

**FUNDACIÓN FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS -  
FUNDAQUIM**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS – FCQ**

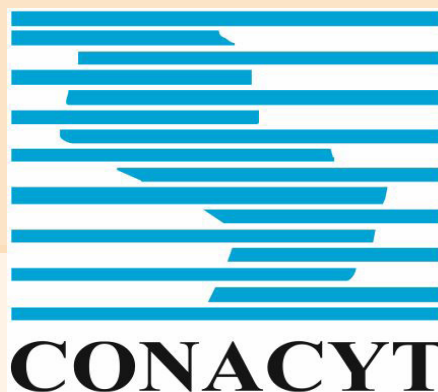
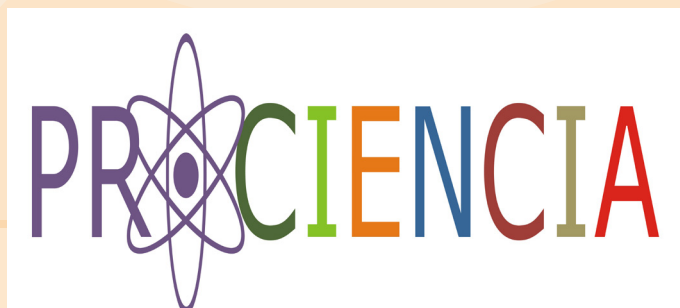
*Proyecto 14 INV 001*

*"Estudio del proceso de industrialización de nueces de macadamia, con calidad de exportación"*

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS  
ANALÍTICOS  
PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE  
NUECES DE MACADAMIA SECAS**



**LAURA MERELES Y KAREN MARTINEZ**



**AGRADECIMIENTOS:**

Este proyecto fue financiado por CONACYT a través del Programa PROCIENCIA con recursos del Fondo para la Excelencia de la Educación e Investigación - FEEI del FONACIDE.

#### LOS AUTORES

**Laura Graciela Mereles Ceuppens** es Bioquímica, Master en Toxicología, y Doctora en Ciencias de los Alimentos. La Doctora es Docente investigador del Dpto. Bioquímica de Alimentos de la Dirección de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Químicas.

**Karen Patricia Martínez Jara** es Licenciada en Tecnología de Alimentos y Ingeniera Química. La Ingeniera es Docente investigador y Jefe del Dpto. Microbiología Industrial de la Dirección de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Químicas.

#### LOS COLABORADORES

Dra. Silvia Caballero  
BQ. Eva Coronel Mendez  
Dr. Javier Michajluk  
Dra. Patricia Piris  
Dra. Lourdes Wiszovaty  
Ing. Edelira Velázquez  
Vanessa Resquín  
Antonella Elizaur

#### AGRADECIMIENTOS ESPECIALES A:

Dra. Zully Vera de Molinas  
Decana de la Facultad de Ciencias Químicas  
Dr. Rubén Flores  
Vicedecano de la Facultad de Ciencias Químicas  
Dra. Silvia Caballero  
Directora de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Químicas  
Dr. Blas Vázquez  
Presidente de FUNDAQUIM

#### EDICIÓN Y DIAGRAMACIÓN

Noemí W. de Montiel  
Obispo Maíz 2288  
Asunción, Paraguay

IBSN:

1ª Impresión diciembre, 2017

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) - [www.conacyt.gov.py](http://www.conacyt.gov.py) SEDE 1: Dr. Justo Prieto N° 223 entre Teófilo del Puerto y Nicolás Billof, Villa Aurelia. Telefax: +(595-21) 506 223 / 506 331 / 506 369. Código Postal 1867 SEDE 2: Dr. Bernardino Caballero N° 1240 entre Eusebio Lillo y Teniente Vera, Barrio Herrera. Telefax: +(595-21) 606 774 .

*Proyecto 14 INV 001*  
*"Estudio del proceso de industrialización de  
nueces de macadamia, con calidad de exportación"*

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS  
PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE NUECES DE  
MACADAMIA SECAS**

**AUTORES**

*LAURA GRACIELA MERELES.*

*KAREN MARTINEZ*

**COLABORADORES**

*SILVIA CABALLERO*

*EVA CORONEL MENDEZ*

*JAVIER MICHAJLUK*

*PATRICIA PIRIS*

*LOURDES WISZOVATY*

*EDELIRA VELÀZQUEZ*

*VANESSA RESQUÍN*

*ANTONELLA ELIZUR*

<b>Índice General</b>	4
<b>PRÓLOGO</b>	9
<b>ANTECEDENTES</b>	10
<b>MUESTREO</b>	12
Sub-muestreo en laboratorio	13
Muestra compuesta:	13
Muestra simple:	15
<b>ANÁLISIS DE CALIDAD FISICOQUÍMICOS</b>	16
Características físicas. Medición del tamaño de la nuez	17
Humedad	18
Extracción de aceite para análisis del	
índice de peróxidos y acidez	19
Determinación del índice de peróxidos	21
Índice de acidez	22
Actividad de agua (aw)	23
Análisis de color	24

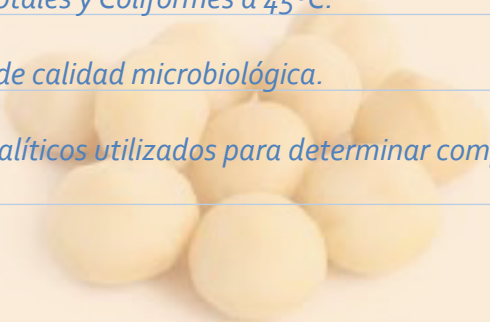
<b>ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS</b>	<b>26</b>
Caracterización microbiológica	26
<b>ANÁLISIS DE COMPOSICIÓN CENTESIMAL</b>	<b>31</b>
Proteínas	33
Digestión	33
Destilación	34
Titulación	34
Ceniza	35
Fibra alimentaria total	37
Azúcares totales	39
<b>Referencias</b>	<b>43</b>



## Lista de Tablas

---

<i>Tabla 1. Métodos analíticos utilizados para determinar la calidad de exportación de las nueces de macadamia</i>	16
<i>Tabla 2. Métodos para análisis microbiológicos de nueces de macadamia</i>	26
<i>Tabla 3. Temperatura y tiempo de incubación para recuento de Mohos y levaduras, Aerobios mesófilos totales y Coliformes a 45°C.</i>	27
<i>Tabla 4. Parametros de calidad microbiológica.</i>	30
<i>Tabla 5. Métodos analíticos utilizados para determinar composición de la nuez fresca y seca</i>	31



## Lista de Figuras

<i>Figura 1. A) Sub-muestras recibidas en el laboratorio, poscosecha (NIS) y sin cáscara, secas, envasadas en atmósferas controladas.</i>	12
<i>Figura 1. B) Equipo procesador de nueces enteras.</i>	12
<i>Figura 2. Muestreo y Preparación de muestras.</i>	14
<i>Figura 3. Esquema del sistema de muestreo por cuarteos, para reducir el tamaño de la muestra a una sub-muestra de análisis.</i>	15
<i>Figura 4. Nuez de macadamia con cáscara, medición de diámetro. a: diámetro longitudinal, b: diámetro transversal</i>	17
<i>Figura 5 Procedimiento de análisis de las características físicas de la NIS y el Kernel de macadamia, medición del tamaño de la nuez.</i>	18
<i>Figura 6. Determinación de humedad en balanza termogravimétrica</i>	19
<i>Figura 7. Sistema de extracción de matrices alimentarias para análisis, prensa Food PRESS CDR S.R.L. (Firenze, Italia).</i>	19
<i>Figura 8. Sistema de extracción de matrices alimentarias para análisis, prensa Food PRESS CDR S.R.L. (Firenze, Italia) y una centrifuga marca IRIS-ON Everex S.R.L. (Firenze, Italia).</i>	20
<i>Figura 9. Centrifugación del aceite recién extraído para clarificación del aceite de macadamia.</i>	20
<i>Figura 10. Determinación de índice de peróxidos en aceite de macadamia recién extraído en el equipo OXITESTER Junior.</i>	21
<i>Figura 11. Determinación de acidez en aceite de macadamia recién extraído en equipo OXITESTER Junior.</i>	22
<i>Figura 12. Equipo termohigrómetro con sonda para determinación de actividad de agua.</i>	23
<i>Figura 13. Cabina de luz para obtención de la imagen a ser analizada.</i>	25

