetraphylla* extraído por soxhlet.

Por otra parte el índice de refracción obtenido para *M. tetraphylla* guardó una similitud con respecto a los aceites como: *M. intergrifolia*, que varía entre 1.4657 a 1.4681, (101), Nuez de nogal (*Juglans Regia*) 1.4670 – 1.4690 (102), y el de semillas de uva 1,460 y 1,466 (103).

### 7.5.2. Densidad

Densidad (g/mL)	
Ensayo	Δ
1	0,9079
2	0,9080
3	0,9081
<b>Promedio</b>	0,9080
<b>Lim. Superior</b>	0,9081
<b>Lim. Inferior</b>	0,9079
<b>Desviación Estándar</b>	0,0001

Tabla 7. Densidad del Aceite recién extraído por soxhlet de las nueces de *M. tetraphylla*.

Para el aceite fresco se encontró una densidad promedio de 0.9080 g/mL, con una desviación estándar de 0,0001 que demuestra la repetibilidad de los datos (Tabla 7).

No hay reporte sobre este parámetro para la especie *M. tetraphylla*, pero el valor hallado es similar al establecido para aceite de *M. integrifolia* (0.911-0.918 g/cm<sup>3</sup>) (Ver anexo 5), y se asemeja con la densidad reportada para el aceite de oliva 0.9090 g/mL, (104, 111).

## 7.6. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ACEITE DE *M. tetraphylla*.

### 7.6.1. Índice de Saponificación

El índice de saponificación encontrado para el aceite de *M. tetraphylla* (Ver Tabla 8) presentó valores entre 182,5 a 182,7 mg KOH/g con una desviación estándar de 0,0868 y un promedio de 182,6 mg KOH/g; este valor difiere al reportado para el aceite de *M. integrifolia* 197.3 mg KOH/g pero semejante al del aceite de nuez de Nogal (*Juglans Regia*) 189.8 – 191.7 mg KOH/g (101, 102).

Ensayo	Índice de Saponificación (mg KOH/g)
1	182,7
2	182,5
3	182,6
<b>Promedio</b>	182,6
<b>Lim. Superior</b>	182,7
<b>Lim. Inferior</b>	182,5
<b>Desviación Estándar</b>	0,0868

Tabla 8. Índice de Saponificación del aceite de la nuez de *M. tetraphylla* extraído por soxhlet.

La determinación de este parámetro permite establecer que el aceite de especie *tetraphylla* tiene una gran proporción de ácidos grasos de cadena corta, propiedad característica de aceites como el de oliva (184 – 196 mg KOH/g) al igual que aceites de otras oleaginosas como el algodón, ajonjolí, girasol y maní, (ver anexo 6).

### 7.6.2. Índice de Yodo

De acuerdo con los resultados relacionados en la Tabla 9, el índice de yodo promedio para el aceite de *M. tetraphylla* recién extraído fue de 52.4307 cg/g. La desviación estándar para los datos fue de 0,7426 indicando reproducibilidad en los datos.



Ensayo	Índice de Yodo (cg/g)
1	52,6983
2	51,5914
3	53,0025
<b>Promedio</b>	52,4307
<b>Lim. Superior</b>	53,0025
<b>Lim. Inferior</b>	51,5914
<b>Desviación Estándar</b>	0,7426

Tabla 9. Índice de Yodo del Aceite de *M. tetraphylla* extraído por soxhlet.

Con base a la clasificación de los aceites según este parámetro, el aceite de *M. tetraphylla* es un aceite no secante (Índice menor a 100), lo cual predice un bajo porcentaje de ácidos grasos polinsaturados, que se confirma en el análisis composicional por CG-EM, (7). En esta clasificación se encuentran algunos aceites como el de oliva, el de castor y almendras (ver anexo 6).

### 7.6.3. Índice de Peróxidos

Ensayo	Índice Peróxidos (meq O <sub>2</sub> /Kg)
1	0,0
2	0,0
3	0,0
<b>Promedio</b>	0,0
<b>Lim. Superior</b>	0,0
<b>Lim. Inferior</b>	0,0
<b>Desviación Estándar</b>	0,0

Tabla 10. Índice de Peróxidos del Aceite de nuez de *M. tetraphylla* extraído por soxhlet.

Para el aceite recién extraído, se encontró un índice de peróxidos de cero, (Ver Tabla 10); indicando que durante el proceso de extracción y hasta el momento del análisis no hubo degradación oxidativa. Y de acuerdo con las especificaciones técnicas para el aceite de Macadamia virgen y refinado, el aceite cumple con este parámetro de calidad (ver anexo 5).

#### 7.6.4. Índice de Acidez

Ensayo	Índice de Acidez	
	% de Ácido Oleico	mg KOH/g
1	0,0518	0,3312
2	0,0530	0,3367
3	0,0513	0,3356
<b>Promedio</b>	0,0524	0,3345
<b>Lim. Superior</b>	0,0530	0,3367
<b>Lim. Inferior</b>	0,0513	0,3312
<b>Desviación Estándar</b>	0,0008	0,0029

Tabla 11. Índice de Acidez del Aceite de *M. tetraphylla* extraído por soxhlet.

En la Tabla 11, se relacionan los resultados del índice de acidez del aceite recién extraído de la nuez de *M. tetraphylla*, con un promedio de 0,0524% en ácido Oleico y 0,3345 en mg KOH/g (unidades utilizadas a nivel industrial y comercial para este parámetro), con desviaciones estándar de 0,0008 y 0,0029 respectivamente, las cuales indican que el método utilizado originó resultados confiables.

Este índice de acidez tan bajo revela que el aceite no se deterioró por reacciones de hidrólisis y confirman que el método de extracción fue adecuado, (105, 106, 111).

De acuerdo con las especificaciones técnicas para aceite de *M. intergrifolia* de uso industrial establecidas por olvea, el aceite de nuez de *M. tetraphylla* se encuentra entre el valor aceptado, (ver anexo 5).

### 7.7. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DEL ACEITE DE *M. tetraphylla*.

#### 7.7.1. Composición de Ácidos Grasos

PICO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁCIDO GRASO	Nº Carbonos	% AREA
1	27.406	MIRÍSTICO	C14:0	2.564
2	33.879	PALMÍTICO	C16:0	27.734
3	34.532	PALMITOLÉICO	C16:1	11.245
4	39.867	ESTEÁRICO	C18:0	10.193
5	40.301	OLÉICO	C18:1 cis	33.054
6	40.489	ELÁIDICO	C18:1 trans	2.474
7	41.510	LINOLÉICO	C18:2	2.394
8	45.416	ARAQUIDÓNICO	C20:4	7.539
9	45.832	EICOSENÓICO	C20:1	2.803

Tabla 12. Composición lipídica del aceite de nuez de *M. tetraphylla* extraído por soxhlet.

El cromatograma obtenido (figura 20) muestra la presencia de nueve compuestos que según el estándar corresponden a los ácidos grasos descritos en la tabla 12. La identificación se realizó por comparación de los tiempos de retención con los del estándar, (anexo 7) y de los principales fragmentos del espectro de masas de los ácidos grasos presentes (Modo SIM, anexo 8). Las fragmentaciones características de estos ácidos se relacionan en la tabla 13.

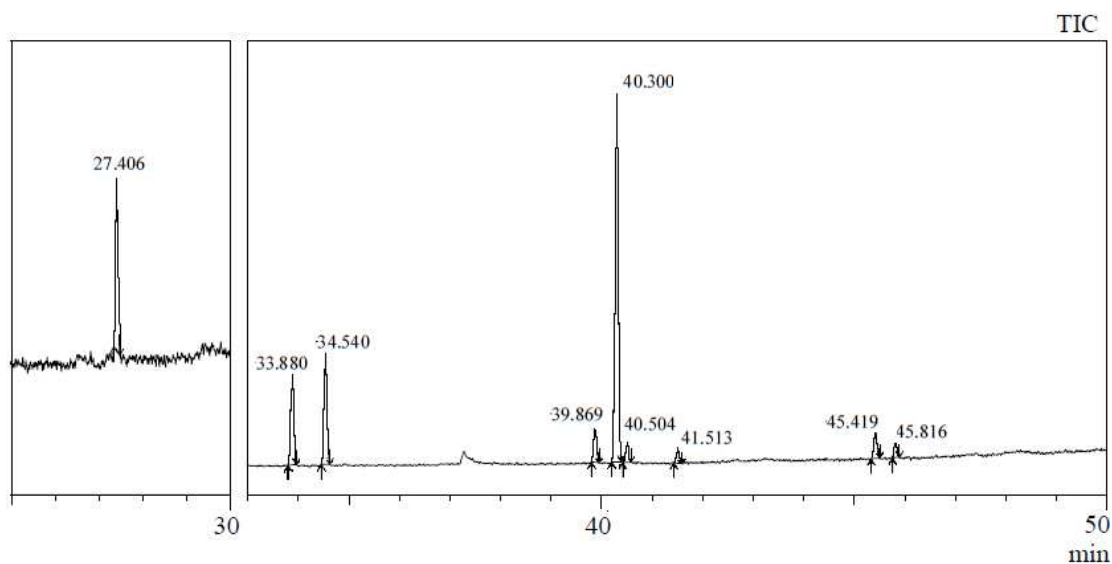


Figura 20. Perfil Cromatográfico de los metilésteres de Ácidos Grasos presentes en el aceite de *M. tetraphylla*.

En la tabla 12 se observa la composición de ácidos grasos del aceite de las nueces *M. tetraphylla*, presentando un elevado contenido de ácidos grasos insaturados de cadenas de 14 a 20 átomos de carbono característica del género macadamia. El contenido total de ácidos grasos insaturados es del orden de 60%, siendo el ácido oleico ( $\omega 9$ ) el mayoritario con 33,054% seguido del palmitoléico 11,245%, mientras que el ácido graso esencial linoléico ( $\omega 6$ ) esta baja proporción con 2,394% y el linolénico ( $\omega 3$ ) no fue detectado. Dentro de los ácidos grasos saturados que representan el 40% del contenido graso, el ácido palmítico fue el mayoritario (27,734%), seguido del esteárico (10,193%), y en menor proporción el ácido mirístico (2,564%).

Este es el primer reporte de la presencia de ácido Eláidico en la composición lipídica del aceite de *M. tetraphylla*, ya que en la revisión bibliográfica hasta la fecha, no hay valores reportados en ninguna de las especies de Macadamia. La presencia de este ácido graso puede ser de origen natural, como se reporta en otros aceites como el de palma, (115). También suele presentarse debido a hidrogenación de grasas, pero

la temperatura en la extracción no alcanzó las condiciones necesarias, por lo que se tendría que seguir estudiando la presencia de este ácido en la *M. tetraphylla*.

Los derivados de ésteres metílicos de ácidos grasos de cadena larga se identifican fácilmente, sus espectros se caracterizan por su respectivo ion molecular y otros iones importantes equivalente a  $m/z = M-31$  por (la pérdida de metanol) y  $M-43$  por (la pérdida de la cadena de C2, C3 y C4, como resultado de un complejo reordenamiento). Los espectros ilustran una serie regular de iones de 14 uma de distancia, en representación de la división sucesiva entre los grupos metileno; por ejemplo para el ácido palmítico en  $m/z = 227, 213, 199, 185, 171$ .

