



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

*Almendras dulces y amargas:
determinación del contenido de
amigdalina mediante cromatografía
líquida de alta resolución y clasificación
mediante espectroscopia visible y de
infrarrojo cercano*

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNA: Morales Padilla, María Monserrath

TUTOR: Talens Oliag, Pau

COTUTORAS: Lerma García, María Jesús

Cortés López, Victoria

Curso Académico: 2016 – 2017

VALENCIA, 03 DE JULIO DEL 2017

ALMENDRAS DULCES Y AMARGAS: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AMIGDALINA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN Y CLASIFICACIÓN MEDIANTE ESPECTROSCOPIA VISIBLE Y DE INFRARROJO CERCANO.

Morales Padilla, María Monserrath¹; Talens Oliag, Pau¹; Lerma García, María Jesús¹; Cortés López, Victoria¹

RESUMEN

La almendra es una drupa de semilla comestible, consumida y comercializada en su estado natural o como parte de diversos productos elaborados. Se distinguen dos clases de almendras: amargas y dulces. El sabor amargo se debe a la presencia de compuestos cianogénicos, como la amigdalina, que es un compuesto altamente tóxico que influye directamente en la calidad sensorial y aceptabilidad del producto.

En este estudio se determinó el contenido de amigdalina en almendras mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En primer lugar, se optimizaron las condiciones de extracción de la amigdalina de las almendras, seleccionándose metanol como disolvente y un tiempo de 24 h de agitación. Posteriormente se procedió a la optimización de las condiciones de separación, obteniéndose los mejores resultados con una fase móvil compuesta por una mezcla de agua y acetonitrilo (80:20, v/v) en elución isocrática con un caudal de 1 mL·min⁻¹ y un volumen de inyección de 20 µL. El método cromatográfico desarrollado dio lugar a repetibilidades inter-día con RSDs menores de 0,31 y 1,41 % para tiempos de retención y áreas de pico, respectivamente. Además, se obtuvo un LOD del 0,40 mg·L⁻¹ y recuperaciones en todos los casos cercanas al 100 %. El contenido de amigdalina obtenido en almendras dulces varió en un rango de 0,67 a 348 mg·Kg⁻¹, en tanto que para las almendras amargas se detectó un contenido de amigdalina entre 14734 y 50412 mg·Kg⁻¹.

Previo a la determinación de amigdalina mediante HPLC, todas las almendras consideradas en el estudio fueron analizadas mediante espectroscopia visible (VIS) y de infrarrojo cercano (NIR). Los espectros obtenidos fueron empleados junto con tres técnicas distintas de clasificación (PLS-DA, SVM y LDA) para ver si eran capaces de discriminar entre almendras dulces y amargas sin necesidad de recurrir a los análisis por HPLC. Los mejores resultados se obtuvieron mediante el método PLS-DA, alcanzando una exactitud en la clasificación del conjunto de validación del 100 %, mientras que con los métodos SVM y LDA se obtuvo una clasificación global del 88,90 % y del 70,90 %, respectivamente. En base a estos resultados, se puede concluir que la técnica de espectroscopia VIS-NIR es una buena alternativa no destructiva para la clasificación de almendras en dulces y amargas, con posibilidades de adaptación in-line en un sistema de clasificación automatizado aportando así ventajas en relación al tiempo de

¹ Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, España

detección, versatilidad de los productos a analizar y reducción de la inversión a realizar en los procesos industriales con el fin de asegurar un correcto control de calidad.

Palabras claves: HPLC, espectroscopia VIS-NIR, análisis multivariante, clasificación, almendras amargas y dulces, amigdalina, control de calidad.

RESUM

L'ametla és una llavor comestible, consumida i comercialitzada en el seu estat natural o com a part de diversos productes elaborats. Es distingixen dos classes d'ametles: amargues i dolçes. El sabor amarg es deu a la presència de compostos cianogènics, com l'amigdalina, que és un compost altament tòxic que influïx directament en la qualitat sensorial i acceptabilitat del producte.

En este estudi es va determinar el contingut d'amigdalina en ametles per mitjà de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC). En primer lloc es van optimitzar les condicions d'extracció d'amigdalina de les ametles, seleccionant-se metanol com a dissolvent i un temps de 24 h d'agitació. Posteriorment es va procedir a l'optimització de les condicions de separació, obtenint-se els millors resultats amb una fase mòbil composta per una mescla d'aigua i acetonitril (80:20, v/v) en elució isocràtica amb un cabal d'1 mL min⁻¹ i un volum d'injecció de 20 µL. El mètode cromatogràfic desenvolupat va donar lloc a repetibilitats inter-dia amb RSDs menors de 0,31 i 1,41 % per a temps de retenció i àrees de pic, respectivament. A més, es va obtenir un LOD del 0,40 mg·L⁻¹ i recuperacions en tots els casos pròximes al 100 %. El contingut d'amigdalina obtingut en ametles dolces va variar en un rang de 0,67 a 348 mg·Kg⁻¹, en tant que per a les ametles amargues es va detectar un contingut d'amigdalina entre 14734 y 50412 mg·Kg⁻¹.

Previ a la determinació d'amigdalina per mitjà de HPLC, totes les ametles considerades en el estudi van ser analitzades per mitjà d'espectroscòpia visible (VIS) i la d'infraroig pròxim (NIR). Els espectres obtinguts van ser a continuació emprats junt amb tres tècniques diferents de classificació (PLS-DA, SVM i LDA) per a veure si eren capaços de discriminar entre ametles dolces i amargues sense necessitat d'utilitzar una tècnica destructiva com l'HPLC. Els millors resultats es van obtenir amb el mètode PLS-DA, aconseguint una exactitud en la classificació del conjunt de validació del 100 %, mentre que amb els mètodes SVM i LDA es va obtenir una classificació global del 88,90 % i del 70,90 %, respectivament. Basant-se en estos resultats, es pot concloure que la tècnica d'espectroscòpia VIS-NIR és una bona alternativa no destructiva per a la classificació d'ametles en dolces i amargues, amb possibilitats d'adaptació in-line en un sistema de classificació automatitzat aportant així avantatges en relació al temps de detecció, versatilitat dels productes a analitzar i reducció de la inversió a realitzar en els processos industrials a fi d'assegurar un correcte control de qualitat.