<i>Figura 14. Muestras de macadamia secas, superficie externa y escala de colores de nueces de macadamia secas a tostadas.</i>	25
<i>Figura 15. Proceso de extracción de aceite de macadamia para determinación de lípidos totales por Soxhlet.</i>	33
<i>Figura 16. Sistema de Kjeldhal para la determinación de Proteínas, abajo, para la digestión y arriba para la destilación de N<sub>2</sub>.</i>	34
<i>Figura 17. Punto final de la titulación por retroceso con NaOH, para la cuantificar el contenido de nitrógeno total.</i>	35
<i>Figura 18. Proceso de calcinación de la materia orgánica de muestras en planchas calefactora y mufla a 550°C para determinación de ceniza.</i>	36
<i>Figura 19. Extracción de la muestra seca y desengrasada desde el cucurucho del Soxhlet para la determinación de fibra alimentaria.</i>	37
<i>Figura 20. Análisis de azúcares solubles por el método de la Antrona de Clegg. Preparación de la muestra. B) Reacción del reactivo de antrona.</i>	40
<i>Figura 21. Análisis de azúcares solubles por el método de la Antrona de Clegg. A) Preparación de la muestra. Reacción de la muestra con el reactivo antrona en medio sulfúrico.</i>	41



## PRÓLOGO

Las condiciones climáticas y de suelo de nuestro país resultaron propicias para la implantación de cultivos de *Macadamia integrifolia* y lo que parecía una especie exótica más se fue convirtiendo en un rubro de producción no tradicional que va ganando presencia en el mercado nacional y, mejor aún, que crece como recurso exportable.

El proceso hasta alcanzar niveles productivos ha sido lento y gracias a la visión y perseverancia de los pioneros, hoy la nuez de macadamia producida en el Paraguay ganó mercados internacionales. Este logro conlleva el gran compromiso de ofrecer un producto con características tales que lo hagan competitivo en los mercados de gran demanda, que se caracterizan por exigir la satisfacción de rigurosos criterios de calidad, sostenibles en el tiempo.

En nuestro medio, es común adoptar y adaptar criterios de calidad para diversos bienes y servicios, que pueden no resultar adecuados a las exigencias externas, o bien no contar con la aplicación sistemática de normas, muchas veces no concebidas ni probadas para las condiciones locales.

Demás está decir que los potenciales compradores de nuestra producción exigen disponer de volúmenes sostenibles en el tiempo de productos de calidad internacional y homogénea. Para satisfacer este último término se aunaron esfuerzos de la Fundación de Apoyo a la Facultad de Ciencias Químicas, la Facultad de Ciencias Químicas de la UNA y los productores locales de nuez de Macadamia para dar respuesta a algunos requerimientos de esta producción tan valiosa como delicada, y la propuesta fue valorada positivamente por el Programa PROCENCIA del CONACYT, que brindó el apoyo financiero oportuno.

El presente manual, desarrollado en el marco del proyecto 14 INV 001, pone en manos de los productores y los analistas una herramienta desarrollada con criterio científico y con base en experiencias de investigación, y su uso sistemático contribuirá a lograr el objetivo de apoyar la producción que satisface a los más exigentes mercados de la nuez de macadamia.

El propósito de la ciencia es el conocimiento y su medio eficaz de obtención es la investigación, y resulta particularmente gratificante observar los resultados de la aplicación sistemática de los métodos analíticos gestionados con rigor científico para el fortalecimiento de las actividades productivas.

En este manual, elaborado por profundos conocedores de sus materias específicas, se exponen detalladamente los procedimientos preanalíticos y analíticos para las cualidades fisicoquímicas, microbiológicas y de composición centesimal de la nuez de Macadamia, y es una prueba tangible de lo que se puede lograr cuando la academia, los productores y los gestores de apoyo a la ciencia y la tecnología actúan cooperativamente para fortalecer la riqueza nacional, al tiempo que se constituye en una contribución real al desarrollo y es una auténtica muestra del compromiso de sus autores con la sociedad y el progreso de los compatriotas.

Prof. Dr. Esteban Ferro B.

## ANTECEDENTES

---

El Paraguay es un país exportador incipiente de macadamia desde 2007, los principales mercados internacionales son Hong Kong, China Popular, Estados Unidos, Vietnam y Alemania. En los últimos años, la Red de Inversiones y Exportaciones REDIEX del Ministerio de Industria y Comercio, ha incentivado la exportación de macadamia, sin embargo, muchas oportunidades se han perdido por diferentes motivos relacionados con las exigencias de calidad, donde la prioridad es mejorar la calidad fisicoquímica de la nuez de macadamia. Actualmente, la mayor parte de la producción nacional, se destina a la venta local.

Las especificaciones de calidad fisicoquímicas y microbiológica establecidas e internacionalmente aceptadas en la mayoría de los mercados son humedad 1.5%, peróxidos 3 meq/kg, Ác. grasos libres 0,5 % máx, aflatoxinas totales 4ppb Máx, aflatoxina B<sub>1</sub> 2ppb Max; recuento total en placa inferior a 30.000 cfu/g, hongos y levaduras inferior a 20.000 cfu/g, *E. coli* inferior a 3 por mg, Salmonella no detectable en 250 mg, Coliformes inferior a 200 ufc/g, infestación por insectos nula, color crema uniforme "normal", apariencia libre de aceite en la superficie, polvo de nuez 0.2% Max, ningún material extraño y en cuanto al sabor y olor no contener presencia de malos olores ni sabores (AMS, 2013, Mereles y col., 2016). A nivel nacional, la Sociedad Paraguaya de Macadamia ha impulsado junto con el comité de expertos y gestión del INTN, la actual Norma paraguaya NP 15 004 15 sobre los Requisitos Generales de la nuez de macadamia seca (INTN, 2015), en la cual se establecen como valores máximos de tolerancia permitidos para el mercado local los siguientes; humedad 1,5 ± 0,3 %, índice de peróxido 5 meq O<sub>2</sub> /kg de aceite, índice de acidez: 1,0 mg KOH/g aceite o acidez 0,5 % de ácido oleico, aflatoxinas totales 4 partes por billón (ppb) y aflatoxina B<sub>1</sub> 2 partes por billón (ppb). La calidad de la macadamia depende de las condiciones de composición inicial de los frutos secos antes de someterlos al proceso de secado y los métodos por los cuales son elaborados, envasados y almacenados. La producción y la cosecha conllevan una gran variabilidad en la madurez, contenido de humedad, presencia de infestación por hongos y daños por insectos con las que llegan a los centros de acopio y procesamiento las nueces en cáscara (NIS). El secado es la técnica de conservación primaria y más extendida, elimina el agua disponible necesaria para el crecimiento microbiano, la

actividad enzimática, y reacciones químicas que disminuyen la calidad del producto final. Un problema encontrado durante el proceso es el pardeamiento interno, causado por una acumulación de azúcares reductores (glucosa y fructosa) en el centro del núcleo, que a su vez reaccionan con aminoácidos dando productos de pardeamiento no enzimático a través de reacciones de Maillard (Prichavudhi y Yamamoto, 1965; Mason, 2000; Wall y Gentry, 2007). Por otro lado, las nueces de macadamia son sensibles a la temperatura en función de su contenido de humedad. Cuando los frutos con alto contenido de humedad inicial se secan rápidamente a temperaturas superiores a 38°C, la sacarosa (el azúcar predominante en las nueces de macadamias frescas) puede someterse a hidrólisis para producir glucosa y fructosa, sustratos de la reacción de Maillard. En estas condiciones, se desarrolla el color marrón en los granos secos, por consiguiente, el pardeamiento se puede desarrollar en el centro del núcleo, o externamente, dependiendo de las condiciones de secado. La madurez fisiológica también influye en el pardeamiento, presencia de nueces inmaduras (con alta concentración de azúcar) pueden aumentarlo. La menor oxidación de los lípidos en macadamias tiene lugar en los frutos secos almacenados dentro de la zona de mínima entropía integral ( $a_w=0.436$ , 35°C), considerada como la actividad de agua en que las nueces de macadamia presentan una mayor estabilidad frente a la oxidación de lípidos y cambios en el color y textura (Domínguez, Azuara, Vernon-Carter y col., 2007).