Los metilesteres de ácidos grasos saturados presentan perdidas de una serie de iones de fórmula general  $[CH_3OCO - (CH_2)_n]$ , a menudo con los máximos de intensidad en  $m/z = 87, 143$  y  $199, (124)$

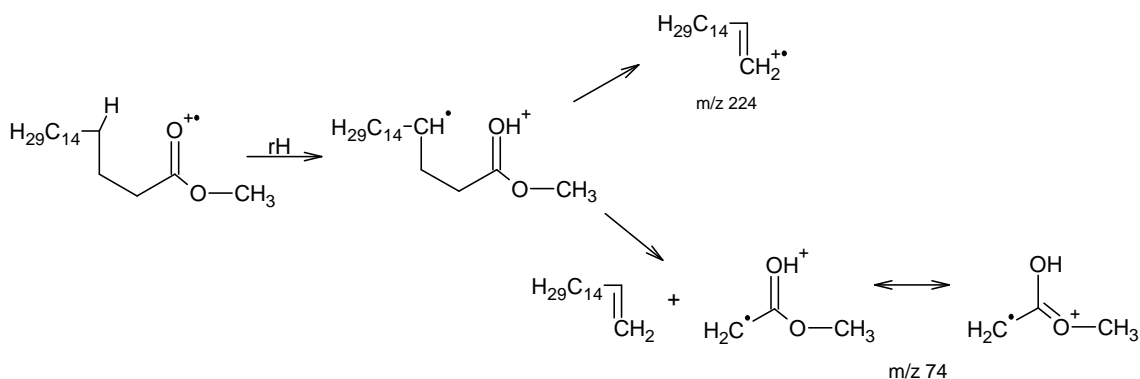


Figura 21. Reordenamiento de McLafferty resultando el ion  $m/z = 74$ .

El pico base de  $m/z = 74$  en los ácidos saturados y presente en los insaturados según los principales fragmentos de la tabla 13, es el obtenido por el "reordenamiento de McLafferty", figura 21, que resulta de un estado de transición de 6 miembros por la transferencia de un hidrogeno y al grupo carboxilo. Y el segundo pico en importancia de  $m/z = 87$  por una escisión o ruptura en la posición  $\beta$  de la cadena acíclica, figura 22, (122, 123)

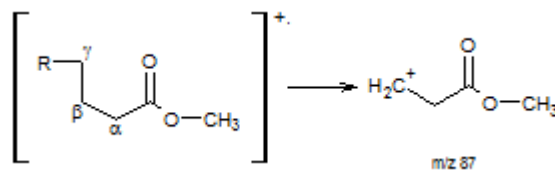


Figura 22. Obtención del fragmento  $m/z = 87$  por escisión.

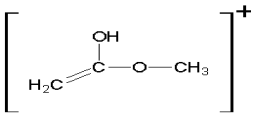
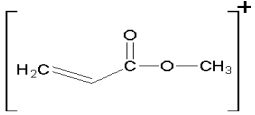
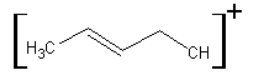
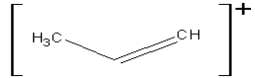
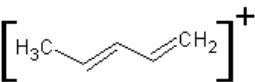
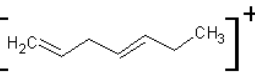
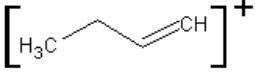
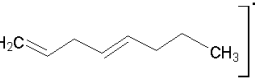
FRAGMENTO	PORCENTAJE DE ABUNDANCIA									
	m/z	MIRÍSTICO	PALMÍTICO	PALMITOLÉICO	ESTEÁRICO	OLÉICO	ELÁIDICO	LINOLÉICO	ARAQUIDÓNICO	EICOSENÓICO
	74	100%	100%	56%	100%	48%			100%	100%
	87	48%	45%		50%				52%	54%
	69			100%		100%	96%			
	41			72%		52	100%			
	67							100%		
	95							40%		
	55			75%		68%				
	111						65%			

Tabla 13. Porcentaje de abundancia y principales fragmentos de los ácidos grasos encontrados en el aceite de *M. tetraphylla*.

Los espectros de masas de ácidos grasos insaturados son muy diferentes de sus análogos saturados, y también varían un poco según el grado de insaturación, esto se cree que es debido a la migración del doble enlace cuando se produce el ion molecular. La única excepción es para el isómero trans, que tiene un pico correspondiente a un  $m/z = 111$ , diferencia entre el ácido oléico y el eláidico que presentan el mismo patrón de fragmentación. Así mismo se ha afirmado que existen iones específicos en el espectro de polienos, que son de gran ayuda para la identificación de ácidos poliinsaturados, como para (n-3) un fragmento característico de  $m/z=108$  con un 27-66% de abundancia en el ácido linoléico, y para (n-6) un ion importante es  $m/z=150$  9-30% de abundancia para el linoléico, (123, 124)

Para el análisis cromatográfico realizado se empleó una columna polar FAMEWAX según recomendación del estudio "Estandarización de la técnica de CG-EM para identificación y cuantificación de metilésteres de ácidos", (113) más adecuaciones hechas por el grupo de investigación Oleoquímica, y se encontró mejor desempeño con esta columna que según el fabricante es para metilésteres; siendo posible una mejor separación de los compuestos que contenía la mezcla del estándar (Anexo 7) con relación a la columna Restek Rtx-CL Pesticides (30m, 025mm, 0.25  $\mu\text{m}$ ), fase sílica del estudio anterior; pero se presentó solapamiento de 3 picos, indicando que se puede mejorar modificando las condiciones de análisis, (112).

Estas proporciones relativas coinciden con las reportadas para aceite de nuez de *M. tetraphylla* cultivada en Nueva Zelanda (103), sin embargo el contenido de ácido oléico puede variar debido a la región y condiciones del cultivo, igualmente que dentro de la misma especie de Macadamia puede existir una importante variabilidad en el contenido de lípidos y difieren según el cultivar, o en la acumulación de aceite en la nuez durante el verano lo que puede ser afectado por las precipitaciones.

### 7.7.2. Determinación de Vitamina E

En el perfil cromatográfico obtenido en el análisis de vitamina E para el aceite de nuez de *M. tetraphylla* (figura 23); se pudo observar la presencia de un pico a un tiempo de retención de 2,98 minutos, el cual corresponde al  $\alpha$ -tocotrienol con una concentración de 37.364 ppm, (ver tabla 14).

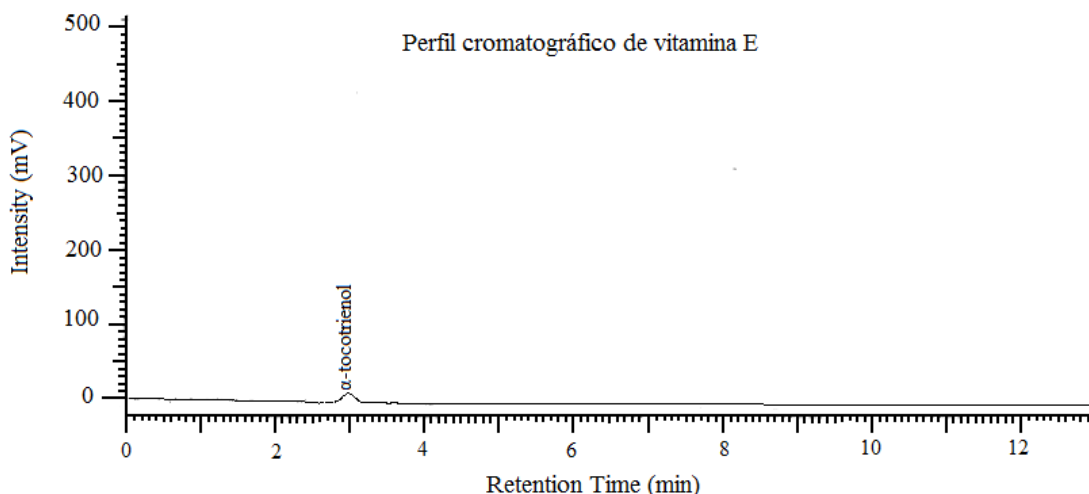


Figura 23. Perfil Cromatográfico de cuantificación de Vitamina E del aceite de Nuez de *M. tetraphylla*

Nombre	Tiempo Retención	Concentración (mg/kg)
d-Tocotrienol		n.d
<b>b+g-Tocotrienol</b>		n.d
a-tocotrienol	2,98 minutos	37,364
d-Tocoferol		n.d
b+g-Tocoferol		n.d
a-Tocoferol		n.d
<b>TOTAL</b>		<b>37,364</b>

Tabla 14. Resultado de la cuantificación de Vitamina E del aceite de Nuez de *M. tetraphylla* extraído por soxhlet.

La presencia de tocotrienoles en la *M. tetraphylla* cultivada en la región cafetera, difiere al contenido de vitamina E reportado para la misma especie (donde se identificaron solamente tocoferoles en el aceite extraído), esta diferencia puede ser de origen natural, debido a las condiciones agroclimáticas del cultivo, (23, 68).

El contenido tan bajo de vitamina E en el aceite en estudio, se asemeja al reportado para el extracto de aguacate para uso cosmético 32 ppm, y está muy distante de valores encontrados para otros aceites como almendra y oliva, (107, 108, 109, 110).

Por otra parte es de notar que la buena estabilidad oxidativa que presenta el aceite no se debe al contenido de Vitamina E sino que puede atribuirse a otros compuestos como fenoles y fitoesteroles según otros autores, (116, 117) por tanto sería conveniente continuar con otros estudios de la fracción insaponificable para determinar que compuestos están presentes e influyen en esta característica.

### 7.8. SEGUIMIENTO DE ESTABILIDAD DEL ACEITE DE NUEZ DE *M. tetraphylla*.

Seguimiento de Estabilidad del Aceite de Nuez de <i>M. tetraphylla</i>						
Semana	ÍNDICE ACIDEZ				ÍNDICE PERÓXIDOS	
	(mg KOH/g)	δ	% Oléico	δ	(meq O <sub>2</sub> /Kg)	δ
1	0,1033	0,0017	0,0524	0,0008	0,0	0,0
2	0,1047	0,0005	0,0527	0,0003	0,0	0,0
3	0,2043	0,0023	0,1029	0,0012	0,0	0,0
4	0,1993	0,0034	0,1004	0,0017	0,0	0,0
5	0,2127	0,0011	0,1071	0,0006	0,0	0,0
6	0,1901	0,0003	0,0957	0,0002	0,0	0,0
7	0,1065	0,0006	0,1072	0,0003	0,0	0,0
8	0,2270	0,0009	0,1143	0,0004	0,0	0,0

Tabla 15. Promedios y Desviación Estándar de las Semanas del Seguimiento de Estabilidad del aceite.

En la tabla 15, están consignados los valores promedio y las respectivas desviaciones estándar calculadas, que muestran la reproducibilidad del método empleado para la determinación de los parámetros obtenidos durante el seguimiento de estabilidad del aceite de nuez de *M. tetraphylla* por 8 semanas; en el anexo 9 se relacionan una por una las semanas de estudio.

Como se aprecia en la figura 24, durante los dos meses de estabilidad el índice de peróxidos hallado se mantuvo constante en un valor de 0 meq O<sub>2</sub>/Kg, sin llegar a alcanzar el máximo permitido para aceite virgen de macadamia (10 meq O<sub>2</sub>/Kg) (Anexo 5). Lo anterior indica que no hubo degradación oxidativa en el aceite, relacionado con el bajo porcentaje de humedad en las almendras factor determinante en la calidad del aceite por ser la principal causa de la oxidación lipídica, (30), demostrando así su alta resistencia a la oxidación; por lo cual es



importante continuar con el estudio para evaluar de manera más exhaustiva los procesos oxidativos como la posible formación de polímeros, empleando técnicas como rancimat y el estudio de fenoles y fitoesteroles para establecer los compuestos responsables de la estabilidad, (121).

En cuanto a la variación en el índice de acidez, este parámetro pasó de un valor de 0,1033 para la primera semana a 0,2270 para la octava semana de estudio; si bien, se observa que la acidez osciló a lo largo de los dos meses de estudio (ver figura 24), pero siempre estuvo dentro de los valores permitidos para aceite virgen de macadamia, para el que se establece un máximo de 2,0mg KOH/g.

Es de resaltar que en los primeros quince días, se presenta un incremento en la acidez del 49,44%, indicando un acelerado deterioro.