Paraules clau: HPLC, espectroscopia VIS-NIR, anàlisi multivariant, classificació, ametles amargues i dolces, amigdalina, control de qualitat.

ABSTRACT

The almond is an edible seed, consumed and marketed in its natural state or as part of processed products. There are two kinds of almonds: bitter and sweet. The bitter taste is due to the presence of cyanogenic compounds, such as amygdalin, which is a highly toxic compound that directly influences the sensory quality and acceptability of the product.

In this study, the content of amygdalin in almonds was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Firstly, the conditions of extraction of the amygdalin in the almonds were optimized, methanol being selected as the solvent and a 24 h stirring time. Subsequently were optimized the separation conditions, the best results were obtained with a mobile phase composed of a mixture of water and acetonitrile (80:20, v/v) in isocratic elution with a flow rate of 1 mL min⁻¹ and a volume of injection of 20 µL. The chromatographic method developed gave rise to inter-day repeatability with RSDs of less than 0.31 and 1.41 % for retention times and peak areas, respectively. In addition, a LOD of 0.40 mg·L⁻¹ and recoveries were obtained in all cases close to 100 %. The content of amygdalin obtained in sweet almonds ranged from 0.67 to 348 mg·kg⁻¹, whereas for bitter almonds the amygdalin content detected was between 14734 and 50412 mg·kg⁻¹.

Before determination of the amygdala by HPLC, all the almonds considered in the study were analyzed by visible (VIS) and near infrared (NIR) spectroscopy. The obtained spectra were used together with three different classification techniques (PLS-DA, SVM and LDA) to see if they were able to discriminate between sweet and bitter almonds without the use of a destructive HPLC technique. The best results were obtained using the PLS-DA method, with a precision in the classification of the 100 % validation group, whereas with the SVM and LDA methods an overall classification of 88.90 % and 70.90 % was obtained, respectively. Based on these results, it can be concluded that the VIS-NIR spectroscopy technique is a good non-destructive alternative for the classification of sweet and bitter almonds, with possibilities of adaptation online in an automated classification system, obtaining advantages in relation to the time of detection, the versatility to analyzed the products and the reduction of the investment to be made in the industrial processes to safe a correct quality control.

Keywords: HPLC, VIS-NIR spectroscopy, multivariate analysis, classification, bitter and sweet almonds, amygdalin, quality control.

1. INTRODUCCIÓN

Las almendras dulces son un fruto comestible en su estado natural y muy utilizado como ingrediente principal en productos alimenticios manufacturados. El grano puede ser secado, tostado, frito, triturado o utilizado en pasta para fabricar diversos productos de panadería. Sin embargo, las almendras amargas también se utilizan, principalmente, en la producción de extractos de sabor, siendo previamente procesadas para eliminar las sustancias indeseables.

La presencia de almendras amargas en un producto elaborado con almendras dulces causa un sabor desagradable que influye directamente en la calidad y aceptabilidad del producto. El sabor amargo de la almendra es consecuencia de la presencia de glucósidos cianogénicos, como la amigdalina y la prunasina. La amigdalina se encuentra en el núcleo de las almendras, mientras que la prunasina es un monoglucósido que se encuentra en raíces, hojas y granos de almendras inmaduras y que se convierte en amigdalina durante el proceso de maduración. El sabor amargo se presenta debido a la hidrólisis enzimática por la β -glucosidasa que produce benzaldehídos, azúcares y cianuro de hidrógeno, proporcionando una barrera de defensa química contra los herbívoros, insectos y patógenos; sin embargo, su consumo por el ser humano puede provocar intoxicaciones e incluso envenenamiento.

Según Lee *et al.* (2013), los niveles medios de amigdalina varían de 0,2 a 16 mg·100 g⁻¹ en almendras dulces, y entre 3300 y 5400 mg·100 g⁻¹ en almendras amargas. Las almendras amargas, por tanto, contienen niveles altos de amigdalina (del 3 al 5 %) y desarrollan el aroma característico del cianuro, por lo que cuantificar la concentración de amigdalina es de gran interés para distinguir entre almendras dulces y amargas. La principal variedad de almendras dulces en España es la variedad Marcona, que contiene un valor medio de 30 mg de amigdalina por cada kg, valor inferior al obtenido para las 5 variedades de almendra más producidas en Italia, cuyos valores medios oscilan entre 73 y 195 mg·kg⁻¹ (Lee *et al.*, 2013).

Debido al gran uso que tiene la almendra en la industria alimentaria, tanto en su consumo directo, como en uso como materia prima para la elaboración de productos, es necesario desarrollar métodos que sean capaces de diferenciar entre almendras dulces y amargas.

Uno de los métodos más empleados para la determinación de compuestos cianogénicos en almendras es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Diversos autores han realizado estudios con el fin de optimizar el proceso de extracción y estudiar el efecto de la preparación de la muestra para evaluar los niveles de amigdalina y prunasina en almendra (Arrazola *et al.*, 2013; Bolarinwa *et al.*, 2014; Dicenta *et al.*, 2002; Ferrara *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2013; Yildirim *et al.*, 2010). Sin embargo, y pese a los buenos resultados obtenidos mediante HPLC para la determinación de compuestos cianogénicos y, por ende, para la discriminación entre almendras dulces y amargas, la determinación mediante HPLC es costosa, requiere tiempos de preparación de muestra largos, y la adquisición de instrumentación de alto costo, por lo que lo hace que dicho método no siempre esté al alcance de todas las

industrias alimentarias; además, su mayor desventaja es que es una técnica destructiva. Por ello, es necesario el desarrollo de métodos analíticos rápidos, económicos y no destructivos, que sean capaces de trabajar en línea con el fin de discriminar ambos tipos de almendras de una manera rápida y fiable.