El alcance de este manual está dado a los análisis de control de calidad fisicoquímica, nutricional, y microbiológica de las nueces de macadamia secas envasadas o no, los cuales son sumamente necesarios para establecer si las muestras representativas de un lote de producción han llegado en condiciones adecuadas que preserven su calidad como producto final y se ajustan a las especificaciones técnicas establecidas en las normativas nacionales e internacionales. Los análisis de evaluación propuestos para este proceso se basan en técnicas analíticas apropiadas, cuya rigurosidad y precisión juegan un importante papel en la confiabilidad de los resultados. Para la evaluación de la calidad nutricional se han ajustado las metodologías, basadas en métodos oficiales de la A.O.A.C. (2000), A.O.C.S. (2009). Controles de calidad: las pruebas analíticas serán efectuadas por triplicado. Los resultados obtenidos durante la investigación serán transferidos a MACPAR mediante cursos de entrenamiento y asesoría en la planta industrial.

Se espera que esta obra aporte se constituya en una herramienta práctica y útil para el sector productivo de nueces de macadamia, la cual se presenta en un lenguaje sencillo, y lo más específico posible para lograr el objetivo de asegurar un producto de buena calidad para los consumidores.

## MUESTREO

Son dos las formas en las que la muestra de nueces de macadamia podrían llegar al laboratorio para su análisis de control de calidad: en la primera situación, se consideran las nueces en su cáscara (NIS), las cuales deberán estar previamente descarpeladas y la segunda forma serían las nueces sin la cáscara (kernel en inglés), las cuales deben llegar envasadas adecuadamente (Figura 1 A.).



Figura 1. A) Sub-muestras recibidas en el laboratorio, poscosecha (NIS) y sin cáscara, secas, envasadas en atmósferas controladas.

Figura 1. B) Equipo procesador de nueces enteras.

La forma en que se toma una muestra para el análisis es la primera de una serie de fuentes potenciales de error en el análisis de alimentos.

Los resultados del análisis de un producto alimentario sólo son tan buenos como el método de muestreo que en él se lleva a cabo.

Una muestra debe ser representativa de la población o el lote de la que se ha tomado. La muestra perfecta sería, por supuesto, el 100% del material que se va a analizar. Sin embargo, es raramente posible o adecuado, de manera que se necesitan métodos para muestrear el sistema y obtener una parte representativa del sistema como un todo.

Si el alimento es homogéneo, cualquier muestra sería aceptable, sin embargo, tanto la NIS como el kernel de macadamia no lo son, por lo que existe la necesidad de moler y homogeneizar adecuadamente antes de someterlas a un análisis, mediante equipos apropiados (ver Figura 1 B), para la obtención de una sub-muestra uniforme.

La muestra a ser analizada, tanto la NIS como la nuez sin cáscara debe ser:

- Lo suficientemente grande para cubrir los requisitos de todas las determinaciones a las que se van a realizar.
- Bien almacenada, de manera que no se presenten cambios significativos en la composición antes del análisis.
- Claramente identificada; detallando la procedencia, peso total promedio, fecha de cosecha, especie y variedad (si procede), junto con cualquier información adicional que pueda probablemente servir de ayuda al analista.
- Bien conservada, cerrada y sellada en el caso de la nuez sin cáscara, principalmente evitar el contacto con la luz, el calor y el oxígeno del aire.
- Bien transportada, de manera adecuado para conservar los componentes de la nuez en su condición original.

### Sub-muestreo en laboratorio

---

#### Muestra compuesta:

---

En el caso que se reciban varios lotes de nueces en bolsas diferentes, se puede realizar lo que se denomina una "muestra compuesta" la cual se define como una mezcla de dos o más porciones obtenidas de diferentes bolsas. Una mezcla compuesta es sencillamente un intento físico de promediar la variación normal entre unidades o porciones de muestras individuales. Como la muestra compuesta tiene que ser representativa, las submuestras de las unidades de muestra individuales no sólo deben tomarse correctamente, sino que todas deben ser aproximadamente del mismo tamaño, peso o volumen.

Una muestra compuesta se forma inicialmente submuestreando dos o más porciones del mismo alimento. Un ejemplo sería el submuestreo de varias bolsas de NIS de macadamia que llegan al centro de acopio de un mismo productor o lote de envío.

A continuación se combinan y mezclan estas submuestras de tal forma que una porción tomada de la muestra compuesta sea representativa del conjunto. Su tamaño se determinará en función de los análisis requeridos y los métodos de análisis empleados.

Una vez obtenida la submuestra, se la debe hacer uniforme, mediante la mezcla física de las unidades muestreadas, el troceado y/o trituración será necesario



## MUESTREO

exclusivamente para los análisis de composición centesimal y actividad de agua.

Como la homogeneización tiende a aumentar la tasa de hidrólisis enzimática (enranciamiento), para los análisis de composición centesimal, las nueces de macadamia una vez homogeneizadas, se deben conservar a temperaturas de congelamiento ( $-8^{\circ}\text{C}$  a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) en un envase de plástico hermético hasta el momento de su análisis.

En la figura 1 se muestra un esquema simplificado de los pasos por los cuales pasa la nuez de macadamia durante su muestreo, desde la finca hasta la obtención de la sub-muestra y contramuestra.



Figura 2. Muestreo y Preparación de muestras.

- 1) ESTANTES DE SECADO DE NUECES EN SU CÁSCARA NIS (EN FINCA)
- 2) BOLSAS DE MUESTRAS DE 20 K
- 3) SUB-MUESTRAS DE 2 K
- 4) EXTRACCIÓN DE LA NUEZ
- 5) HOMOGENEIZACIÓN
- 6) MUESTRA MOLIDA
- 7) CONTRAMUESTRA A GUARDAR A  $-20^{\circ}\text{C}$

### Muestra simple:

Cuando el laboratorio de análisis recibe un solo lote o bolsa a analizar, ya sea de NIS o de kernel de macadamia, estamos hablando de una muestra simple, en la cual se debe proceder a realizar un muestreo para obtener una sub-muestra representativa y dejar una contramuestra para la confirmación de análisis en caso que se requiera.

Para este efecto se deberá realizar la técnica de cuarteo para obtener una submuestra para el análisis a partir de la cantidad total recibida por lote, por ejemplo, para el análisis de la control fisicoquímico de las nueces de macadamia, se requerirán como mínimo 2 kg de NIS.

El método de muestreo consiste en reducir el tamaño de toda la muestra hasta una porción apropiada para el análisis. El procedimiento para obtener una submuestra por cuarteo es el siguiente y se muestra en la Figura 3:

- Las nueces de macadamia (NIS o Kernel) se colocan en una superficie plana y se extiende en una capa gruesa.
- Se dividen en 4 partes iguales.
- Se descartan dos de los cuartos opuestos entre sí eliminando el material contenido en ello.
- Se mezclan las dos partes restantes hasta homogenizar la muestra y se extiende nuevamente sobre la superficie.

Se repite la operación de reducción y homogenización hasta conseguir el peso o tamaño adecuado de la muestra (generalmente 1 Kg de NIS o 300g de Nueces de macadamia sin cáscara son suficientes para el análisis).

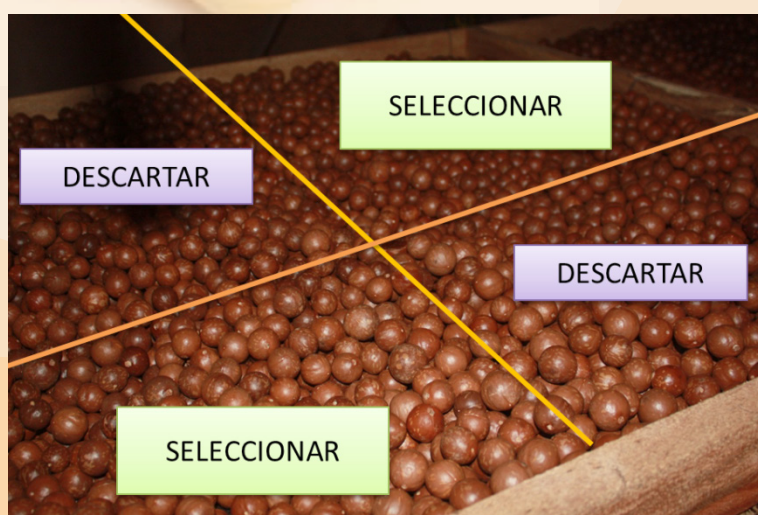


Figura 3. Esquema del sistema de muestreo por cuarteos, para reducir el tamaño de la muestra a una sub-muestra de análisis.