Se considera que el índice de acidez, está relacionado con los posibles procesos hidrolíticos que pueden ocurrir por efecto de temperatura, humedad, presencia de luz, y almacenamiento de las nueces y el aceite, sin embargo estos factores fueron controlados durante el proceso, por lo que estos cambios se pueden atribuir a la humedad presente en el ambiente, por las fluctuaciones de humedad en la ciudad de Pereira durante el tiempo de análisis, (96, 118, 119, 120).

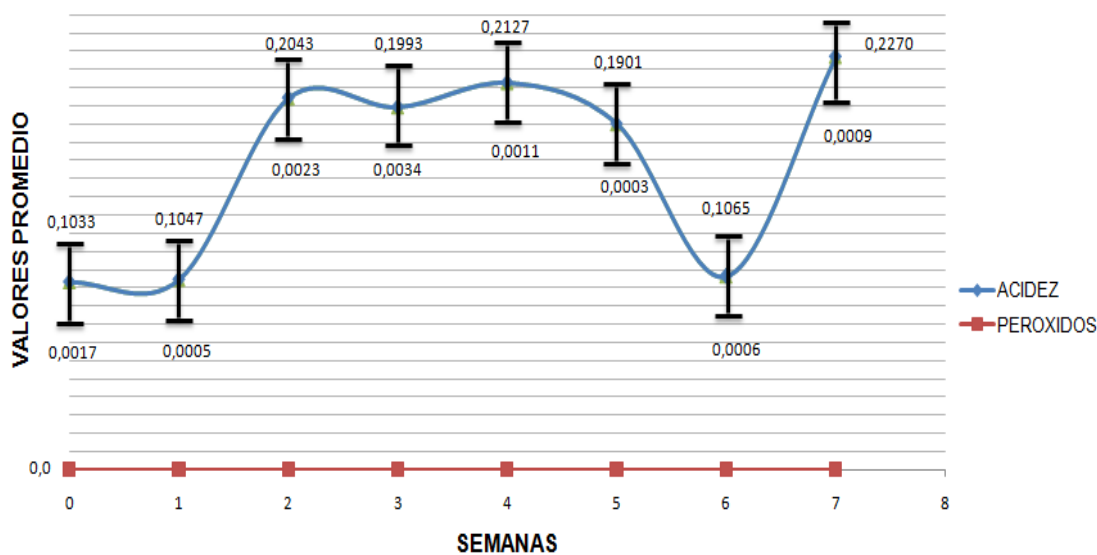


Figura 24. Gráfica del seguimiento de estabilidad realizado al aceite de Nuez de *M. Tetraphylla*.

## 7.9. DISCUSIÓN GENERAL

Con base en los resultados de la caracterización física y química del aceite de nuez de *M. tetraphylla*, este cumple con las normas internacionales de calidad establecidas para aceite de macadamia como insumo; incluso con valores muy por debajo de los exigidos por las especificaciones técnicas, abriendo la posibilidad de su aprovechamiento en la industria alimenticia nacional y el uso como otra fuente distinta a la *M. intergrifolia*.

El contenido del aceite de las nueces de *M. tetraphylla* supera el 50%, y está compuesto en su mayoría por ácidos grasos insaturados, de los cuales el ácido oléico representa el 33,054 % de la composición. Según esto podría competir en la industria alimenticia con aceites comerciales como el de oliva y el de *M. intergrifolia*, como otra fuente suplementaria de oléico el cual tiene un alto valor nutritivo por prevenir enfermedades cardiovasculares y disminuir los niveles de colesterol.

La alta estabilidad oxidativa que presentó el aceite durante las ocho semanas de seguimiento, (índice de peróxidos de 0,0 meq O<sub>2</sub>/Kg y un máximo valor de índice de acidez de 0.2270 mg KOH/g muy por debajo del máximo de 2,0mg KOH/g exigido), indicando la presencia de compuestos antioxidantes, siendo minoritario el contenido de vitamina E (37.364 ppm), y requiriéndose de otros estudios para establecer los compuestos que más contribuyen a esta estabilidad. Por consiguiente la composición química le confiere al aceite de nuez de *M. tetraphylla* propiedades nutraceuticas.

También desde el punto de vista cosmético el aceite de *M tetraphylla*, tiene una composición química que puede ser aprovechada, debido a la presencia del ácido palmitoléico (11,245%) y el oléico (33,054%) que se encuentran en una alta concentración y por la importancia cosmética de estos ácidos grasos abre otras posibilidades de uso al aceite, puesto que el primer ácido graso actúa como protector en la peroxidación lipídica y de daños en la membrana celular, dotando la piel de permeabilidad y elasticidad, y el segundo tiene propiedades hidratantes, suavizantes y emolientes que mejoran la función barrera de la piel.

La alta proporción de estos dos ácidos grasos en el aceite de *M. tetraphylla* diversificaría la industria nacional cosmética, pues actualmente solo reviste importancia como insumo alimenticio el aceite de *M. intergrifolia*. Cabe notar que es necesario continuar con otros estudios para tener más argumentos de su uso potencial en la cosmética nacional y la incursión como cosmeceútico.

Según el balance de materia realizado a la nuez de *M. tetraphylla*, el cuesco con un 50,54% representa la mayor cantidad del fruto y es un subproducto poco aprovechado, siendo necesario realizar estudios para su adecuada utilización.

La nuez de *M. tetraphylla* en general tiene diferentes posibilidades alimenticias y cosméticas, está adaptada a la región cafetera y con el adecuado manejo fitotécnico puede al igual que la *M. integrifolia* ser un material comercial, por lo que es importante la difusión para su comercialización; así como el adecuado mantenimiento del banco de germoplasma el cual constituye un recurso genético invaluable, no solo para continuar los estudios de *tetraphylla* y de otras especies sino para el desarrollo futuro de posibles híbridos que presenten características deseables para otros usos comerciales.

## 8. CONCLUSIONES

- El porcentaje de aceite de nuez de *M. Tetraphylla*, obtenido por extracción soxhlet fué de 53,87% y por extracción sólido-líquido con agitación magnética de 50,65%.
- Según el balance de materia realizado para la nuez de *M. tetraphylla*, se encontró que de las muestras procedentes del banco de germoplasma localizado en la sub-estación la catalina (Risaralda), en las condiciones actuales del mismo el 50,54% y el 15,26% corresponden al cuesco y a la almendra de primera calidad respectivamente.
- Las propiedades físicas evaluada al aceite de nuez de *M. tetraphylla* presentaron valores promedios para Índice de Refracción de 1,4607 a 25°C y para Densidad de 0,9080 g/mL.
- El aceite de nuez de *M. tetraphylla* recién extraído presentó un Índice de Saponificación de 182,6275 mgKOH/g, un Índice de Yodo de 52,4307 cg/g que lo clasifica como un aceite no secante, un Índice de Peróxidos de 0 meqO<sub>2</sub>/kg y un Índice de Acidez de 0,3345 mgKOH/g que indican que el aceite no sufrió ninguna degradación oxidativa durante la extracción.
- Durante los dos meses de seguimiento de estabilidad, el aceite de nuez de *M. tetraphylla* no presentó contenido de peróxidos y el mayor valor alcanzado en este tiempo para el Índice de acidez fue de 0,2270 mgKOH/g; valores que no sobrepasan los rangos aceptados industrialmente para estos parámetros.
- De acuerdo con el análisis por CG-EM de la composición de ácidos grasos del aceite de *M. tetraphylla*, se encontró que el compuesto mayoritario es el ácido Oléico con un porcentaje de 33,054% seguido por el Palmítico 27,734%, Palmitoléico 11,245% y Araquidónico 7,539%; y en menor proporción el Linolénico 2,93%, el Eicosénico 2,803% y el Eláidico 2,47%.
- Según el análisis por HPLC del aceite de *M. tetraphylla*, se detectó el  $\alpha$ -tocotrienol como el único isómero de vitamina E, en una concentración de 37, 364 ppm.
- De acuerdo a las características físicas, químicas y de estabilidad presentadas por el aceite de nuez de *M. tetraphylla*, este puede ser un insumo en la industria alimenticia y cosmética, y además incursionar en el campo nutracéutico y cosmeceútico diversificando así su uso.

## 9. RECOMENDACIONES

- Implementar métodos de extracción exhaustivos propuestos por otros autores, para establecer el contenido total de aceite presente en las nueces de *M. tetraphylla* cultivada en la región cafetera.
- Realizar un seguimiento microbiológico al aceite de nuez *M. tetraphylla* con el fin de evaluar su inocuidad frente a normatividad vigente para uso alimenticio y cosmético en el tiempo.
- Continuar estudios de la composición química del aceite de nuez de *M. tetraphylla* que permitan establecer la estabilidad oxidativa.
- Estudiar el pericarpio y el cuesco de Macadamia para generar aplicaciones que les den el mayor valor agregado, puesto que estos subproductos representan la mayor proporción del fruto.
- Debido a las dificultades en el proceso de desconchado de la nuez, por la falta de un sistema comercial adecuado, se sugieren estudios mecánicos para desarrollar un mecanismo que permita la separación de la almendra con el menor porcentaje de pérdida y con la mayor funcionalidad.

## 10. ANEXOS

**Anexo 1.** Principales diferencias entre *M. integrifolia* y *M. tetraphylla*. (28, 30).

<i>Característica</i>	<i>Macadamia Integrifolia</i>	<i>Macadamia Tetraphylla</i>
Disposición de las Hojas	Usualmente 3 por nudo	4 por nudo, con casos de 6 a 8
Hojas Adultas	Bordes lisos con 4 a 14 espinas con extremo romo	Bordes serrados y siempre espinoso extremo
Brote nuevo	Color verde pálido o cremosas blancas	Rosados o rojizos, ocasionalmente amarillento-verdoso
Flores	Color blanco a cremoso agrupadas en racimos de 10-20 cm de largo.	Color rosado a rojizo. Agrupadas en racimos de 17-28 cm de largo Muy fragantes
Producción	Produce fruta de los 3 a los 7 años	Producción de los 2 a los 4 años
Fruto	Nuez esférica, cascara lisa, 80% de aceite y 4% de azúcar cuando está seca	Nuez elíptica cáscara rugosa, 70% de aceite y 8% de azúcar cuando está seca
Cáscara	Gruesa, firme, brillante adherida a la nuez, requiere máquina para descascararla.	Delgada, firme, opaca, se abre al madurar. Muchas nueces caen sin la cáscara.
Concha	Lisa o suave y redondeada, dura, gruesa, densa, quebradiza, fácil de romper.	Rugosa y levemente elíptica, dura, delgada y menos densa. Los extremos más firmes que los laterales.
Madera	Moderadamente densa, quebradiza.	Densa, dura, fuerte, rara vez se quiebra o parte
Semillas	Menos dulces, textura blanda	Dulce, textura firme. Algo más variable en calidad
Temperatura	Menos resistente al frío y al calor extremo. Requiere de temperaturas altas para obtener máxima calidad	Más resistente al frío y fuerte al calor

## **Anexo 2.** Derivatización de ácidos Grasos, (116).

La esterificación del aceite se realizó utilizando una mezcla  $H_2SO_4$  / MeOH al 2%. Tanto el ácido como el alcohol deben ser anhidros para evitar desplazamientos del equilibrio.

A 40 – 50 mg del extracto lipídico (aceite de *M. tetraphylla* recién extraído) un tubo con tapa rosca se agregó un mililitro de Hexano grado cromatográfico. Se procedió a adicionar 2 ml de la mezcla  $H_2SO_4$  / MeOH al 2% y se disolvió.

Después de tapar el tubo, se llevo a un baño maría a 90 °C por 2 horas.

Pasado este tiempo y del tubo estar a temperatura ambiente, se adicionó 0,5 mL de agua y se mezcló. Se hacen 3 extracciones con porciones de 3 mL de hexano grado cromatográfico para eliminar interferencias en el análisis. Se combinan los 3 extractos de hexano y se reduce por calentamiento hasta  $\frac{1}{4}$  del volumen inicial.