Una técnica que puede ser útil en estos casos es la espectroscopia visible (VIS) y la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR). Se han realizado estudios previos, trabajando con NIR, para autenticar el origen geográfico del pistacho y el reconocimiento de las muestras de Denominación de Origen Protegido (Vitale *et al.*, 2013). Además, la espectroscopia VIS-NIR también se ha empleado para la detección de defectos como la oxidación de aceites en granos de avellanas (Moscetti *et al.*, 2013), o la inspección de daños en el interior de almendras mediante espectroscopia NIR (Nakariyakul 2014). La espectroscopia NIR también se ha empleado para detectar la infección por hongos (*Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*) en granos de almendra (Liang *et al.*, 2015), y para la detección de daños ocultos en almendras crudas (Rogel-Castillo *et al.*, 2016) en combinación con técnicas Raman para discriminar almendras dulces y amargas (Borrás *et al.*, 2014).

En este trabajo se propone el empleo de la espectroscopia VIS-NIR como técnica no destructiva, en combinación con métodos quimiométricos, con el fin de identificar y clasificar almendras dulces y amargas. Para comprobar si la clasificación es correcta, se propone emplear HPLC (tras la optimización de las condiciones de extracción y los parámetros cromatográficos) para la cuantificación del contenido de amigdalina de cada una de las almendras estudiada, pudiéndose corroborar así si las almendras eran dulces o amargas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Un total de 360 almendras (180 almendras amargas y 180 almendras dulces) fueron analizadas. Las 180 almendras dulces corresponden con una selección de 30 almendras por cada una de las siguientes variedades: Planeta (P), Comuna (C), Largeta (L), Rumbeta (R), Marcona (M) y Guara (G). Las almendras amargas (A) provienen de distintas variedades sin especificar.

Todas las almendras analizadas estaban libres de daños externos o enfermedades, mostrando un color y tamaño uniforme.

Se utilizaron los siguientes reactivos y disolventes: amigdalina (BioXtra, ≥ 97.0 % HPLC, Sigma-Aldrich, St. Louis, Misuri, EUA), acetonitrilo (HPLC Far UV/Gradient Grade, J.T. Baker, Países Bajos), metanol (AGR ACS, ISO, Ph.Eur. Assay $\geq 99,8$ %, Labkem Barcelona - España), acetona (VWR Prolabo, Fontenay – sous – Bois Francia), y agua ultrapura que se obtuvo con un desionizador Aquinity (Membrapure GmbH, Berlín, Alemania).

2.1. Instrumentación y condiciones experimentales

2.1.1. HPLC

Para la determinación de amigdalina se empleó un cromatógrafo de líquidos Hitachi LaChrom Elite (Hitachi Ltd., Tokio, Japón), dotado de una bomba cuaternaria modelo L-2130, un compartimento termostaticado de

columnas modelo L-2300, y un detector UV-vis (modelo L-2420). La separación se llevó a cabo con una columna Liquid Purple C18 (250 x 4.6mm, 5µm) de Análisis Vínicos (Tomelloso, España).

Se utilizó como fase móvil una mezcla binaria de agua ultrapura y acetonitrilo (80:20 v/v). La elución se llevó a cabo en modo isocrático con un caudal de 1mL min⁻¹. El volumen de inyección fue de 20 µL. La detección se llevó a cabo a 218 nm. Para la adquisición de datos se utilizó el software EZChrom (v.3.3.2. SP1, Agilent Technologies, Santa Clara, California, EUA).

Para la extracción de la amigdalina, en primer lugar, se retiró el tegumento de las almendras mediante inmersión en agua caliente durante 5 min, y posterior secado a temperatura ambiente. A continuación, las almendras se trituraron con un mortero de porcelana de 150 mL (Mork -150-001, Labbox Barcelona, España), pesándose el triturado obtenido en botes de plástico de 50 mL en una balanza analítica modelo AB204-S (Mettler Toledo, Greifensee, Suiza). El triturado obtenido de cada una de las almendras se suspendió en 20 mL de metanol (> 99,8 %), y se mantuvo en agitación constante durante 24 h empleando un agitador magnético modelo FB15001 (Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Una vez transcurridas las 24 h, la disolución obtenida se filtró a través de un filtro de jeringa de PTFE de 0,22 µm (Scharlau, Barcelona, España). En el caso de las almendras dulces, la disolución filtrada se inyectó directamente en el cromatógrafo, mientras que para las almendras amargas ésta disolución se diluyó en una proporción 1:10 (v/v) con metanol.

Con el fin de identificar el pico y cuantificar la amigdalina presente en las almendras, se prepararon dos rectas de calibrado: una para almendras dulces, con un intervalo de concentraciones comprendido entre 0,1-50 mg·L⁻¹, y un calibrado para las almendras amargas (previamente diluidas), comprendido entre 50 y 1000 mg·L⁻¹.

2.1.2. Espectroscopia VIS-NIR y NIR

Previo a la determinación de amigdalina mediante HPLC, las 360 almendras fueron analizadas utilizando un espectrómetro multicanal (AVS-DESKTOP-USB2, Avantes BV, Holanda) equipado con dos detectores: El primer detector (VNIR) (AvaSpec-ULS2048 StarLine, Avantes BV, Países Bajos) cubre el rango VIS–NIR desde 600 a 1100 nm, con una resolución espectral FWHM (anchura a media altura del máximo) de 1,15 nm y un intervalo de muestreo espectral de 0,255 nm. El segundo detector (NIR) (AvaSpec- NIR256e1.7 NIRLine, Avantes BV, Países Bajos) cubre el rango NIR desde 888 a 1700 nm con una resolución espectral FWHM de 12 nm, y un intervalo de muestreo espectral de 3,535 nm. El tiempo de integración se ajustó a 80 ms para el detector sensible en la región VNIR y a 500 ms para el detector sensible en la región NIR.