**ANÁLISIS DE CALIDAD FÍSICOQUÍMICOS**

Las determinaciones de control de calidad fisicoquímica de las nueces de macadamia incluyen normalmente el análisis de índice de acidez, índice de peróxidos, actividad de agua y color (Mereles y col., 2016). Las metodologías recomendadas para estos objetivos se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Métodos analíticos utilizados para determinar la calidad de exportación de las nueces de macadamia

<b>Determinación</b>	<b>Método</b>	<b>Fundamento</b>
Humedad	Método oficial A.O.C.S. Ca 2b-08, en balanza termo gravimétrica, a 105°C.	Termogravimétrico
Índice de peróxidos	Método AOCS Cd-8-53 a partir del aceite de macadamia en un equipo Oxitester cdR Junior® (Firenze, Italy). Certificado ISO 9001. N° 9115.	Colorimétrico.
Índice de acidez	Método AOCS Ca 5ª-40 en un equipo Oxitester en un equipo cdR Junior® (Firenze, Italy). Certificado ISO 9001. N° 9115.	Colorimétrico.
Actividad de agua (aw)	Método oficial AOCS Cc 10C-95.	Gravimétrico.
Color	Coronel & Mereles, 2017. Ref. Cernadas et al, 2017.	Colorimétrico. Análisis de imagen.



### Características físicas. Medición del tamaño de la nuez

Para determinar el tamaño de la NIS y el kernel, se recomienda utilizar el método previamente descrito por Mereles y Ferro (2015) y Masson, Torija y Camilo (2008).

#### Procedimiento para la medición de la nuez:

- Se toma al azar una cantidad representativa de frutos (NIS) de cada lote recibido.
- Realice un cuarteo tantas veces como sea necesario para reducir el tamaño de la muestra a aproximadamente 1 Kg de NIS.
- Seleccione 30 unidades de NIS al azar a partir de los 1 kg obtenidos del cuarteo.
- Pese las 30 unidades de NIS individualmente en una balanza analítica y anotar su peso exacto (con tres cifras significativas).
- Mida individualmente el diámetro longitudinal y transversal de las 30 unidades (**Fig. 19**), mediante el empleo de un calibrador deslizante.
- Rompa cada NIS y retire por fractura mecánica la cáscara para obtener la nuez comestible.
- Pese individualmente cada nuez y para calcular el peso promedio de las 30 unidades (Figura 4)

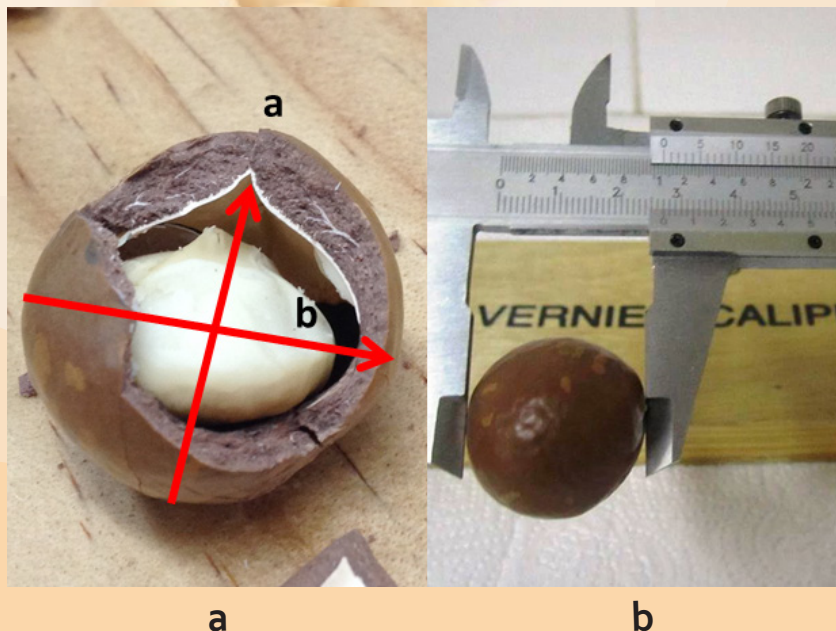


Figura 4. Nuez de macadamia con cáscara, medición de diámetro.  
a: diámetro longitudinal, b: diámetro transversal



Figura 5 Procedimiento de análisis de las características físicas de la NIS y el Kernel de macadamia, medición del tamaño de la nuez.

### Humedad

La humedad de las nueces se determina por el método de la balanza termogravimétrica, por ejemplo XM 60-HR (Precisa).

#### *Procedimiento para determinar la humedad:*

- Se enciende la balanza termogravimétrica, la cual debe estar ubicada en una zona libre de corriente de aire (Figura 6).
- Se selecciona el método preestablecido previamente por un programa que funciona a 105°C hasta peso constante.
- Se pesa exactamente 1,000 gramo de muestra bien homogeneizada y se distribuye uniformemente en el platillo de la balanza.
- Se cierra la tapa de la balanza y automáticamente se acciona la luz halógena para el calentamiento y análisis de humedad.
- Este procedimiento debe realizarse por quintuplicado para cada lote de muestra o submuestra.
- Se anota el % de humedad que aparece en la pantalla de la balanza termogravimétrica siguiendo las instrucciones del manual de cada equipo.

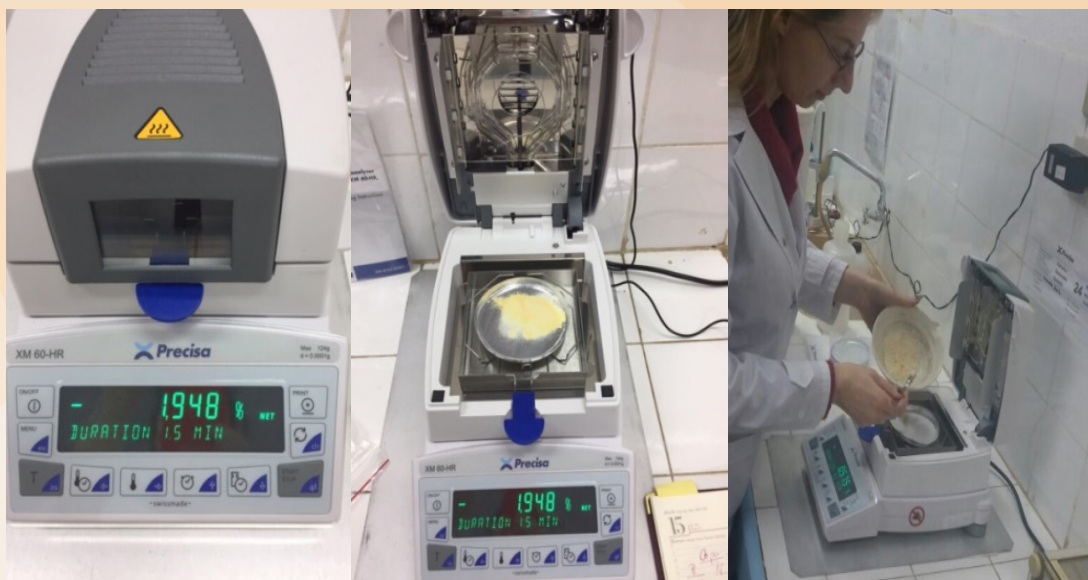


Figura 6. Determinación de humedad en balanza termogravimétrica

Extracción de aceite para análisis del índice de peróxidos y acidez

El análisis del índice de peróxidos y acidez en la nuez requiere la extracción de su aceite, inmediatamente antes de su análisis, ya que una vez extraído el aceite puede empezar un proceso de enranciamiento favorecido por altas temperaturas o la exposición a la luz o humedad ambiental en el ambiente del laboratorio, esta extracción se recomienda realizarla en frío mediante una prensa que permita obtener pequeña cantidad de aceite, de 1-3 mililitros (mL), como se muestra en la Figura 7.