Anexo 3. Certificado de análisis del estándar comercial



CERTIFICATE OF ANALYSIS

FOR LABORATORY USE ONLY—READ MSDS PRIOR TO USE.

FAE2-2

Cat. No.: 35078 Lot No.: A038629  
 Description: NLEA FAME Mix

Elution Order	Compound
1	Methyl butyrate
2	Methyl hexanoate
3	Methyl octanoate
4	Methyl decanoate
5	Methyl undecanoate
6	Methyl laurate
7	Methyl tridecanoate
8	Methyl myristate
9	Methyl myristoleate (cis-9)
10	Methyl pentadecanoate
11	Methyl palmitate
12	Methyl palmitoleate (cis-9)
13	Methyl heptadecanoate
14	Methyl stearate
15	Methyl elaidate (trans-9)
16	Methyl oleate (cis-9)
17	Methyl linoleate (trans-9,12)
18	Methyl linoleate (cis-9,12)
19	Methyl arachidate
20	Methyl eicosanoate (cis-11)
21	Methyl linolenate (cis-9,12,15)
22	Methyl behenate
23	Methyl erucate (cis-13)
24	Methyl tricosanoate
25	Methyl eicosapentaenoate (cis-5,8,11,14,17)
26	Methyl lignocerate
27	Methyl nervonate (cis-15)
28	Methyl docosahexaenoate (cis-4,7,10,13,16,19)

Column: 30m .32mm .25µm  
 Famewax (cat.#12498)  
 Carrier gas: hydrogen @ 40cm/sec.  
 Temp. program: 100°C (hold 4 min.)  
 to 240°C @ 3°C/min.  
 Inj. temp.: 200°C  
 Det. temp.: 250°C  
 Detector type: FID

*John Lidgett*  
 John Lidgett—QA Analyst

MANUFACTURED UNDER RESTEK'S ISO 9001  
 REGISTERED QUALITY SYSTEM



**Anexo 4.** Condiciones climatológicas de la Subestación la Catalina.

SUBESTACIÓN LA CATALINA	
Latitud	04° 45´ Norte N
Longitud	75° 44´ Oeste W
Altitud	1340 msnm
Área	40.5 hectáreas
T° media anual	máx. 27,1°C - min. 17,3°C
Precipitación media anual	Total: 2013 mm
	Diurna: 835 mm
	Nocturna 1178 mm
Brillo solar medio anual	Total: 1648 horas
	Mañana: 844 horas
	Tarde: 804 horas

## Anexo 5. Especificaciones Técnicas para aceite de *M. intergrifolia*



**Siège social :**  
41 Boulevard de la République, 76400 Fécamp -  
France

Tél : +33 2 35 29 28 54 - Fax : +33 2 35 27 64 29  
<http://www.olvea.fr>

**Agence de Marseille :**  
146 Rue Paradis, 13006 Marseille -  
France

Tél : + 33 4 91 95 90 23 - Fax : +33 4 91 64 52 64

### FICHE TECHNIQUE / SPECIFICATION SHEET HUILE DE MACADAMIA RAFFINEE / REFINED MACADAMIA NUT OIL

Création / *Creation* : 1<sup>er</sup> octobre 2008 / 1<sup>st</sup> October 2008  
Dernière mise à jour / *Last updating* : 7 octobre 2009 / 7<sup>th</sup> October 2009  
Remplace / *Replaces* : 1<sup>er</sup> octobre 2008 / 1<sup>st</sup> October 2008

#### **1. Description générale / General description :**

Huile grasse obtenue à partir d'Amandes de *Macadamia ternifolia* par pression, suivie d'un raffinage.  
*Fatty oil obtained from the almonds of Macadamia ternifolia by pressure followed by refining.*

Un antioxydant approprié peut être ajouté / *A proper antioxidant can be added.*

Usage / *Use* : Cosmétique / pharmaceutique/alimentaire *Cosmetic / pharmaceutical/ food*

2.1. Caractéristiques / <i>Characteristics</i> :	METHODES	NORMES
Caractères organoleptiques / <i>Organoleptic characters</i>	Interne / <i>Internal</i>	Liquide, limpide, odeur et goût neutres / <i>Clear liquid, neutral odour and taste</i>
Couleur / <i>Colour</i>	Gardner	Max. 3.0
Densité relative à 20°C / <i>Relative density at 20°C</i>	PE 2.2.5	0.905 – 0.920
Indice de réfraction à 20°C / <i>Refractive index at 20 °C</i>	PE 2.2.6	1.460 - 1.470
Indice d'acide en mg KOH/g / <i>Acid value in mg KOH/g</i>	PE 2.5.1	Max 0.5
Indice de peroxyde en méq.O <sub>2</sub> /Kg / <i>Peroxide value in meq.O<sub>2</sub>/Kg</i>	PE 2.5.5	Max. 5.0

2.2. Répartition des acides gras (en %) / <i>Fatty acid composition (in %)</i> :	METHODES	NORMES
C12:0 (acide laurique / <i>lauric acid</i> )	PE 2.4.22	Max. 1.0
C14:0 (acide myristique / <i>myristic acid</i> )		Max. 1.0
C16:0 (acide palmitique / <i>palmitic acid</i> )		5.0 - 11.0
C16:1 (acide palmitoléique / <i>palmitoleic acid</i> )		15.0 - 30.0
C18:0 (acide stéarique / <i>stearic acid</i> )		2.0 - 4.5
C18:1 (acide oléique / <i>oleic acid</i> )		55.0 - 65.0
C18:2 (acide linoléique / <i>linoleic acid</i> )		1.0 - 8.0
C18:3 (acide linoléique / <i>linolenic acid</i> )		Max. 1.0
C20:0 (acide arachidique / <i>arachidic acid</i> )		1.3 - 3.5
C20:1 (acide eicosénoïque / <i>ecosenoic acid</i> )		1.0 - 4.0
C22:0 (acide béhénique / <i>behenic acid</i> )		Max. 1.0
C22:1 (acide érucique / <i>erucic acid</i> )		Max. 1.0
C24:0 (acide lignocérique / <i>lignoceric acid</i> )		Max. 1.0

#### **3. Informations nutritionnelles / Nutritional information :**

Teneur en lipides / *Lipids content* : 99,9 % min

Valeur énergétique / *Energy value* : 9000kcal /kg

MACR 07/10/09 - Page 1 sur 2

OLVEA SAS au capital de 2.500.000 € - RCS Le Havre 057 808 388 00045  
N° TVA : FR 40 057 808 388 - APE 1041B



**Siège social :**  
41 Boulevard de la République, 76400 Fécamp -  
France  
Tél : +33 2 35 29 28 54 - Fax : +33 2 35 27 64 29  
<http://www.olvea.fr>

**Agence de Marseille :**  
146 Rue Paradis, 13006 Marseille –  
France  
Tél : + 33 4 91 95 90 23 - Fax : +33 4 91 64 52 64

## FICHE TECHNIQUE / SPECIFICATION SHEET

### HUILE DE MACADAMIA VIERGE / VIRGIN MACADAMIA NUT OIL

Création / Creation : 1<sup>er</sup> octobre 2008 / 1<sup>st</sup> October 2008  
Dernière mise à jour / Last updating : 7 octobre 2009 / 7<sup>th</sup> October 2009  
Remplace / Replaces : 1<sup>er</sup> octobre 2008 / 1<sup>st</sup> October 2008

#### **1. Description générale / General description :**

Huile grasse obtenue à partir de noix de *Macadamia ternifolia* par pression.  
*Fatty oil obtained from Macadamia ternifolia kernels by pressure.*  
Un antioxydant approprié peut être ajouté / *A proper antioxidant can be added.*  
Usage / Use : Cosmétique / pharmaceutique / alimentaire - *Cosmetic / pharmaceutical / food*

2.1. Caractéristiques / <i>Characteristics</i> :	METHODES	NORMES
Caractères organoleptiques / <i>Organoleptic characters</i>	Interne / <i>Internal</i>	Liquide limpide, odeur et goût caractéristiques <i>Clear liquid, typical odour and taste</i>
Couleur / <i>Colour</i>	Gardner	Max. 7.0
Densité relative à 20°C / <i>Relative density at 20°C</i>	PE 2.2.5	0.905 – 0.920
Indice de réfraction à 20°C / <i>Refractive index at 20 °C</i>	PE 2.2.6	1.460 – 1.470
Absorbance spécifique mesurée au maximum entre 264 nm et 276 nm <i>Specific absorbance measured at the maximum between 264 nm and 276nm</i>	PE 2.2.25	Max. 0.3
Indice d'acide en mg KOH/g / <i>Acid value in mg KOH/g</i>	PE 2.5.1	Max. 2.0
Indice de peroxyde en m <sup>é</sup> q.O <sub>2</sub> /Kg / <i>Peroxide value in meq.O<sub>2</sub>/Kg</i>	PE 2.5.5	Max. 10.0

2.2. Répartition des acides gras (en %) / <i>Fatty acid composition (in %)</i> :	METHODES	NORMES
C12:0 (acide laurique / <i>lauric acid</i> )	PE 2.4.22	Max. 1.0
C14:0 (acide myristique / <i>myristic acid</i> )		Max. 1.0
C16:0 (acide palmitique / <i>palmitic acid</i> )		5.0 - 11.0
C16:1 (acide palmitoléique / <i>palmitoleic acid</i> )		15.0 – 30.0
C18:0 (acide stéarique / <i>stearic acid</i> )		2.0 - 4.5
C18:1 (acide oléique / <i>oleic acid</i> )		55.0 - 65.0
C18:2 (acide linoléique / <i>linoleic acid</i> )		1.0 - 8.0
C18:3 (acide linoléique / <i>linolenic acid</i> )		Max. 1.0
C20:0 (acide arachidique / <i>arachidic acid</i> )		1.3 - 3.5
C20:1 (acide eicosénoïque / <i>eosenoic acid</i> )		1.0 - 4.0
C22:0 (acide behénique / <i>behenic acid</i> )		Max. 1.0
C22:1 (acide érucique / <i>erucic acid</i> )		Max. 1.0
C24:0 (acide lignocérique / <i>lignoceric acid</i> )		Max. 1.0

MACR 07/10/09 - Page 1 sur 2

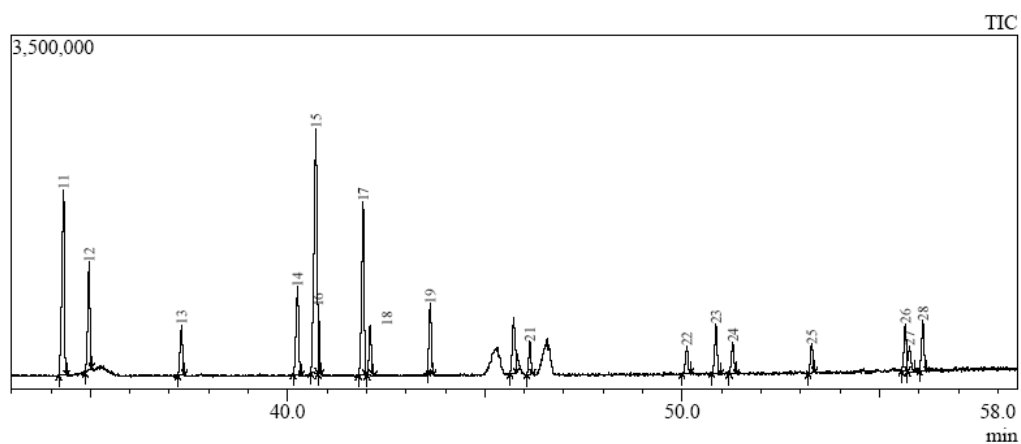
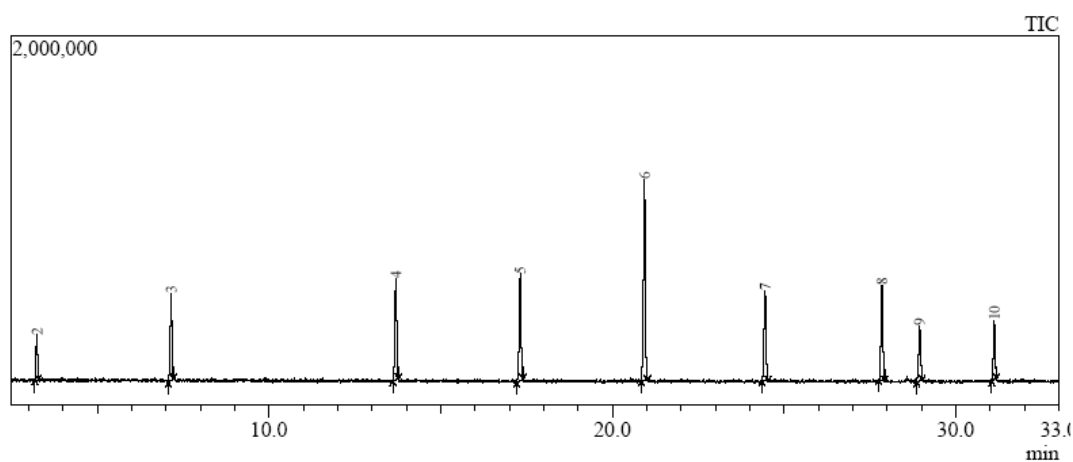
OLVEA SAS au capital de 2.500.000 € - RCS Le Havre 057 808 388 00045  
N° TVA : FR 40 057 808 388 - APE 1041B