Se utilizó una sonda de fibra óptica bifurcada (FCR-7IR400-2-45-ME, Avantes BV, Países Bajos) en forma de Y, de manera que dos de sus extremos fueron conectados a cada uno de los detectores, mientras que el extremo individual fue acoplado a una sonda de reflexión, que está conectada a la fuente de iluminación de luz halógena de tungsteno estabilizada a 10 W (AvaLight-HAL-S, Avantes BV, Países Bajos). La fuente de luz garantiza una

intensidad de luz permanente en todo el rango de medición. La punta de la sonda de reflexión fue diseñada para proporcionar mediciones en un ángulo de 45°, con el fin de minimizar la reflexión especular procedente de la superficie a medir. Además, la sonda de reflexión consta de siete fibras de 200 µm de diámetro, a través de las cuales se emite luz a la muestra y se genera como respuesta la reflexión de la misma. La almendra se coloca sobre el soporte donde la sonda se encuentra fija y se realiza la medición del espectro.

La calibración se realizó con una referencia blanca (WS-2, Avantes BV, Países Bajos) del 99 % de reflectancia de modo que la reflexión máxima de la referencia medida en todo el espectro fue entorno al 90 %. La referencia negra se obtuvo apagando la fuente de luz y cubriendo completamente el extremo de la sonda.

Se realizaron dos mediciones espectrales en cada una de las almendras (una medida en cada mejilla), las cuales se promediaron automáticamente a una única señal del espectro.

El equipo está conectado a un ordenador que controla los dos detectores y recibe la señal del espectro, la cual es procesada por un software comercial AvaSoft version 7.2 (Avantes, Inc.).

Las mediciones de reflexión de cada muestra (S), se convirtieron a valores de reflexión relativa (R) usando los valores de reflexión del negro (D) y de la referencia blanca (W), como se muestra en la ecuación (1):

$$R = \frac{S-D}{W-D} \quad (1)$$

2.2. Pre-tratamiento espectral

Los datos espectrales fueron organizados en una matriz, donde las filas representaron el número de muestras (#N = 360 almendras) y las columnas las variables (X-variables y Y-variables). Las X-variables, o predictores, fueron las señales espectrales de los dos detectores VNIR y NIR. Las Y-variables, o respuestas, fueron las variables categóricas "dummy" creadas por la asignación de diferentes valores a las diferentes clases a discriminar.

El espectro bruto de cada almendra fue transformado a valores de absorbancia aparente ($\log(1/R)$) para obtener una correlación lineal con la concentración de los constituyentes químicos del producto (Hernández *et al.*, 2006; Shao *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009) utilizando el software The Unscrambler V.10.4 (CAMO, Noruega).

A continuación, los datos en bruto del espectro de los dos detectores, fueron normalizados (Bakeev, 2010) dividiendo cada variable por su desviación estándar (Bouveresse *et al.*, 1996). De esta manera, las intensidades espectrales fueron reescaladas a un rango común, permitiendo la comparación de espectros adquiridos por los dos detectores que presentan diferente resolución. Además, se examinaron diferentes técnicas de pre-tratamiento para disminuir el efecto de dispersión (Santos *et al.*, 2013), minimizar o eliminar el ruido de alta frecuencia y mejorar la señal de la relación señal-ruido. El método de suavizado de Savitzky-Golay con un intervalo de

tres puntos (Carr *et al.*, 2005), combinado con una corrección multiplicativa de dispersiva extendida (EMSC) (Martens *et al.*, 2003; Bruun *et al.*, 2007) fueron considerados los mejores resultados para el espectro VIS-NIR, y los dos métodos de pre- procesamiento y la segunda derivada de Gap – Segment (2.3) fueron el mejor resultado para el espectro NIR (Cortés *et al.*, 2016).

2.3. Análisis multivariante de los datos espectrales

Los modelos de clasificación se construyeron basados en métodos supervisados: análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), máquina de vector de soporte (SVM) y análisis discriminante lineal (LDA).

El 80 % de las muestras se seleccionó aleatoriamente como conjunto de entrenamiento (288 almendras, 144 dulces y 144 amargas). Cada modelo de calibración fue validado internamente utilizando la técnica de validación cruzada "leave-one-out" (Huang *et al.*, 2008). Con el fin de corregir las influencias relativas de las diferentes respuestas instrumentales en el modelo, se utilizó una técnica de estandarización, donde el peso de cada X-variable fue la desviación estándar de la variable (Bouveresse *et al.*, 1996). Para la evaluación y comparación de los modelos de clasificación se utilizó un conjunto de pruebas independientes compuesto por el 20 % de las muestras restantes (72 almendras, 36 de cada tipo) (Soares *et al.*, 2013).

2.4. Evaluación del modelo

La clasificación de las muestras de almendras según su clase, dulce y amarga, se basó en un valor de corte de 0,5 para el modelo PLS-DA. Por esta razón, si el valor predicho fue menor de 0,5, las muestras fueron clasificadas correctamente como almendras dulces y como almendras amargas si el valor de predicción era mayor de 0,5. Para el método SVM, se crea un espacio de variables diferentes a las iniciales que permite la máxima separación entre las diferentes clases dentro de los límites de decisión, es decir, los vectores soporte (Moncayo Martín, S. 2017). En este caso, la clasificación se llevó a cabo basándose en la función de la base radial de kernel (núcleo RBK), y la combinación de los parámetros C (factor de capacidad) y γ (gamma). Por último, en el caso del LDA, el criterio para la selección de variables latentes es la máxima diferenciación entre las categorías y la minimización de la varianza dentro de las categorías (Adams, 1995; Naes *et al.*, 2002). El método produce una serie de funciones ortogonales lineales discriminantes, igual al número de categorías menos uno, que permiten clasificar las muestras en una u otra categoría (Naes *et al.*, 2002; Otto, 1999).