Figura 7. Sistema de extracción de matrices alimentarias para análisis, prensa Food PRESS CDR S.R.L.(Firenze, Italia).





Figura 8. Sistema de extracción de matrices alimentarias para análisis, prensa Food PRESS CDR S.R.L.(Firenze, Italia) y una centrifugadora marca IRIS-ON Everex S.R.L.(Firenze, Italia).

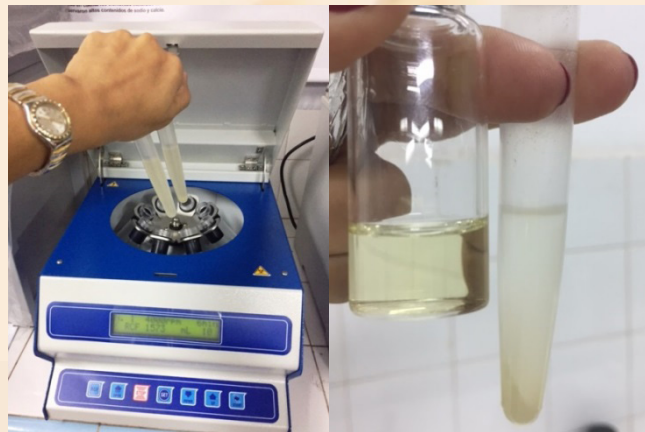


Figura 9. Centrifugación del aceite recién extraído para clarificación del aceite de macadamia.

El procedimiento para la extracción del aceite (Figura 8 y 9) es el siguiente:

- Una vez quebradas las nueces se dispone en una capa única en el contenedor y se coloca el punzón (ver Figura 9).
- Posteriormente se coloca el recipiente en la prensa y se gira la palanca en dirección horaria.
- El aceite se recoge con ayuda de una pipeta de plástico en un tubo de plástico de 15 mL.
- Centrifugar a 4000 rpm durante 6 minutos.
- A partir del aceite sobrenadante se realizan las determinaciones del índice de peróxidos e índice de acidez, por triplicado.

### Determinación del índice de peróxidos

El índice de peróxido se determina por el AOCS Official Method Cd 8-53, a partir del aceite de macadamia recién extraído, en un equipo OxiTester Junior (CDR).

El fundamento de este análisis es que los radicales libres oxidan los iones  $Fe^{2+}$  presentes en los reactivos, los iones  $Fe^{3+}$  resultantes de la oxidación se agrupan y forman un complejo rojo. Su intensidad colorimétrica, medida a 505 nm, es directamente proporcional a la concentración de peróxidos en la muestra. Los resultados se expresan como  $meqO_2/Kg$ .

El procedimiento que debe ser realizado por triplicado, siguiendo las instrucciones del equipamiento es el siguiente:

- Se verifican las conexiones eléctricas del equipo, una vez prendido se espera la auto calibración del mismo, se selecciona el test de peróxido en el rango de 0,3 a 25  $mEqO_2/Kg$ , para nueces de macadamia de buena calidad.
- Se lee un blanco de reactivos, que consiste en el reactivo R1 (Mezcla de compuestos cromógenos y alcoholes). Todas las lecturas se realizaron en el lugar que indica el equipo (ver Figura 10).
- Posteriormente se agrega cuidadosamente 5 microlitros ( $\mu L$ ) de la muestra (aceite recién extraído) con una pipeta automática (incluida en el Kit del equipamiento).
- Se agregan 10  $\mu L$  del reactivo R2 (solución Redox) a las cubetas que contienen al blanco y a las muestras.
- Se incuba durante tres minutos a temperatura ambiente.
- Por último se lee el blanco y las muestras, en la pantalla digital del equipo, las unidades de medida del índice de peróxidos es  $mEq O_2/kg$  muestra.



Figura 10. Determinación de índice de peróxidos en aceite de macadamia recién extraído en el equipo OXITESTER Junior.

### Índice de acidez

Para la determinación del índice de acidez se utiliza el mismo equipamiento OxiTester Junior (CDR), realizando mediciones por triplicado, de acuerdo al método AOCS Official Method Ca 5<sup>a</sup>-40.

Fundamento: Los ácidos grasos libres de la muestra, a pH menor a 7,0 reaccionan con un compuesto cromógeno y disminuyen su intensidad de color. La disminución del color, leída a 630 nm, es proporcional a la concentración de ácido de la muestra, expresada como % de ácido oleico.

### Procedimiento para determinar el índice de acidez

- Se verifican las conexiones eléctricas del equipo, una vez prendido se espera la auto calibración del mismo.
- Se selecciona el test de acidez en el rango de 0,03 – 1,1 %.
- Se deja incubar por 5 minutos cada cubeta a ser utilizada.
- Se lee primeramente todas las cubetas con el reactivo cromógeno (de color).
- Se agregan 2,5 µL de la muestra a la cubeta de reactivo coloreado (Figura 11).
- Se procede inmediatamente a la lectura en unidades de mg KOH/g aceite.



Figura 11. Determinación de acidez en aceite de macadamia recién extraído en equipo OXITESTER Junior.

### Actividad de agua (aw)

La medición de actividad de agua se realiza por triplicado inmediatamente después de homogeneizar la submuestra obtenida de cada lote de nueces de macadamia (sea NIS o kernel).

Se utiliza un equipo medidor de actividad de agua portátil, como el HygroPalm 23 – AW- A (Rotronic) o similar.

### Procedimiento para la medición de actividad de agua:

- Se pesa aproximadamente 5,0 g de muestra homogeneizada en frascos de plásticos con tapa en una balanza analítica.
- Se verifican las conexiones del equipo y se lee directamente la actividad de agua en el modo "aw" (Figura 12).



Figura 12. Equipo termohigrómetro con sonda para determinación de actividad de agua.

### Análisis de color

---

El análisis de color recomendado por su facilidad, practicidad y accesibilidad en nueces de macadamia es el de análisis de imágenes de fotografías desarrollado por Mereles & Coronel (2017), cuyo fundamento consiste en realizar una medición en el sistema  $L^*, a^*, b^*$  a partir de una fotografía digital en un sistema estandarizado. Para ello se requiere de una cabina de luz BYK byko – spectra basic® (Columbia, USA), iluminado con una fuente D65 “luz de día” y una cámara fotográfica (por ej. Canon Power Shot SD14.00 IS Digital ELPH, de 14.1 Mega pixels, con una lente Canon zoom lens 4x15 5.0-20.0 mm 1:2.8-5.9). La distancia entre la lente de la cámara y la muestra se mantiene en 10 cm (Figura 13).

#### *Procedimiento para el análisis de color:*

---

- Se toman al azar 12 nueces de macadamia sin cáscara (por lote o submuestra) de nueces enteras (sin homogeneizar).
- Se fotografían las nueces en la cabina de luz.
- Las imágenes obtenidas por cada nuez, se analizan posteriormente en función de su histograma en un programa Image J®, donde se obtienen valores de RGB.
- Analizar el color de la imagen seleccionando del contorno de la nuez con ayuda de un programa Adobe Photoshop CC 4.0.1.192 en medidas de  $L^*, a^*, b^*$ .





Figura 13. Cabina de luz para obtención de la imagen a ser analizada.



Figura 14. Muestras de macadamia secas, superficie externa y escala de colores de nueces de macadamia secas a tostadas.

## ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

### Caracterización microbiológica

Los parámetros microbiológicos que normalmente deben ser analizados para evaluar la carga microbiana de importancia en las nueces de macadamia son:

- Recuento de Hongos y levaduras.
- Aerobios mesófilos totales.
- *Coliformes a 45°C.*
- *Salmonella spp.*



Los métodos y técnicas analíticas empleados en cada etapa de la investigación se muestran en la siguiente tabla 2.