**Anexo 6.** Requisitos fisicoquímicos de aceites comestibles establecidos por el ICONTEC

<b>Aceite</b>	<b>Densidad a 25 °C</b>	<b>Índice de refracción</b>	<b>Índice de acidez (%ac oleico)</b>	<b>Índice de peróxidos (me O<sub>2</sub>/Kg)</b>	<b>Índice de saponificación</b>	<b>Índice de yodo</b>
<b>Girasol</b>	0.913* - 0.919**	nD <sup>25</sup> 1.4720* - 1.4750**	0.2**	1' - 5"	188* - 194**	110* - 113**
<b>Coco</b>	0.917* - 0.919**	nD <sup>25</sup> 1.4480* - 1.450**	0.2**	_____	250* - 261**	7.5* - 10.5**
<b>Soya</b>	0.917* - 0.924**	nD <sup>25</sup> 1.4720* - 1.4760**	0.2**	1' - 5"	188* - 195**	120* - 141**
<b>Maíz</b>	0.917* - 0.925**	nD <sup>25</sup> 1.4700* - 1.4740**	0.2**	1' - 5"	187* - 195**	103* - 128**
<b>Ajonjolí</b>	0.923* - 0.925**	nD <sup>40</sup> 1.4650* - 1.4690**	2	1' - 5"	185* - 187**	104* - 120**
<b>Algodón</b>	0.916* - 0.918**	nD <sup>40</sup> 1.4580* - 1.466**	0.2**	1' - 5"	169* - 198**	99* - 119**
<b>Oliva virgen</b>	0.910* - 0.916**	nD <sup>20</sup> 1.4677* - 1.4705**	3.3**	20**	184* - 196**	75* - 94**
<b>Oliva refinado</b>	0.910* - 0.916**	nD <sup>20</sup> 1.4677* - 1.4705**	0.3**	10**	184* - 196**	75* - 94**
<b>Maní</b>	0.914* - 0.917**	nD <sup>40</sup> 1.460* - 1.465**	2	1' - 5"	187* - 196**	84* - 106**
<b>Palma</b>	0.869* - 0.879**	nD <sup>50</sup> 1.4490* - 1.455**	0.2**	1' - 5"	195* - 205**	50* - 58**

\* Valor mínimo // \*\* Valor máximo // ' En fabrica // " Fuera de fabrica

## Anexo 7. Separación del estándar FAME's utilizado

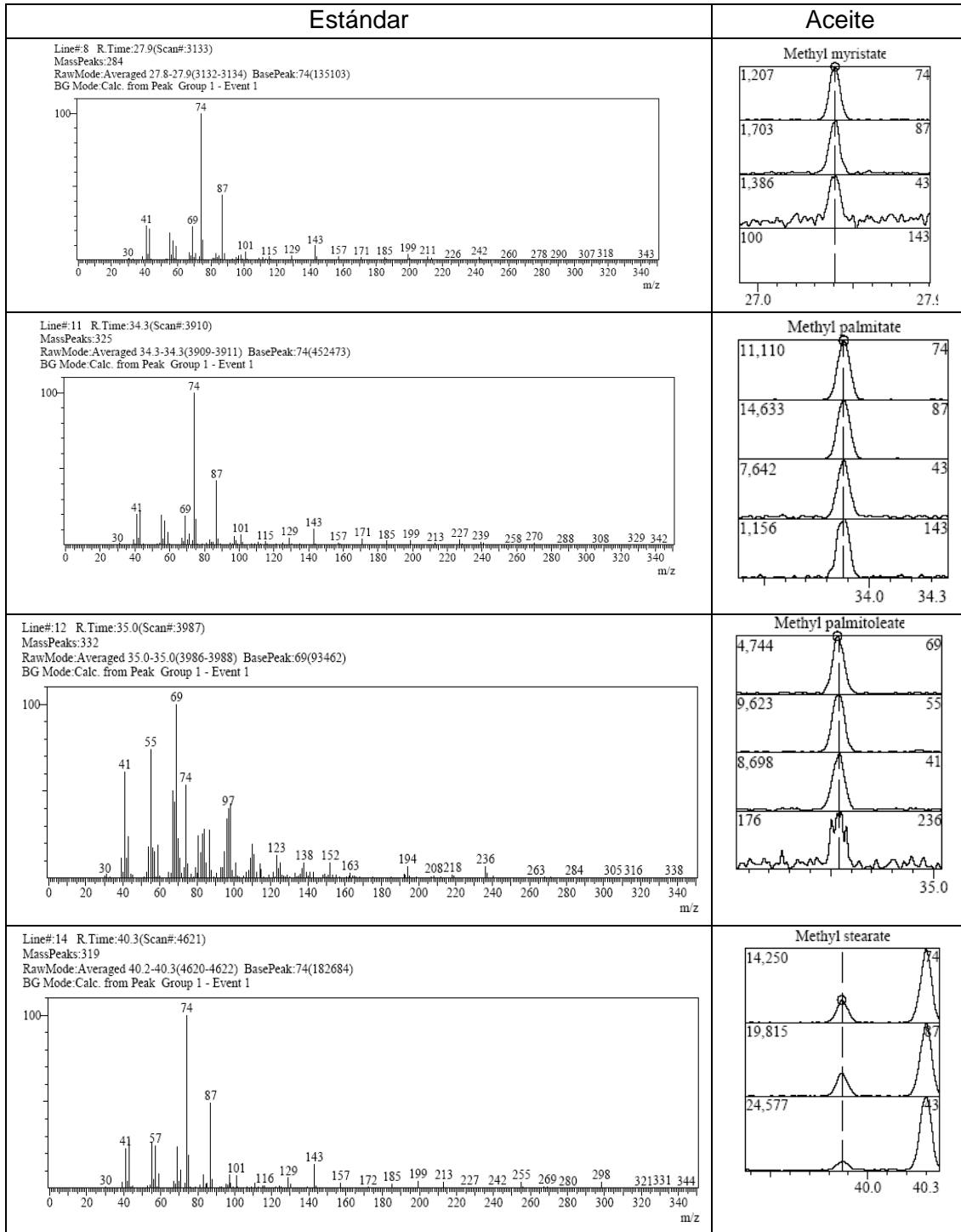


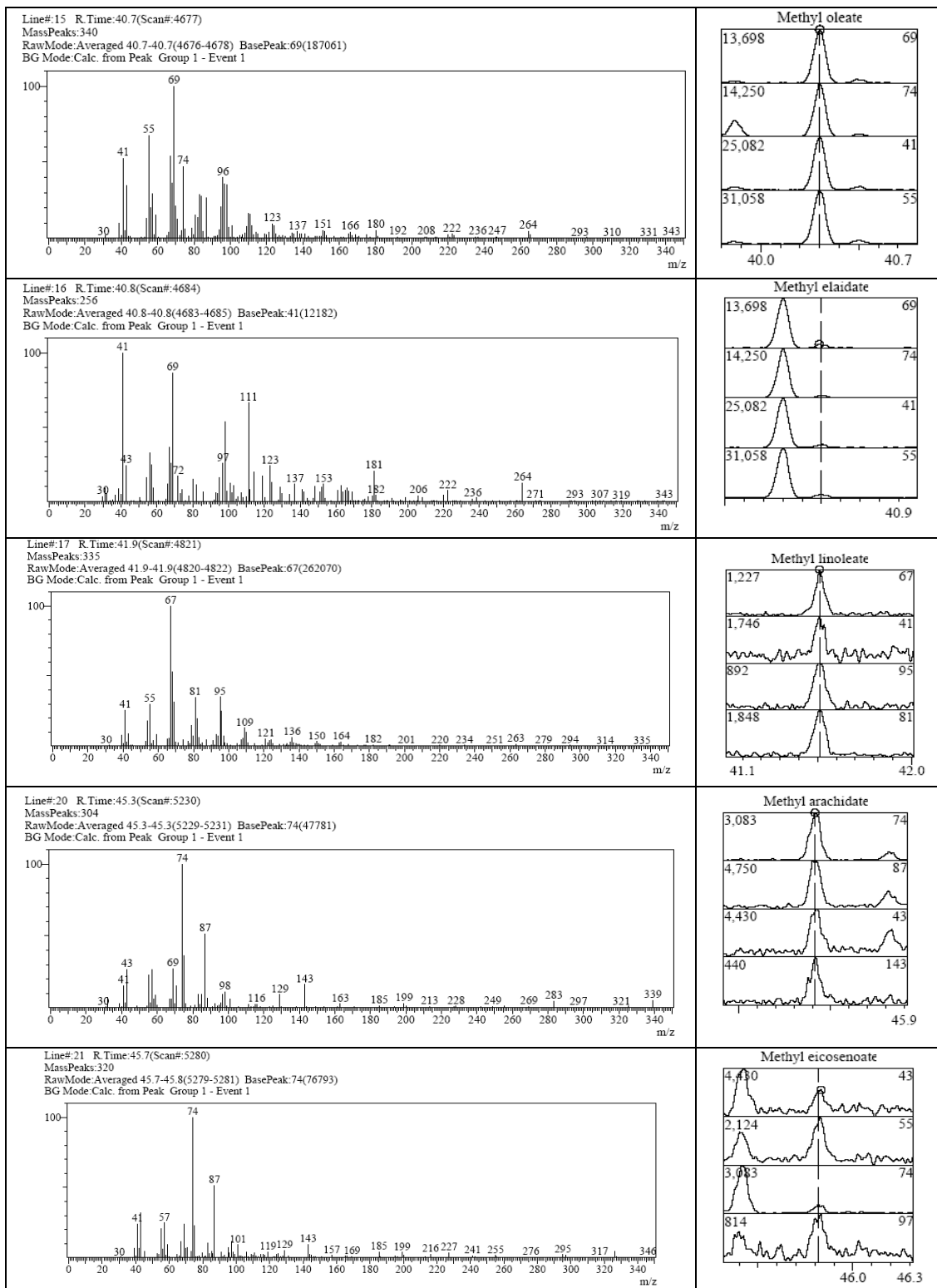
Quantitative Result Table

ID#	Name	R.Time	Area
1	Methyl butyrate	1.962	261494
2	Hexanoic acid, methyl ester	3.243	312422
3	Octanoic acid, methyl ester	7.152	646871
4	Decanoic acid, methyl ester	13.694	823862
5	Undecanoic acid, methyl ester	17.316	737806
6	Methyl laurate	20.935	1406953
7	Tridecanoic acid, methyl ester	24.450	633784
8	Methyl myristate	27.847	601125