Algunos de los criterios para evaluar la predicción de los modelos fueron el error medio cuadrático (RMSE) y el coeficiente de determinación (R^2), así como el porcentaje de muestras correctamente clasificadas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Optimización de las condiciones de extracción de la amigdalina

Con el fin de extraer la amigdalina presente en las almendras, se procedió a optimizar las condiciones de extracción, estudiándose tanto el efecto del disolvente como el efecto del tiempo de extracción. En todos los casos, los porcentajes de recuperación se calcularon teniendo en cuenta la cantidad de amigdalina presente inicialmente en la muestra y la cantidad de amigdalina recuperada tras la extracción. Se realizaron 3 replicados para cada experimento. Para llevar a cabo la optimización, se tomaron 10 almendras dulces (que no contenían amigdalina), se eliminó el tegumento, se trituraron y se fortificaron con un 0,2 % (*m/m*) de patrón de amigdalina. En primer lugar, se testeó la eficacia de extracción de 3 disolventes diferentes: metanol, agua y una mezcla metanol:agua 80:20 (*v/v*). En todos los casos, la extracción se llevó a cabo suspendiendo un 1g de almendra triturada conteniendo 0,2 % (*m/m*) de amigdalina con 20 mL del disolvente, y manteniéndolo con agitación constante durante 24 h. Tal y como se observa en la Figura 1, los mejores resultados se obtuvieron empleando metanol como disolvente de extracción (recuperaciones cercanas al 100 %), por lo que se seleccionó este disolvente para optimizaciones posteriores.

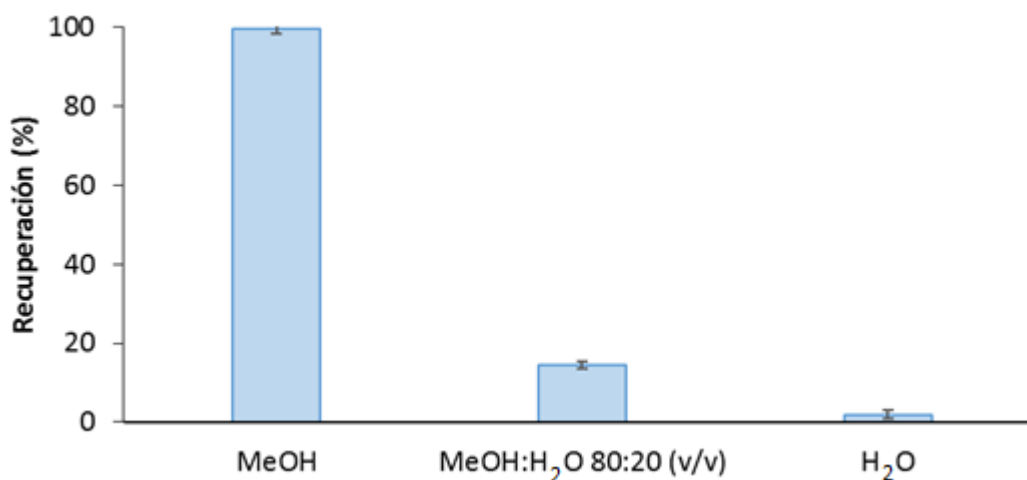


FIGURA 1. Efecto del tipo de disolvente en la recuperación de amigdalina de almendras dulces fortificadas con 0,2 % (*m/m*) de amigdalina.

A continuación, empleándose las condiciones experimentales anteriormente mencionadas y 20 mL de metanol como disolvente, se testearon diferentes tiempos de extracción, comprendidos entre 15 min y 32 h. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2. Tal y como se observa en esta figura, se obtuvo una extracción del 100 % tras 24 h, por lo que se seleccionó este tiempo para estudios posteriores.

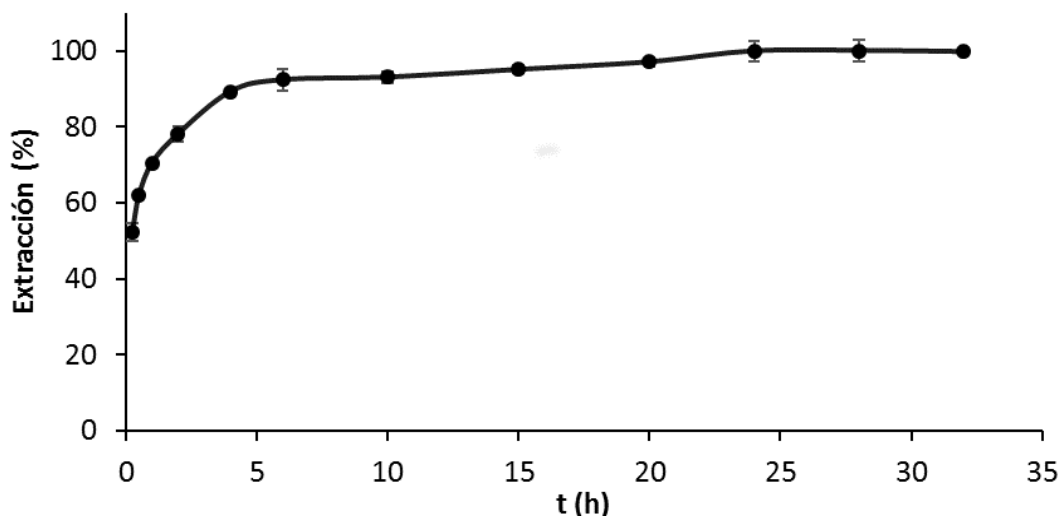


FIGURA 2. Optimización del tiempo de extracción de amígdalina de almendras dulces fortificadas con 0,2 % (*m/m*) de amígdalina.