Tabla 2. Métodos para análisis microbiológicos de nueces de macadamia

Determinación	Método
Hongos	AOAC Método Oficial 997.02
Levaduras	AOAC Método Oficial 997.02
<i>Coliformes</i> 45°C	AFNOR Método Validado 3M 01/2-09/89C
<i>Salmonella</i> spp.	AOAC Método Oficial 2014.01

### *Procedimiento para hongos y levaduras, aerobios mesófilos y coliformes:*

- Se toman de forma aséptica, 25 g de muestra en una bolsa estéril.
- Se agregan 225 mL de agua peptonada.

- Se tritura y homogeniza la mezcla en un "Stomacher", para obtener una suspensión madre o primera dilución de la serie (1:10).
- A partir de la suspensión madre se toman alícuotas de 10 mL y se llevan a dilución 1:100 y 1:1000.
- Se realiza la siembra de 1 mL en placa de Petrifilm.
- Se incuban las muestras de acuerdo a la tabla 3.
- Los análisis se realizan por triplicado.
- Transcurrido el tiempo de incubación se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Posteriormente se calculan las unidades formadoras de colonias por gramo UFC/g.

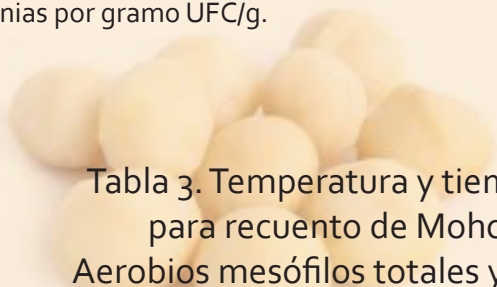


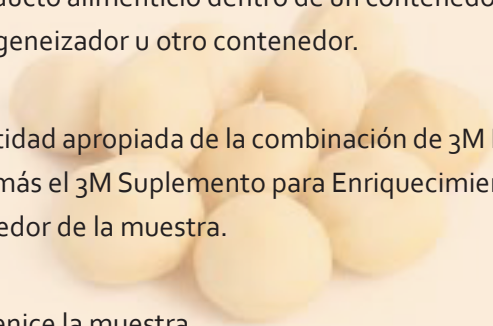
Tabla 3. Temperatura y tiempo de incubación para recuento de Mohos y levaduras, Aerobios mesófilos totales y *Coliformes a 45°C*.

Recuento de Mohos y Levaduras	Método Petrifilm™, incubación entre 21 a 25 °C durante 5 días, según Norma AOAC Método oficial 997.02 (en alimentos). Sistema 3M™ Petrifilm™, placas para recuentos de Mohos y Levaduras.
Recuento de Aerobios Mesófilos Totales	Método Petrifilm™, Según norma AOAC método oficial 990.12 Incubación durante 48 hs. ( $\pm 3$ hs.) a 35 °C ( $\pm 1$ °C).
Recuento de Coliformes a 45°C	Método Petrifilm®, Según norma AFNOR método validado 3M 01/2-09/89C. Incubar 24 h $\pm 2$ h a 44 °C $\pm 1$ °C. La incubadora debe ser humedecida a estas altas temperaturas.

Fuente: Guías de interpretación de placas Petrifilm®

*Procedimiento para la determinación de Salmonella sp. con Petrifilm®*

- Pese asépticamente la cantidad apropiada del 3M™ Suplemento para enriquecimiento de Salmonella
- Agregue de manera aséptica el 3M™ Suplemento para Enriquecimiento de Salmonella a la cantidad apropiada de 3M Enriquecimiento Base para Salmonella, preparado y esterilizado en un autoclave.
- Prepare la dilución del producto alimenticio homogeneizado.
- Pese 25 g del producto alimenticio dentro de un contenedor estéril, tal como una bolsa para homogeneizador u otro contenedor.
- Agregue una cantidad apropiada de la combinación de 3M Enriquecimiento Base para Salmonella más el 3M Suplemento para Enriquecimiento de Salmonella a la bolsa o el contenedor de la muestra.
- Mezcle u homogenice la muestra
- Incube las muestras enriquecidas a  $41,5^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$  durante de 18 a 24 horas.



*Procedimiento de hidratación:*

- Coloque la Placa 3M Petrifilm SALX sobre una superficie nivelada y plana. Con la pipeta perpendicular a la placa, coloque 2,0 mL de diluyente estéril sobre el centro de la película inferior.
- Deje caer suavemente la película superior sobre el diluyente para evitar atrapar burbujas de aire.

- Coloque el Difusor Plano 3M Petrifilm en el centro de la placa. Presione ligeramente el centro del difusor para distribuir el diluyente de manera uniforme. Distribuya el diluyente en toda el área de desarrollo de la Placa 3M Petrifilm SALX antes de que se forme el gel. No deslice el difusor a través de la película.
- Coloque la Placa 3M Petrifilm SALX en una superficie plana durante al menos 1 hora a temperatura ambiente (20–25 °C), protegida de la luz, para que se forme el gel.
- Use un asa estéril de 10 µL y retire el volumen completo del asa. Utilice un asa suave para evitar que la superficie del gel se resquebraje.
- Realice una sola siembra por estriado, desde la parte superior hasta la parte inferior de la placa, para obtener colonias aisladas.
- Baje la película superior para cerrar la Placa 3M Petrifilm SALX. Asegúrese de que usa guantes, aplicar un movimiento suave de presión constante sobre la película superior para retirar todas las burbujas de aire del área de inoculación.
- Incube las placas a  $41,5^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$  durante  $24 \pm 2$  horas en posición horizontal con el lado coloreado hacia arriba en pilas de no más de 20 placas.
- En la película superior de la Placa 3M Petrifilm SALX, marque con círculos las colonias aisladas presuntivas positivas de *Salmonella* usando un marcador permanente de punta fina. Confirme bioquímicamente todos los resultados presuntivos positivos de *Salmonella* mediante el uso del Disco de Confirmación 3M Petrifilm SALX.

- Retire de su bolsa un Disco de Confirmación 3M Petrifilm SALX empacado individualmente y permita que llegue a temperatura ambiente. Abra el paquete para exponer la lengüeta del disco, júlela y retire el disco. Levante la película superior (con las colonias presuntivas de *Salmonella* ya marcadas) de la Placa 3M Petrifilm SALX e inserte el disco sobre el gel en forma tal que se evite atrapar burbujas de aire. Cierre la placa.
- Asegúrese de que usa guantes y deslice suavemente sus dedos con un movimiento de barrido a una presión constante sobre la película superior para retirar todas las burbujas de aire del área de inoculación, y asegure un buen contacto entre el gel y el Disco de Confirmación 3M Petrifilm SALX.
- Incube el sistema 3M Petrifilm Salmonella Express (placa y disco) a  $41,5^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$  de 4 a 5 horas.
- Retire el sistema 3M Petrifilm Salmonella Express de la incubadora y proceda a leer los resultados. Mire solo las colonias marcadas con un círculo.



A continuación se detallan los límites permitidos de parámetros de calidad microbiológica de las nueces de macadamia secas (Norma paraguaya INTN - NP 15 004-15).

Tabla 4 Parametros de calidad microbiológica.  
Norma paraguaya INTN -NP 15 004 -15

MICROORGANISMO	Tolerancia para muestra indicativa	Tolerancia para muestra representativa			
		n	c	m	M
Hongos	$10^3$	5	1	$10^2$	$10^3$
Levaduras	$10^3$	5	1	$10^2$	$10^3$
Coliformes a 45 C/g	$10^3$	5	2	$10^2$	$10^3$
Salmonella sp/25 g	Ausencia	5	0	Ausencia	-

## ANÁLISIS DE COMPOSICIÓN CENTESIMAL

Para evaluar la composición se deben realizar determinaciones de lípidos totales, humedad, proteínas, carbohidratos, fibra alimentaria y cenizas, de acuerdo a la siguiente tabla 4.

Tabla 5. Métodos analíticos utilizados para determinar composición de la nuez fresca y seca

Parámetro	Método
Humedad	Método oficial A.O.C.S. Ca 2b-08, en balanza termo gravimétrica, a 105°C.
Lípidos totales	Método oficial AOAC 948.22 Extracción por Soxhlet con éter de petróleo
Proteínas	Método oficial AOAC 950.48 Kjeldhal con factor de conversión = 5,3
Fibra alimentaria	Método oficial AOAC 985.29 enzimático – gravimétrico de Provski.
Carbohidratos totales	Método colorimétrico de la antrona (Dreywood, 1946).