ID#	Name	R.Time	Area
9	Methyl myristoleate	28.954	120534
10	Pentadecanoic acid, methyl ester	31.120	349570
11	Methyl palmitate	34.319	2062155
12	Methyl palmitoleate	34.965	408660
13	Heptadecanoic acid, methyl ester	37.310	495842
14	Methyl stearate	40.253	931791
15	Methyl oleate	40.714	925476
16	Methyl elaidate	40.780	148527
17	Methyl linoleate	41.913	1237066
18	Methyl linoelaidate	42.095	327589
19	Methyl linolenate	43.616	393725
20	Methyl arachidate	45.722	445703
21	Methyl eicosenoate	46.133	27319
22	Methyl eicosapentaenoate	50.121	141595
23	Methyl behenate	50.859	390196
24	Methyl erucate	51.277	117140
25	Methyl tricosanoate	53.278	212243
26	Methyl lignocerate	55.656	359958
27	Methyl docosahexaenoate	55.765	113530
28	Methyl nervonate	56.104	196374

**Anexo 8. Espectros de masas de los metilesteres del estándar y el aceite.**







**Anexo 9.** Seguimiento de Estabilidad por semana.

ENSAYO	PARÁMETRO	1	2	3	Promedio	Desviación Estándar
<b>Semana 1</b> <b>30 Abril</b>	Acidez mg KOH / g	0,1028	0,1052	0,1019	0,1033	0,0017
	Peróxidos (meq O <sub>2</sub> /Kg)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Semana 2</b> <b>7 Mayo</b>	Acidez mg KOH / g	0,1053	0,1046	0,1043	0,1047	0,0005
	Peróxidos (meq O <sub>2</sub> /Kg)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Semana 3</b> <b>14 Mayo</b>	Acidez mg KOH / g	0,2016	0,2053	0,2059	0,2043	0,0023
	Peróxidos (meq O <sub>2</sub> /Kg)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Semana 4</b> <b>21 Mayo</b>	Acidez mg KOH / g	0,2001	0,1955	0,2022	0,1993	0,0034
	Peróxidos (meq O <sub>2</sub> /Kg)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Semana 5</b> <b>28 Mayo</b>	Acidez mg KOH / g	0,2126	0,2117	0,2139	0,2127	0,0011
	Peróxidos (meq O <sub>2</sub> /Kg)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Semana 6</b> <b>4 Junio</b>	Acidez mg KOH / g	0,1898	0,1900	0,1904	0,1901	0,0003
	Peróxidos (meq O <sub>2</sub> /Kg)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Semana 7</b> <b>11 Junio</b>	Acidez mg KOH / g	0,1059	0,1069	0,1068	0,1065	0,0006
	Peróxidos (meq O <sub>2</sub> /Kg)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Semana 8</b> <b>18 Junio</b>	Acidez mg KOH / g	0,2260	0,2273	0,2277	0,2270	0,0009
	Peróxidos (meq O <sub>2</sub> /Kg)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

## BIBLIOGRAFIA

1. VILLEGAS, Clemencia. Cultivo y producción de la Macadamia en la zona cafetera Colombia. Revista Avances Técnicos Cenicafe No 227. Mayo de 1996.
2. C. Peace, V. Vithanage, C. Turnbull, B.J. Carroll. Characterising Macadamia Germplasm With Codominant Radiolabelled DNA Amplification Fingerprinting Markers. ISHS Acta horticulturae 575 International Symposium on Tropical and Subtropical Fruits. (Citado 2 Noviembre 2009)
3. MENDOZA L. Mauro R, LUIS A. Alfredo, LARIOS G. Antonio. CULTIVO DE MACADAMIA ssp En Michoacan. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Folleto Técnico N° 3, Mayo 2004, Pág 6.
4. CEDEÑO. Luis, CARRERO. Chrystian. Antracnosis en plántulas de macadamia causada por *Glomerella cingulata*. Asociacion Interciencia. ISSN 0378-1844. Volumen 27 N° 10 Caracas, Octubre 2002. (Consulta 2 Noviembre 2009).
5. NAVEED, Akhtar. MAHMOOD; Ahmad. ASADULLAH; Madní. MALIK, S. Bakhsh. Evaluation of basic properties of macadamia nut oil. Department of pharmacy and alternative medicine. Islamia, University of Bahawalpur, Pakistan. Gomal University Journal of Research, N° 22, pág 21-27, 2006.
6. MALO, S. E. CAMPBELL, C.W. THE MACADAMIA. University of Florida. 2005. Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/MG/MG05200.pdf>
7. JITNGARMKUSOL, Siwaporn. JUTHAMAS, Hongsuwankul. KANITHA, Tananuwong. Chemical Compositions, Functional Properties And Microstructure Of Defatted Macadamia Flours. Food Chemistry, Volumen 110, Issue 1, Pag 23 - 30. September 2008. Doi:10.1016/j.foodchem.2008.01.050.
8. SABATÉ, Joan. NUT CONSUPTION AND BODY WEIGHT. The American Journal of Clinical Nutrition. Online Mayo 2006. (Consulta 2 Noviembre 2009)  
Web:[http://www.optimalhealthpartner.com/A\\_Archive/Sabate\\_NutConsumptionBodyWeight.pdf](http://www.optimalhealthpartner.com/A_Archive/Sabate_NutConsumptionBodyWeight.pdf)
9. TIKHONOV Vladimir P. MAKAROV Valery G. GAVROVSKAYA Lyudmila K. SIDLYAROV Dmitry P. THERAPEUTIC AND COSMETIC BALSAM. Publicación N° EP1972331(A1). Septiembre 2008. (Consulta 2 Noviembre 2009).

10. ZUBKO Tetiana T. ASTAFIEVA Hanna V. METIOLKINA Olena S. CREAM ANTICELLULITE. Publicación N° UA80058 (C2). Agosto 2007.  
(Consulta 2 Noviembre 2009).
11. ROMANOVSKA Natallia M. ROMANOVSKY Andreii S. ANTICOUPEROSE CREAM. Publicación N° UA23301(U). Mayo 2007. (Citado Octubre 2009)
12. ROMANOVSKA Natallia M. ROMANOVSKY Andreii S. HAND CREAM. Publicación N° UA23299 (U). Publicación 25 Mayo 2007. (Citado Octubre 2009)
13. ROMANOVSKA Natallia M. ROMANOVSKY Andreii S. CREAM FOR SAFE SUNBURN. Publicación N° UA23298 (U). Publicación 25 Mayo 2007.
14. OTSUKA Masaaki. MASUDA Hisatoshi. PROCTER & GAMBLE. LIPOPHILIC PERSONAL CARE COMPOSITION. Publicación N° CA2551930 (A1). Publicación 8 Enero 2007. (Citado Octubre 2009).
15. REICHERT Anja. GOUTSIS Konstantin. HAIR CARE AGENTS. Publicación N° WO2006136303 (A1). Publicación 28 Diciembre 2006. (Citado Octubre 2009)
16. KOBAYASHI Etsuko. CLEANSING COSMETIC. Publicación N° JP2005306818 A. Fecha Publicación 4 Noviembre 2005. (Citado Octubre 2009)
17. JIMENEZ, Marco. Estudio de la Prefactividad para Macadamia. Website:<http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%invertir/nueces/macadamia/epfmacad.pdf>. (Consulta 2 Noviembre 2009).
18. ANACAFE. CULTIVO DE MACADAMIA. Asociación Nacional de Café. Programa de diversificación de ingresos en la empresa cafetalera. Agosto 2004. Disponible en: <http://portal.anacafe.org/Portal/Documents/Documents/2004-12/33/16/Cultivo%20de%20la%20Nuez%20de%20Macadamia.pdf>
19. HAENG Choseon, JEONG Kimen, HONG Yuksun. Pharmaceutical Compositions For Hypercholesterolemia Treatment Using Of Self Microemulsifying Drug Delivery System. Publicación N° KR20020042218. Publicación 6 Mayo 2002.
20. MACADAMIA UNA NUEVA ALTERNATIVA. Fecha Publicación 8 Junio 2004. (Consulta Noviembre 2009). Disponible en: <http://www.delalba.com>
21. GARCIA. A, ARANGO. B, EL CULTIVO DE LA MACADAMIA EN COLOMBIA. Signatura 6D, 6Da, 7Saya, 9Hdd, 1988. Chinchiná (Colombia). Cenicafé, 1988. 20p. (Consulta Noviembre 2009).

22. GARCIA. A, ARANGO. B. KINDAL-KINDAL: MACADAMIA. Signatura 6D, 6Da, 7Saya, 9Hdd, Registro 08794. Chinchiná (Colombia), Cenicafé, 1988. 30p. (Consulta Noviembre 2009).
23. KAIJSER Anna, DUTTA Paresh, SAVAGE Geoffrey. Oxidative Stability and Lipid Composition of Macadamia Nuts Grown in New Zealand. Journal Food Chemistry, Vol 71, Issue 1, Octubre 2000, Pág 67-70. DOI: 10.1016/S0308-8146(00)00132-1. (Consulta Noviembre 2008).
24. RINCON, S. Ovidio. Revista ESSO AGRÍCOLA. Compañía ESSO Colombia. Volumen 36, N° 3, Diciembre 1989, pág (22-27). Hemeroteca Universidad Tecnológica Pereira.
25. THE PLANTS DATABASE. Taxonomía y nomenclatura *M. Intergrifolia* and *Tetraphylla*. TSN 503635. ITIS STANDAR REPORT. (Consulta Octubre 2009)
26. CEDEÑO. Luis, CARRERO. Chrystian. Antracnosis en Plántulas de Macadamia causada por *Glomerella cingulata*. Asociacion Interciencia ISSN 0378-1844 versión impresa. Volumen 27 N° 10 Caracas, Octubre 2002.
27. ARMADANS, R. Andrés, J. Comportamiento de tres variedades de Macadamia (*Macadamia Intergrifolia*) en el Departamento Central. Universidad Nacional de Asunción, Paraguay. Revista de Ciencia y Tecnología Volumen 1 N° 3, 2001.
28. GAMELIER, Lemuss. El Cultivo de la Macadamia (*Macadamia Intergrifolia*). Ministerio de agricultura de Chile. Junio 2004. Proyecto FIA Fundacion para la Innovacion Agraria N° C.96-I-1-025.
29. VILLEGAS, G. Clemencia. El Cultivo de la Macadamia en la Zona Cafetera Colombiana. AVANCES TÉCNICOS CENICAFÉ. Mayo 1996. Revista 227. Hemeroteca Universidad Tecnológica Pereira.
30. VILLEGAS, B. José. BONILLA; C. Mario. VALIENTE, M. Henry. Macadamia, la Nuez más fina del Mundo. Revista Abriendo Surcos. (Consulta Octubre 2009). Disponible en: <http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/revistas/081/ca081.pdf>
31. CVALETTTO, G. Catherine. MACADAMIA NUT. Department of Tropical Plant and Soil Science. University of Hawaii at Manoa, Honolulu. Disponible en: <http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/159macadamia.pdf>
32. VILLEGAS, G. Clemencia.. Enfermedades de la macadamia en la zona cafetera central. AVANCES TÉCNICOS CENICAFÉ. Junio 1996. Revista 228. Hemeroteca Universidad Tecnológica Pereira.
33. MACADAMIA INTERGRIFOLIA / PROTEACEA. Aspectos técnicos sobre cuarenta y cinco cultivares Agrícolas de Costa Rica. San Jose, Costa. Disponible en:[http://www.mag.go.cr/biblioteca\\_virtual\\_ciencia/tec\\_macadamia.pdf](http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/tec_macadamia.pdf)