3.2. Optimización de los parámetros cromatográficos

Una vez seleccionadas las condiciones de extracción, se procedió a la optimización de los parámetros cromatográficos, utilizándose la misma muestra de almendra fortificada conteniendo un 0,2 % (*m/m*) de patrón de amígdalina empleada en el apartado anterior. La optimización se llevó a cabo considerando la mayor resolución del pico de amígdalina con otros picos procedentes de la matriz que absorben a la máxima longitud de onda de la amígdalina (218 nm). Dado que la determinación de amígdalina mediante HPLC ha sido llevada a cabo en estudios previos (Ferrara *et al.*, 2010; Arrazola *et al.*, 2013; Yildirim *et al.*, 2010; Dicenta *et al.*, 2002) principalmente empleando ACN y H₂O como fase móvil, en este trabajo se ensayaron diferentes proporciones de estos disolventes, tanto en elución isocrática como en gradiente, usando un caudal de 1 mL·min⁻¹ y un volumen de inyección de 20 µL. Los mejores resultados en términos de resolución y tiempo de análisis se obtuvieron mediante elución isocrática con 80 % de H₂O y 20 % ACN, por lo que se seleccionó esta fase móvil para estudios posteriores.

A continuación, se optimizó el caudal variándose entre 0,5 y 1,5 mL·min⁻¹. Al aumentar el caudal, disminuyó el tiempo de retención y la anchura del pico; sin embargo, no se obtuvo resolución a línea base de un pico de la matriz y del pico de la amígdalina a caudales superiores a 1,0 mL·min⁻¹. Por lo tanto, este caudal se eligió para el trabajo posterior.

Finalmente se estudió el efecto del volumen de inyección, variándose en un intervalo de 5 a 30 µL. En general, el área del pico de la amígdalina aumentó con el aumento del volumen de inyección. Por lo tanto, se seleccionó 20 µL como volumen de inyección en compromiso entre sensibilidad y resolución del pico.

3.3. Parámetros analíticos significativos del método de HPLC y su aplicación para la cuantificación de amigdalina en las almendras

La precisión del método desarrollado se determinó mediante el estudio de las repetibilidades intra- e inter-día de los tiempos de retención y áreas de pico. Para ello, se inyectó una disolución de amigdalina de 50 mg·L⁻¹, 10 veces por día durante 3 días. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1. En todos los casos, los valores de desviación estándar relativa (RSD) obtenidos fueron inferiores a 0,31 y 1,41 % para los tiempos de retención y áreas de pico, respectivamente.

Las curvas de calibración externa se construyeron mediante la inyección de seis disoluciones estándar de amigdalina en los intervalos indicados en la Tabla 1. Como se puede observar, se adoptaron dos intervalos distintos: un intervalo a baja concentración (0,1-50 mg·L⁻¹) que fue utilizado para cuantificar la amigdalina en las almendras dulces, y un intervalo a concentraciones más altas (50-1000 mg·L⁻¹), que se utilizó para la cuantificación de la amigdalina en las muestras amargas tras una dilución 1:10 (v/v) de las mismas con MeOH. En ambos casos, se obtuvieron líneas rectas con $r^2 > 0,9996$. Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) fueron calculados para una relación señal/ruido de 3 y 10, respectivamente. Como se observa en la Tabla 1, los valores de LOD y LOQ obtenidos fueron 0,40 y 1,32 mg·L⁻¹, respectivamente. Estos valores fueron ligeramente inferiores a los obtenidos previamente en la literatura (Ferrara *et al.*, 2010; Arrazola *et al.*, 2013; Bolarinwa *et al.*, 2014).

Además, se prepararon curvas de calibrado mediante el método de las adiciones de estándar. Para ello, sobre los extractos de muestra, se adicionaron cuatro disoluciones con concentraciones crecientes de los estándares desde la concentración más baja hasta el límite superior del intervalo empleado (véase Tabla 1). Las curvas fueron lineales con $r^2 > 0,9995$; y en todos los casos, las pendientes de estas curvas de calibrado no difirieron significativamente de las pendientes obtenidas mediante calibración externa. A partir de estos resultados, se puede afirmar que no existe efecto matriz en la determinación de amigdalina en las almendras analizadas. Por lo tanto, se emplearon las curvas de calibración externa para la cuantificación de amigdalina en las muestras.

TABLA 1. Parámetros de calidad del método HPLC desarrollado.

Analito	Repetibilidad intra-día, RSD (%), n= 10		Repetibilidad inter-día, RSD (%), n = 3 días		Intervalo estudiado (mg·L ⁻¹)	r^2	LOD (mg·kg ⁻¹)	LOQ (mg·kg ⁻¹)
	Área pico	t_r	Área pico	t_r				
	Amigdalina	1,15	0,25	1,41				

RSD: desviación estándar relativa; t_r : tiempo de retención; LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación.

Posteriormente, la aplicabilidad del método desarrollado se evaluó mediante un estudio de recuperación. Para este propósito, un conjunto de

almendras dulces, en las que no se detectó amigdalina, fueron fortificadas con el patrón de amigdalina a 5 niveles de concentración (ver Tabla 2). Como se muestra en esta tabla los valores de recuperación que se estimaron a partir de las cantidades medidas frente a las añadidas, oscilaron entre 98,4 % y 102,9 %. Por lo tanto, los resultados obtenidos demostraron la aplicabilidad de la metodología propuesta para la determinación exacta de amigdalina.

TABLA 2. Resultados de la recuperación de amigdalina en muestras de almendra en diferentes niveles.

Nivel de fortificación (m/m, %)	Recuperación (%) ^a
0,4	102,9 ± 0,9
0,2	99,5 ± 0,7
0,1	98,4 ± 1,5
0,05	101,1 ± 0,8
0,01	100,1 ± 1,3

^a Media ± RSD, n=3.