La determinación de humedad se realiza de acuerdo al procedimiento previamente descrito en la página 10.

Nota: A continuación se describen de manera práctica los procedimientos de análisis recomendados para nueces de macadamia, sin embargo, los procedimientos validados y detallados de forma exhaustiva el lector lo podrá encontrar en los métodos oficiales correspondientes (AOAC, AOCS).

### Lípidos totales

Fundamento: El contenido de lípidos totales se determina por un método gravimétrico, donde la grasa se determina por diferencia de peso luego de extraer el aceite en un sistema de extracción sólido – líquido semi continuo con un extractor tipo Soxhlet, de acuerdo al método AOAC 948.22, por triplicado.

- La muestra homogenizada se seca durante dos horas en una estufa con circulación y renovación de aire a 105 °C.
- Se pesan 3 a 5 gramos de la muestra seca homogeneizada en una balanza analítica dentro de un recipiente limpio de celulosa (cucurucho de extracción), donde se coloca previamente un colchón de algodón y encima la muestra homogeneizada, se anota el peso exacto de la muestra.
- Se coloca el cucurucho en el sifón del aparato de Soxhlet y sobre el calentador un balón de 250 mL, previamente se registra el peso exacto del balón (procedimiento de tarado).
- Se agregan 3 sifonadas de hexano normal o éter de petróleo en el reservorio de solvente del sistema Soxhlet (Figura 15) y se prende el calentador del equipo para proceder a la extracción por 12 horas.
- Se apaga y desmonta el equipo para extraer el balón con el solvente.
- Enfriar los balones y evaporar el solvente en un equipo evaporador a vacío (rotavapor) donde el baño de agua no supere los 60°C.
- Se elimina el residuo del solvente en la estufa por 1 hora a 75°C.
- Se pesan los balones en la balanza analítica y se calcula el porcentaje de lípidos totales en la muestra con las siguientes formulas:

$$\text{Lípidos totales (g/100g)} = \frac{(P_{bm} - P_b) \times 100}{P_m}$$

para contenido de lípidos sobre base seca (SBS)

Donde:

P<sub>bm</sub>: peso en gramos del balón con aceite de la muestra.

P<sub>b</sub>: peso en gramos del balón vacío.

P<sub>m</sub>: peso en gramos de la muestra.

Ya que se trabajó con muestra seca se utiliza la siguiente fórmula para conocer el contenido de lípidos real en la nuez sobre base húmeda o sobre muestra tal cual (SMTC).

$$\text{SMTC} = X \times (100 - H) / 100$$

Donde:

SMTC: sobre masa tal cual

X: contenido de lipido SMS

H: porcentaje de humedad





Figura 15. Proceso de extracción de aceite de macadamia para determinación de lípidos totales por Soxhlet.

### Proteínas

Para conocer el contenido de proteínas se procede primeramente a la determinación de nitrógeno proteico por el método Kjeldahl A.O.A.C. Official Method 950.48, donde se utiliza un factor de conversión de nitrógeno a proteína igual a 5,3 para frutos secos.

El método se divide principalmente en tres etapas: digestión, destilación y titulación, en cada etapa se realizan los siguientes procedimientos:

### Digestión

- En un balón de Kjeldhal se agrega 1,0000 g de muestra homogenizada, y pesada exactamente en balanza analítica dentro de un papel de filtro cuantitativo y libre de cenizas.
- En el mismo balón se agregan 10 g de sulfato de potasio anhidro p.a., 0,5 g de sulfato de cobre penta hidratado y 25 mL de Ac. sulfúrico concentrado.
- La mezcla se deja digerir en el sistema del equipo Kjeldhal hasta aclarar, cuando toma un color esmeralda, y se dejan reaccionar 40 min. más para completar la digestión.

### Destilación

- En un Erlenmeyer de 500 mL se agregó 25 mL de 0,5 M de HCl (J.T. Baker ®) y 100 mL de agua destilada.
- Una vez fríos los balones de Kjeldahl se agregan un puñado de granallas de Zinc y 250 mL de agua destilada, dejando reaccionar la mezcla por una hora.
- Posteriormente se agregan 100 mL de NaOH (40%) a los balones y se cierra el sistema de destilación del equipo Kjeldhal.
- Se colocan los Erlenmeyers con HCl para la destilación, permitiendo que la conexión del balón pueda burbujear en el Erlenmeyer hasta obtener 300 mL de destilado.

### Titulación

- Cuando el destilado (en el Erlenmeyer) alcanzó los 300 mL estos fueron retirados del sistema y valorados con NaOH (Cirarelli ®) 0,5 M.
- Las mediciones deben realizarse por triplicado y realizar un blanco de reactivos que debe incluir el mismo tipo de papel de filtro pero sin la muestra y siguiendo exactamente los mismos procedimientos y utilizando los mismos reactivos que para la muestra, este blanco se realiza para cada lote de reactivos.  
Obs: el NaOH utilizado debe ser valorado previamente con HCL 0,5 M y este último a su vez valorado con un patrón de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhidro.



Figura 16. Sistema de Kjeldhal para la determinación de Proteínas, abajo, para la digestión y arriba para la destilación de  $\text{N}_2$ .



Figura 17. Punto final de la titulación por retroceso con NaOH, para la cuantificar el contenido de nitrógeno total.

El contenido de proteínas totales en la muestra se calcula por medio de la fórmula:

$$\text{Proteínas (g/100g)} = \left( \frac{\text{meqN} \times 14,065 \times 5,3}{\text{Pm} \times 1000} \right) \times 100$$

Donde:

meqN= miliequivalente de nitrógeno en milimoles/mL.

14,065= peso molecular de nitrógeno.

5,3: factor de conversión para frutos secos.

Pm: peso de la muestra

### Ceniza

Para el análisis del contenido de ceniza se utiliza un método gravimétrico.

#### *Procedimiento para el análisis del contenido de ceniza:*

- Se pesa 1,000 gramo de muestra homogeneizada en una balanza analítica dentro de crisoles de 50 mL, previamente tarado en la mufla a 550 °C durante una hora e identificados en su parte inferior con lápiz de grafito.

## ANÁLISIS DE COMPOSICIÓN CENTESIMAL

- Las muestras se pesan por triplicado.
- Posteriormente se colocan las muestras en una plancha calefactora y se quema lentamente la muestra hasta su calcinación completa (Figura 18).
- Se colocan los crisoles en una mufla durante 8 horas a 550 °C.
- Se dejan enfriar los crisoles en un desecador y el residuo de ceniza se pesa en la balanza analítica.
- El contenido de ceniza de la muestra se calcula con la siguiente formula:

$$\% \text{Ceniza} = \frac{Pc + ms - Pcv}{Pms} \times 100$$

Donde:

Pc+ms: peso del crisol más muestra.

Pcv: peso del crisol vacío.

Pms: de la muestra

Se realizaron mediciones por triplicado.



Figura 18. Proceso de calcinación de la materia orgánica de muestras en planchas calefactora y mufla a 550°C para determinación de ceniza.



### Fibra alimentaria total

El método enzimático gravimétrico de Prosky A.O.A.C. 991.43 es el más utilizado para la determinación de fibra alimentaria total, a partir de la muestra homogeneizada seca y desengrasada que resulta de la extracción del Soxhlet (figura 19), la cual debe ser finamente triturada para proceder al análisis de fibra alimentaria y así favorecer la acción de las enzimas digestivas utilizadas en el método.



Figura 19. Extracción de la muestra seca y desengrasada desde el cucurucho del Soxhlet para la determinación de fibra alimentaria.