34. CAREY, A. Francis. QUIMICA ORGÁNICA. Organic Chemistry. Mc Graw Hill Company. Sexta Edición 2006, Capítulo 26, pág 1083. ISBN 970-10-5610-8.
35. BAILEY. Alton, E. Industrial oil and fat products. Second Edition, Capítulo 1. Pág 4. ISBN 8429179011. Año 1984. Editorial Reverté, S.A.
36. Libro Virtual: Grasas y Aceites en la nutrición humana. Consulta FAO/OMS de expertos. Estudio FAO alimentación y nutrición 57. Roma Octubre de 1993. ISBN 92- 5- 303621-4
37. PRIMO, Y. Eduardo. Química Orgánica Básica y Aplicada. Editorial Reverté. Tomo II, Capítulo 36, pág 927. Universidad Politécnica de Valencia.
38. FERNANDEZ, T. Antonio, C. PAREDES, S. Revista Técnicas de Laboratorio. ISSN 0371-5728. Tomo XXVI. Nº 296, Noviembre 2004, pág 894. Hemeroteca Universidad Tecnológica.
39. MORRISON, T. Roberth. BOYD, N. Robert. QUIMICA ORGANICA. ISBN 9684443404. Quinta Edición. Capítulo 37, pág 1241. Pearson and Edison Wesley company, México 1998. (Consulta Octubre 2009)
40. PETRUCCI H, Ralph. GENERAL CHEMISTRY, principles and modern applications. The Macmillan Company. New York 1972. Pág 531
41. BRAVERMAN S, J B. Introduction to the Biochemistry of Foods. El Sevier publishing company. Amsterdam. Segunda Edición. Impreso en España. Ediciones Omega S.A. Barcelona 1978. ISBN 8428201617. Pág 235
42. CALDERON, G. Carlos E. LAS VITAMINAS EN LOS COSMÉTICOS. Razones de su empleo. Revista Normas & Calidad. Instituto Técnico Colombiano de Normas Técnicas ICONTEC Nº 13. Año 7. ISSN 0120-6699. Primer semestre 1991, Pág 47.
43. VIDAL C. Carmen. ESTEROLES VEGETALES, Un caso de compuestos revalorizados por sus efectos saludables. Catedrática de Nutrición y Bromatología. Universidad de Barcelona. (Consulta Noviembre 2009)
44. MARTINEZ M. Alejandro. ESTEROLES. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquía. Medellín. Abril de 2002
45. Norma Colombiana ICONTEC N. 432. Grasa y Aceites. Método de determinación de la densidad. Instituto Colombiano de Normas Técnicas, Santa fé de Bogotá 1999.
46. MATISSEK, R., SCHNEPEL, F., STEINER, G., Análisis de alimentos: Caracterización de Grasas y Aceites. Berlín, Alemania. 1992. Editorial Springer-Verlag GMBH&Co. K6. Pág 1-4

47. Norma Colombiana ICONTEC N. 286. Grasa y Aceites. Método de determinación del índice de refracción. Instituto Colombiano de Normas Técnicas, Santa fé de Bogotá 1969
48. MATISSEK, Reinhard; SCHENEPEL, Frank-M; STEINER, Gabriele. Análisis de los alimentos. Zaragoza España. Editorial, Acriba, S.A. 2000. Pág 44-54.
49. Norma Colombiana ICONTEC N. 218. Grasa y Aceites Comestibles. Método de determinación de Acidez. Instituto Colombiano de Normas Técnicas, Santa fé de Bogotá 1999
50. Bernal, I:D,R. Sustancias Grasas, Análisis de Alimentos, Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Colección Julio Carrizosa Valenzuela. N.2. Santa fé de Bogotá 1993. (Citado Noviembre 2009).
51. Norma Colombiana ICONTEC N. 335. Grasa y Aceites. Método de determinación del índice de saponificación. Instituto Colombiano de Normas Técnicas, Santa fé de Bogotá.
52. Norma Colombiana ICONTEC N. 283. Grasa y Aceites. Método de determinación del índice de yodo. Instituto Colombiano de Normas Técnicas, Santa fé de Bogotá 1969.
53. Tecnología de los Aceites Vegetales: con especial referencia al aceite de oliva. Garoglia, Pier Giovanni. Argentina, Universidad Nacional de Cuyo 1950.
54. Norma Colombiana ICONTEC N. 236. Grasa y Aceites Comestibles. Método de determinación de Peroxidos. Instituto Colombiano de Normas Técnicas, Santa fé de Bogotá.
55. Mc. NAIR, H.M and JM MILLER, Basic gas Chromatography. Edición I JHON WILLEY & SONS. 1997. Pág 177-183.
56. PARDO, V. La importancia de las Vitaminas en la Nutrición de personas que realizan actividad físico deportiva. Revista Internacional de Medicina y Ciencias de la Actividad Física y el Deporte. No. 16. 2004. Hemeroteca Universidad Tecnológica de Pereira.
57. Sánchez Z, Carla. Oteiza B, Vanesa. de la Poza T, Alejandra. Linares S, Marta Pulido M, Nieves. Cromatografía. Pág 7-19. Universidad Autónoma de Madrid. Disponible: [http://www.uam.es/personal\\_pdi/ciencias/manchi/alim/trabajo\\_4.PDF](http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/manchi/alim/trabajo_4.PDF)
58. SKOOG, D; HOLLER, F; NIEMAN, T; Principios de Analisis Instrumental. Quinta Edicion. McGraw-Hill. España. 2001.
59. Agenda Interna para la Productividad y la Competitividad. Sector de oleaginosas, aceites y grasas. Serie documentos sectoriales. (Consulta Noviembre 2009).

60. LONDOÑO, D. Bibiana, A. Diagnostico actual de la Oleoquímica en Colombia. Hemeroteca Universidad Tecnológica Pereira. 2004.
61. BERNARDO, G. Gbriel. ONETO, Cristiano. ANTUNES Paulo. RODRIGUEZ, Fátima. EMPIS, José. Extracion of Lipids from Cherry Seed Oil using Supercritical Carbon Dioxide. European Food Research and Technology. Volumen 212. Nº 2. Enero 2001. Pág 170-174. Doi 10.1007/s002170000228 .
62. VASCONCELLOS. Andrés, J. Alimentos Funcionales, Conceptos y Beneficios para la Salud. The World of FOOD SCIENCE. Departamento de Ciencias de Alimentos y Nutrición. Universidad Chapman, California, EEUU. Disponible en: <http://fbio.uh.cu/bqesp/nutricion/alimentosfuncionales.pdf>
63. DRAGO, S. Maria, E. LÓPEZ, L. Marisol. SAINZ, E. Teresita del Rosario. Componentes Bioactivos de los alimentos funcionales de origen vegetal. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Volumen 37, Nº 4, pag 57, Diciembre 2006. (Citado Noviembre 2009)
64. ALVÍDREZ, M. Alicia. GONZÁLEZ, M. Blanca, E. JIMÉNEZ, S. Zacarías. Tendencias en la Producción de Alimentos Funcionales. Revista Salud Pública y Nutrición. Volumen 3, Nº 3, 2002. Facultad de Salud y Nutrición. Universidad Autonoma de Nuevo León, México. (Citado Noviembre 2009)
65. OSUNA, CASTRO. J,A. PAREDES, LÓPEZ. O. Mejoramiento de Características y Calidad Alimentarias y Nutracéuticas de Plantas Mediante Biotecnología Molecular. Disponible en:<http://biblioteca.uson.mx/digital/libroselect/pdf/CE05.pdf>
66. SAVATÉ, Joan. NUT COMPOSITION AND BODY WEIGHT. Mayo, 2006. Disponible en: [www.ajcn.org](http://www.ajcn.org) y [http://www.optimalhealthpartner.com/A\\_Archive/Sabate\\_NutConsumptionBodyWeight.pdf](http://www.optimalhealthpartner.com/A_Archive/Sabate_NutConsumptionBodyWeight.pdf)
67. L. S. Maguire; S. M. O'Sullivan; K. Galvin; T. P. O'Connor; N. M. O'Brien. Fatty Acid Profile, Tocopherol, Squalene and Phytosterol content of Walnuts, Almonds, Peanuts, Hazelnuts and the Macadamia Nut. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 1465-3478, Volume 55, Issue 3, 2004, Pages 171.
68. KORNSTEINER, Margit. WAGNER, Karl-Heinz. ELMADFA, Ibrahim. Tocopherols and total Phenolics in 10 different Nut types. Department of Nutritional Sciences. University of Viena, Austria. Journal Food Chemistry, Volumen 98, Issue 2, 2006, Pag, 381-387. Doi:10.1016/j.foodchem.2005.07.033
69. SOLONA, Gerardo. Cosmecéuticos, frontera entre la cosmética y la dermatología. Tendencias Nº. 97. Octubre de 2007.

70. JAYES, R. Pedro, G. LEON, A. Jorge, L. NAVAS. Rosa, P. PEREZ, S. Juan, F. Aceites Esenciales de nueve plantas nativas de Guatemala. Universidad San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Disponible:[http://digi.usac.edu.gt/bvirtual/investigacio\\_files/INFORMES/PUIDI/INF-2006-030.pdf](http://digi.usac.edu.gt/bvirtual/investigacio_files/INFORMES/PUIDI/INF-2006-030.pdf) (Consulta Noviembre 2009)
71. Draelos Zoe, Diana. Dermatología Estética. Editado por serie Jeffrey Dover. Capítulo 1, 2 y 3. ISBN 84-8°74-923-0. Libro Virtual. (Consulta Julio 2009)
72. ALCALDE, Maria Teresa. Alimentos Usados en formulación cosmética. OFFARM. Ambito Farmacéutico. Marzo 2007. Volumen 26. Numero 03. España.
73. MATOS; M. Paloma. CHOTTEN, Reinaldo. Elaboracion y Evaluacion Sensorial de Cremas de Aceite de Nuez y Pulpa de Pequí (*Caryocar Brasiliense*). Tesis para Ingeniero Agronomo. Universidad Earth. Guacimo, Costa Rica. 2004. Disponible en:<http://usi.earth.ac.cr/glas/sp/dpg/2001020.pdf>
74. PLETNEV, M. Y. Innovacion en cosméticos y productos de cuidado personal. Journal SOFW, Volumen 129, N° 4, 2003. ISSN 0942-7694.
75. BENAIGES, Aurora. Aceite de rosa mosqueta. Composición y Aplicaciones Dermocosméticas. Junio 2008. (Citado Febrero 2009).
76. ASLAM, MN. LANSKY EP. VARANI, J. Cosmética y Cosmeceúticos: Definiciones y principios básicos. Department of Pathology. Universidad de Michigan, Escuela médica, EE.UU. 2006.
77. HENNETH A. Walters. MICHAEL S. Roberts. Dermatologic, cosmeceutic and cosmetic development. Therapeutic and novel approaches. Information health care, pág 305.
78. DUREJA, Harish. Cosmeceuticals: An Emerging Concept. Department of Pharmaceutical Sciences. Indian Journal of Pharmacology. Volumen 37, Issue 3, Pág 155-159. 2005. Doi: 10.4103/0253-7613.16211. (Consulta Noviembre 2009).
79. 58. WALKER, John. Chromatography fundamentals, applications, and troubleshooting. p.11, 12, 34-39, 56, 86.
80. 59. DROGUET, M; GUTIERREZ, M. la cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor.2002. (Citado 15 mar 2009).p.37.
81. 60. BARLUENGA, José; BEYER, Hans y WALTER, Wolfgang. Manual de química orgánica. 19 edición. Editorial Reverté. 1987. p.34.