A continuación, todas las muestras de almendras fueron analizadas mediante HPLC. En la Figura 3. se muestran 3 cromatogramas, correspondientes a una almendra amarga (a), una almendra dulce donde se encontró amigdalina (b) y una almendra dulce donde no se detectó la presencia de amigdalina (c).

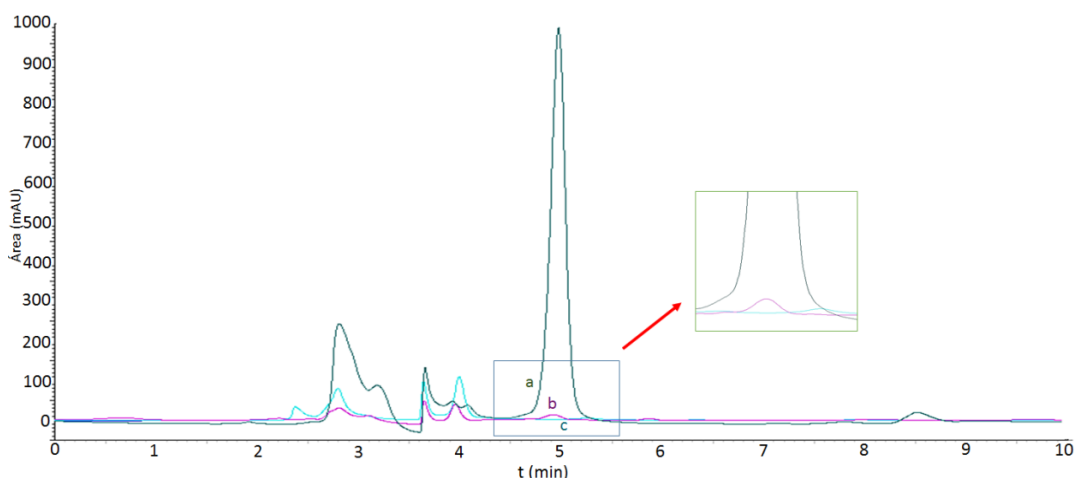


Figura 3. Cromatogramas correspondientes a una almendra a) amarga, b) una dulce con bajo contenido en amigdalina y c) una dulce donde no se detectó amigdalina.

Una vez inyectadas todas las muestras en el cromatógrafo, se procedió a la cuantificación del contenido de amigdalina en las mismas. En la Tabla 3 se muestran los intervalos de concentración obtenidos para las 180 almendras amargas, y para cada una de las variedades de almendras dulces consideradas. Para el grupo de almendras amargas, el contenido de amigdalina detectado oscila entre 14734 y 50412 mg·kg⁻¹. Estos valores concuerdan con los publicados previamente por Lee *et al.*, (2013), cuyos

niveles medios de amigdalina para almendras amargas oscilaron entre 33000 y 54000 mg·kg⁻¹. Por otro lado, el contenido de amigdalina presente en las almendras dulces varía en función de la variedad, registrándose un valor mínimo de 0,67 mg·kg⁻¹ en la variedad Planeta y un valor de 348 mg·kg⁻¹ como valor máximo para la variedad Guara. En la mayoría de los casos, los valores reportados concuerdan con los niveles de amigdalina previamente publicados en la bibliografía (20 - 160 mg·kg⁻¹, Lee *et al.*, 2013).

TABLA 3. Intervalos de concentración de amigdalina encontrados en almendras Amargas y dulces de diferentes variedades.

Almendras	Variedad	Contenido de amigdalina (mg·kg⁻¹)
Amargas	Distintas variedades	14734,04 - 50412,56
Dulces	Planeta	0,67 - 211,27
	Comuna	0,96 - 174,68
	Largueta	22,55 - 184,10
	Rumbeta	3,14 - 18,55
	Marcona	6,20 - 173,19
	Guara	52,99 - 348,13

3.4. Espectro VNIR y NIR de las almendras

La Figura 4 presenta los espectros de absorción aparente (log1/R) del promedio de los espectros obtenidos por los detectores VNIR y NIR de cada una de las variedades de almendras estudiadas. Tal y como se observa en esta figura, todos los espectros tienen un patrón similar de absorbancia tanto en la región del visible como en la región del infrarrojo cercano. Las bandas se correlacionan con los principales componentes de las almendras: lípidos (50 %), hidratos de carbono (22 %) y proteínas (21 %), de acuerdo con la Base de datos nacional de nutrientes del Servicio de Investigación Agrícola (USDA, 2017). Se observó que todas las muestras presentan un espectro similar, con un pico entorno a los 1200 nm que puede estar asociado a los lípidos presentes en la almendra, y un segundo pico sobre 1450 nm, que puede estar asociado con el contenido en agua y proteína (Rogel-Castillo *et al.*, 2016).