*Procedimiento para determinar la fibra alimentaria total:*

- Pese en la balanza analítica exactamente 1,0000 gramo de la muestra seca y desengrasada en vasos de precipitados de 100 mL, posteriormente este contenido transfiera a vasos de 100 mL con el agregado de 50 mL de buffer fosfato a pH 6.
- Agregue 100  $\mu$ L de  $\alpha$ -amilasa del kit de reactivos para fibra alimentaria (por ej. Bioquant <sup>®</sup>).
- Incube en baño de agua a 100°C durante 15 minutos con agitación constante.
- Deje enfriar y ajuste el pH a 7,5 con NaOH (0,5 M), monitoreado con un potenciómetro el pH.
- Agregue 100  $\mu$ L de enzima proteasa e incube a 60°C durante 30 minutos con agitación constante.
- Deje enfriar y ajuste el pH a 4-4,6 con HCl 0,5 M y monitoreado con un potenciómetro el pH.
- Agregue 100  $\mu$ L de amiloglucosidasa e incube a 60°C durante 30 min. agitando constantemente.
- Deje precipitar las proteínas remanentes en la mezcla toda la noche con 280 mL de etanol al 95%.
- Filtre al vacío a través de un papel de filtro cuantitativo de 125 mm tarado previamente.
- Realice lavados con etanol al 78% (20 mL, tres veces), etanol al 95 % (10 mL, dos veces) y acetona (10 mL, dos veces).
- Seque el papel de filtro en estufa a 105°C durante una hora.
- Deje enfriar en desecador. Pese en la balanza analítica, el residuo de los papeles de filtro conteniendo los residuos de las digestiones enzimáticas.
- Realice la determinación de proteínas por el método Kjeldhal a uno de los residuos contenidos en el papel de filtro y al otro realice el análisis de cenizas, como se describieron anteriormente.

- El cálculo de fibra se realiza mediante la siguiente formula:

$$\text{Fibra alimentaria (g/100g)} = R - (P + C) / P_m \times 100$$

**Dónde:**

R: masa en gramos del residuo del filtrado posterior al tratamiento enzimático.

P: masa en gramos de proteínas del residuo del filtrado posterior al tratamiento enzimático.

C: masa en gramos de la ceniza del residuo del filtrado posterior al tratamiento enzimático.

P<sub>m</sub>: peso de la muestra.

### Azúcares totales

---

La reacción de color para medir la concentración de carbohidratos solubles por espectrofotometría se basa en la utilización de un compuesto llamado antrona que se disuelve en ácido sulfúrico concentrado. El medio ácido hidroliza el enlace glicosídico de los oligosacáridos y los monosacáridos resultantes reaccionan con la antrona (estructura al margen) produciendo un color verde – azulado.

**Preparación de reactivos:**

- Antrona-Acido Sulfúrico: Disuelve 0.1 g de Antrona en 100 mL de ácido sulfúrico 76%.
- Soluciones de Glucosa anhidra: Prepare soluciones patrón realizando diluciones seriadas de una solución madre de glucosa de 500 mg/L utilizando tubos de vidrio.
- Prepare soluciones de estándar de glucosa en el siguiente rango de concentraciones 10 a 100 mg/L .

**Preparación de la muestra:**

- Se pesa exactamente 1 gramo de la muestra desengrasada obtenida como residuo del Soxhlet.
- Disuelve la muestra en un baño de ultrasonido por 5 minutos con 30 mL de agua destilada en un vaso de precipitados de 100 mL.
- Filtre con papel de filtro cualitativo en un matraz de 100 mL.
- Realice una segunda dilución de la muestra de manera a tener un factor de dilución total de 2000.

## ANÁLISIS DE COMPOSICIÓN CENTESIMAL

### Reacción:

- Agregue 1,00 mL de solución patrón o solución de la muestra a un tubo de vidrio con tapa.
- Agregue 5,00 mL del reactivo de Antrona preparado en el día.
- Agite con el agitador de tubos para homogeneizar el reactivo de color (que es muy viscoso) y la muestra.
- Incube los tubos en baño de agua termostatzado a 100 °C durante 12 minutos.
- Espere que los tubos alcancen la temperatura ambiente en un baño de agua a temperatura ambiente
- Lea la absorbancia a 630 nm (zona visible) en el espectrofotómetro haciendo el cero previamente con un blanco de reactivos y anote el resultado.
- Los cálculos se realizan por regresión lineal a partir de la curva de calibración construida con las soluciones de estándares de glucosa.
- Los resultados se expresan en g Glc./100g nuez SMTC.



Figura 20. Análisis de azúcares solubles por el método de la Antrona de Clegg. Preparación de la muestra. B) Reacción del reactivo de antrona.





Figura 21. Análisis de azúcares solubles por el método de la Antraona de Clegg. A) Preparación de la muestra. Reacción de la muestra con el reactivo antraona en medio sulfúrico.

Publishing Limited. doi: 10.1533/9780857097484.2.274

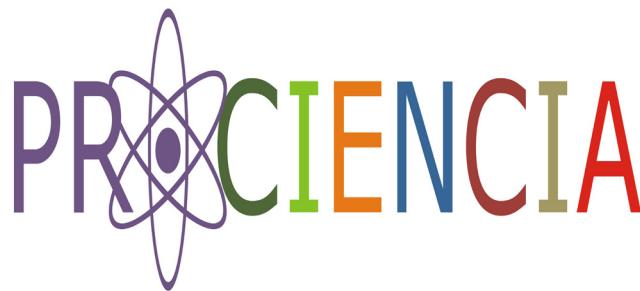
---

## Referencias

---

- AMS (2013). Australian Macadamia Society. URL <http://macadamias.org/pages/kernel-specifications-and-packaging>. Consultado el 5.09.15.
- Dreywood, R. (1946). Qualitative Test for Carbohydrate Material. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 1946, 18 (8), pp 499–499. DOI: 10.1021/i560156a015.
- Firestone (Ed.) 2009. American Oil Chemist's Society. Official Methods and Recommended practices of the AOCS. 6th ed. Urbana, Illinois, USA.
- Horwitz, W. (Ed.) 2000. Official methods of analysis of AOAC International. 17<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, Md. : AOAC International.
- INC (2009). International Nut and dried fruit Council Foundation, Proposed International Specification for Raw Macadamia Kernel.
- Masson, L., Torija, M.E., Camilo, C. (2008). Characterization of the seed oil from chilean palm (*Jubaea chilensis*). *Grasas y Aceites*, 59 (1). DOI: <http://dx.doi.org/10.3989/gya.2008.v59.i1.487>
- Mereles L., Ferro E. 2015. Características físicas, composición centesimal y minerales en frutos de *Madamia integrifolia* Maiden & Betche, cosechadas en el Departamento de Cordillera, Paraguay. *Rojasiana*, 14 (1).
- Mereles, L.G., Ferro, E.A., Alvarenga, N.L., Caballero, S.B., Wiszovaty, L.N., Piris, P.A., Michajluk, B.J. (2016). Chemical composition of *Macadamia integrifolia* (Maiden and Betche) nuts from Paraguay. *IJFR*, 24 (6). In press.
- Prichavudhi y Yamamoto, 1965. Prichavudhi, K., Yamamoto, H.Y., 1965. Effect of drying temperature on chemical composition and quality of macadamia nuts. *Food Technology* 19, 121–128.
- Prichavudhi y Yamamoto, 1965. Prichavudhi, K., Yamamoto, H.Y., 1965. Effect of drying temperature on chemical composition and quality of macadamia nuts. *Food Technology* 19, 121–128.
- Wal M, Gentry T, 2007. Carbohydrate composition and color development during drying and roasting of macadamia nuts (*Macadamia integrifolia*). *Rev. LWT Food Science and Technology*. Volume 40, Issue 4, May 2007, Pages 587–593. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643806000983>.
- Wall, M. M. 2010. Functional lipid characteristics, oxidative stability, and antioxidant activity of macadamia nut (*Macadamia integrifolia*) cultivars. *Food Chemistry*, 121(4): 1103-1108. doi:10.1016/j.foodchem.2010.01.057
- Wall, M. M. 2013. Improving the quality and safety of macadamia nuts. In: L.J. Harris (Ed.), *Improving the safety and quality of nuts*, p. 274-296. Philadelphia: Woodhead Publishing Limited. doi: 10.1533/9780857097484.2.274





*AGRADECIMIENTOS:  
Este proyecto fue financiado por CONACYT  
a través del Programa PROCIENCIA  
con recursos del Fondo para la Excelencia de la Educación e Investigación -  
FEEI del FONACIDE.*