- 82.** 61. QUATTROCCHI, Oscar; DE ANDRIZZI, Sara y LABA, Raúl. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Capítulo 10. análisis cuantitativo. 1992. p.31, 33,41,91,92,106,109,138,139,154,156,157.
- 83.** BARANOVA, C. Marcia. SANCHO, B. Ellen. Guanábana y Macadamia fruticultura Tomo II. Libro electrónico pág 72.
- 84.** Vargas, Elías. Jiménez, C. Ronald. Modelo para el balance de materia en el procesamiento de la macadamia (*Macadamia integrifolia*) a nivel de planta agroindustrial. Universidad de Costa Rica, CenLro de Investigaciones en Granos y Semillas. 1999.
- 85.** PORTER, Guy. YOST, Russell. NAGAO, Mike. The application of macadamia nut husk and shell mulch to mature *macadamia integrifolia* to improve yields, increase nutrient utilization, and reduce soil P levels. Department of Tropical Plant and Soil Science. University Hawaii-Manoa. Western Nutrient Management Conference. 2005. Vol. 6. Page 226 – 233.
- 86.** ZHENLY, He. YANG, Xiaoe. BRIAN, Kahn. STOFFELLA, Peter. CALVERT, David. Plant Nutrition Benefits of Phosphorus, Potassium, Calcium, Magnesium and Micronutrients from Compost Utilization. Capítulo 15, pag 314.
- 87.** BITTENBENDER HC ; Hue NV ; Fleming K ; Brown H. Sustainability of organic fertilization of macadamia with macadamia husk-manure compost. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 1998 Vol.29,No.3-4.
- 88.** VAN-ZWIETEN, Lukas. AYRES, Matthew. MORRIS, Steve. Macadamia husk compost improves soil health in sub-tropical horticulture. Dept. Primary Industries, Centre for Tropical Horticulture, University of Sidney, Australia.2004. SuperSoil 2004: 3rd Australian New Zealand Soils Conference, 5 – 9 December 2004, University of Sydney, Australia.
- 89.** MONTERO-GONZÁLEZ, A. The effect of growing medium on the growth of macadamia (*Macadamia integrifolia*) seedlings, in Costa Rica. Biblioteca Luis D. Tinoco: Tesis 9462, Tesis, Licenciatura en Ingeniería Agrónoma. 1986.
- 90.** MONTERO G, A.; GONZÁLEZ V, O.; Blanco, F.A. Efecto del sustrato en el crecimiento de plantas de macadamia (*Macadamia integrifolia*) en vivero. Boletín Técnico - Estación Experimental Fabio Baudrit M. (Costa Rica). Ene-Mar 1988. v. 21(1) p. 10-17.

- 91.** OSES, M; BADILLA-FERNÁNDEZ, Francisco. Evaluación de tres dietas artificiales para la cría en laboratorio del taladrador de la nuez de macadamia, *Ecdytolopha torticornis* (Lepidoptera: Tortricidae). IV Congreso Costarricense de Entomología, San José, CR, 17-21 de noviembre de 1997. Biblioteca OET: 595.7 R435re, p. 71. Año 1997. Editorial San José, Asenco, Costa Rica.
- 92.** VÁSQUEZ, G. Pablo, A. Informe final de Diagnóstico, Investigación y Servicios, de la Finca San Sebastián, San Miguel Dueñas, Sacatepéquez. Informe Investigación. Universidad San Carlos, Guatemala, Facultad de Agronomía. Agosto de 2005.
- 93.** SERRANO, A. Luis, O. Producción de carbón vegetal mediante carboneras en zonas rurales empobrecidas. Universidad Carlos III de Madrid. Departamento de Ingeniería Térmica y de Fluidos. 2009.
- 94.** A. AHMADPOUR. D, Do. The preparation of activated carbon from macadamia nutshell by chemical activation. Department of Chemical Engineering, University of Queensland, Brisbane, Australia. Carbon, Volumen 35, Issue 12, 1997, Pages 1723-1732. Doi: 10.1016/S0008-6223(97)00127-9.
- 95.** M, Evans. E, Halliop . A, MacDonald. The production of chemically-activated carbon. Department of Chemistry and Chemical Engineering, Royal Military College of Canada. Carbon Volumen 37, Issue 2, February 1999, Pages 269-274. doi:10.1016/S0008-6223(98)00174-2.
- 96.** DOMINGUEZ, L.Irma. AZUARA, Ebner. CARTER, V. Eduardo. BERISTAIN, Cesar. THERMODYNAMIC ANALYSIS OF THE EFFECT OF WATER ACTIVITY ON THE STABILITY OF MACADAMIA NUT. Journal of Food Engineering. Volume 81, Issue 3. Pág 566-571. Universidad Veracruzana. Enero 2007.
- 97.** SOUZA, Denise. ANTONIASSI, Rosemar. CORDEIRO, Sidinéa. RIBEIRO, Humberto. ESTABILIDADE OXIDATIVA DOS ÓLEOS DE MACADAMIA E DE PISTACHE. CEPPA Curitiva. Volumen 25, N° 1. Pág 141-155. Enero-Junio 2007.
- 98.** VEGA, T. Alberto. CARACTERIZACIÓN Y PROCESAMIENTO DE NUECES. Libro Virtual: Guía para la elaboración de Aceites comestibles. UPAR. ISBN 958-698-160-6.

- 99.** MODDLEY, Roshila. KINDNESS, Andrew. JONNALAGADDA, Sreekanth. ELEMENTAL COMPOSITION AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF FIVE EDIBLE NUTS CONSUMED IN SOUTH AFRICA. University of KwaZulu-Natal, South Africa. DOI 10.1080/03601230701391591. Junio 2007. Pág 585-591.
- 100.** K.S. Ebrahim, D.G. Richardson, R.M. Tetley, S.A. Mehlenbacher. OIL CONTENT, FATTY ACID COMPOSITION, AND VITAMINA E CONCENTRATION OF 17 HAZELNUT VARIETIES, COMPARED TO OTHER TYPES OF NUTS AND OIL SEEDS. ISHS Acta horticulturae 351. (Consulta 15 Junio 2009).
- 101.** WINSTON, W. Joxnes. SHAW, Lily. PLANT PHYSIOLOGY. The process of oil formation and accumulation in the Macadamia. Volumen 18, N° 1.
- 102.** MEHRAN, Mostafa. OIL CHARACTERISTICS OF IRANIAN WALNUTS. Department of Food Science. College of Agriculture. University Tehran, Karaj, Iran. Pág 477. Web
- 103.** BAYDAR, G. Nilgun. OSKAN, Gulcan. SEMA, C. Emine. CHARACTERIZATION OF GRAPE SEED AND POMACE OIL EXTRACTS. University Suleyman Demirel. Faculty of Agriculture, Isparta-Turkye. Grasas y Aceites N° 58 (1). Enero-Marzo 2007. ISSN 0017-3495.
- 104.** GIRALDO, J. Angelica, M. HENAO, T. Diana. Caracterizaciones físicas y químicas del aceite de las crisálidas recién sacrificadas *Bombix Mori L* de la raza Japonesa K05x530. Tesis Universidad Tecnológica Pereira. 2006. Pág 35-38.
- 105.** JITNGARMKUSOL, Siwaporn. HONGSUWANKUL, Juthamas. TANANUWONG, Kanitha. Chemical compositions, functional properties and microstructure of defatted macadamia flours. Department of Food Technology. Faculty of Science. University Chulalongkorn, Bangkok, Thailand. Enero 2008.
- 106.** FURQUIM. Carolina. BITTENCOURT. Juliana. MATTIONI. Bruna. EVALUACION DE LA CALIDAD DE LOS ACEITES DE FRITURA UTILIZADOS EN RESTAURANTES DE FLORIANOPOLIS, SC, BRASIL. Universidad Federal de Santa Catalina. Presentación Poster XII congreso Latinoamericano de Grasas y aceites 2009.
- 107.** TOKIOKA, K. y KISHIMOTO, S. COSMETIC. Numero de publicación JP2001233752. Agosto de 2001. Patente Disponible en [ep.espacenet.com](http://ep.espacenet.com)
- 108.** MURAI, A. COSMETIC FOR GROWING AND RAISING HAIR. Número de publicación JP7033627. Febrero 1995. Patente Disponible en [ep.espacenet.com](http://ep.espacenet.com)

- 109.** FERNANDEZ, J. AGUILAR, M y PINEDA, M. CARACTERIZACIÓN DE ACEITES DE OLIVA VIRGENES DE LA PROVINCIA DE CORDOBA Y USO DE ANTIOXIDANTES COMO MARCADORES DE AUTENTIFICACIÓN. Departamento de Biología Vegetal. Universidad de Cordoba. España. 2001
- 110.** RODRIGUEZ, M. GARCIA, M. LOPEZ, M. SIMAL, J. BEBIDAS ENRIQUECIDAS CON ANTIOXIDANTES: Aspectos legales y etiquetado nutricional. Ciencia y Tecnología de Alimentos. Volumen 3. Número 3. 2001 pág. 173-179.
- 111.** Aceite de macadamia refinado DAC. Hoja de seguridad según 91/155/CEE. Marzo 25 de 2002. (Citado Diciembre 2009).  
Disponible en: <http://www.gustavheess.com/pdf/2185seg.pdf>.p.2.
- 112.** GARCÍA, G. Enrique. Alimentos - Determinación de Ácidos Grasos Cis-, Trans-, Saturados, Monoinsaturados Y Poli-Insaturados en Aceites y Grasas de origen vegetal o Animal de animales no rumiantes por Cromatografía Capilar Gas Líquido – Método de prueba. Proyecto de norma
- 113.** LÓPEZ, V. Juan, P. Estandarización de la técnica de Cromatografía de Gases acoplada a Espectroscopía de Masas para la identificación y cuantificación de Metil esterres de ácidos. 2007. Tesis Universidad Tecnológica Pereira. Disponible en: [www.utp.edu.co](http://www.utp.edu.co).
- 114.** CARRILLO, W. Tania, Y. Caracterización y evaluación del contenido de lípidos y ácidos grasos en nueve clones de *Gevuina avellana* Mol. Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile 2004.
- 115.** CONRADO S. Camilo. Análisis proximal de semillas no comunes: palma chilena (*jubaea chilensis*), cilantro (*coriandrum sativum*), mora (*rubus Glaucus*), rosa mosqueta (*rosa aff. Rubiginosa*) y caracterización de su aceite. Laboratorio de Química de Alimentos y Materias Grasas. Universidad de Chile. 2008.
- 116.** YANG, Jun. Rui Hai Liu, Linna Halim. Antioxidant and antiproliferative activities of common edible nut seeds. Department of Food Science, Stocking Hall, Cornell University, Ithaca, NY. Journal Food Science and Technology Vol 42, pág 1–8. (2009). Doi:10.1016/j.lwt.2008.07.007.
- 117.** LAGARDA, M. G. Garcia-Llatas, R. Farre. Analysis of phytosterols in foods. University of Valencia, Spain. Nutrition and Food Chemistry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Vol 41, pág 1486–1496. 2006.

118. MOYA, Manuel; VILAR, Juan; ESPÍNOLA, Francisco; FERNADEZ, Diego y MORENO, Maria. Evolución histórica de la calidad de los aceites de oliva y su relación con los procesos de obtención. (Citado 25 feb 2009), p.652.
119. SILVA, F; MARSAIOLI Jr; MAXIMO, G; SILVA, M.A.A.P and GONC,ALVES, L.A.G. Microwave assisted drying of macadamia nuts. Noviembre 2005. (Citado 2 mar 2009). p.555.
120. CIFUENTES, C. El aseo y desinfección en sericultura. Sericultura Colombiana, 5 (30): 3. 1999.
121. Belen, D, Lopez, I. Barranco, J. Caracterización fisicoquímica del aceite de semilla de Piritu (*Bactris piritu*). Grasas y Aceites, volumen 55, Fasc 2, 2004, 138-142.
122. Silverstein, R. Webster, F. Spectrometric identification of organic compounds. Sixth edition. Wiley-India Edition. Capitulo 2, pág 28.
123. MALAFFERTY, F. TURECEK, F. Interpretation of mass spectra. Cuarta Edición, ed. U.s books. 1993, Sausalito, California. Pág 266.
124. CHRISTIE, William W. Gas Chromatography and Lipids. Captiulo 7 “ Gas Chromatography – Mass Spectrometry and Fatty Acids. Publicado por P.J Barnes & Associates (The Oily Press Ltd). Bridgwater in 1989.