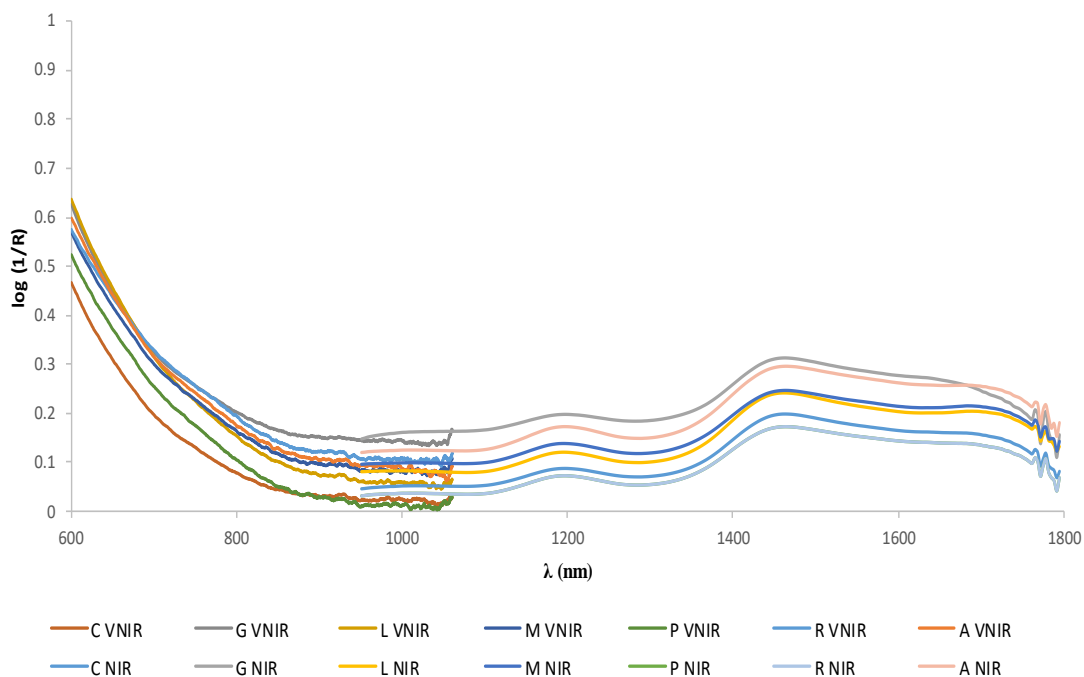


FIGURA 4. Espectros obtenidos por el detector VNIR y NIR para las distintas variedades de almendras dulces y amargas.

3.5. Clasificación en almendras dulces y amargas

Para la clasificación de las almendras dulces y amargas, se construyeron 3 modelos de clasificación mediante las técnicas PLS-DA, SVM y LDA.

En primer lugar, se procedió a la construcción del modelo de clasificación mediante PLS-DA. En la Figura 5 se muestra que tanto el conjunto de entrenamiento como las muestras de validación fueron correctamente clasificadas mediante este método. En este modelo, todas las muestras de almendras dulces tuvieron valores de predicción cercanos a 0, y por lo tanto se clasificaron como pertenecientes a la clase '0' (dulces), y las muestras de almendras amargas tuvieron valores de predicción cercanos a 1, por lo que se clasificaron como pertenecientes a la clase '1' (amargas). Los valores de RMSE para la calibración y validación fueron de 0,141 y 0,160, respectivamente, lo que indica que el error de calibración es una buena estimación del error estándar de predicción observado en muestras del conjunto de evaluación. Por otra parte, el conjunto de evaluación dio un resultado similar al conjunto de calibración, con un coeficiente de correlación de R^2 de 0,926 y 0,920 respectivamente, lo que indica un buen ajuste del modelo para dicha clasificación.

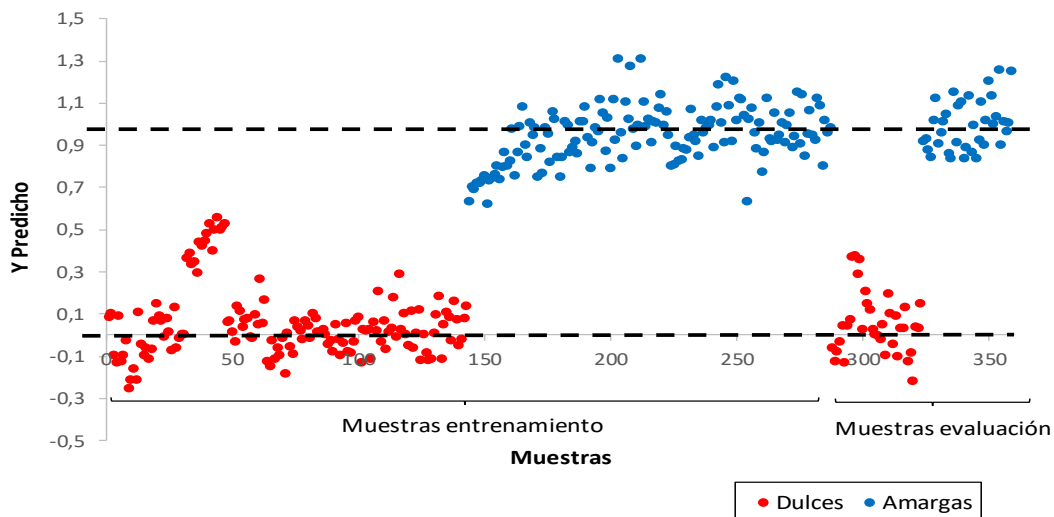


FIGURA 5. Estimación de los valores de cada clase para los conjuntos de entrenamiento y validación mediante PLS-DA.

Posteriormente, se procedió a la construcción del modelo SVM. Tal y como se ha indicado anteriormente, el modelo se basó en la función de la base radial de kernel (núcleo RBK), y la combinación de los parámetros C (factor de capacidad) y γ (gamma). La Tabla 4 muestra los parámetros utilizados y su eficiencia relativa basada en la validación cruzada de las mezclas de calibración. Los resultados obtenidos para el método SVM para el conjunto de validación fue de un 80,6 % en la clasificación de almendras dulces y un 97,2 % en la clasificación de almendras amargas.

TABLA 4. Parámetros obtenidos de validación cruzada por SVM.

Parámetros SVM	VIS-NIR
Clases	2
SVM tipo	C-SVM
C (factor de capacidad)	1
γ (gamma)	0
Tipo kernel	Función de base radial

Por último, se procedió a la construcción del modelo de clasificación mediante LDA. Los resultados obtenidos tanto para el conjunto de entrenamiento como para el de evaluación se muestran en las Figuras 6 y 7, respectivamente. Las muestras de evaluación de la clase dulce se muestran en color azul mientras que las muestras de la clase amarga están en color rojo. Los resultados para el método LDA para la clasificación de almendras dulces del conjunto de validación fue de un 77,8 % y un 63,9 % la clase amarga.

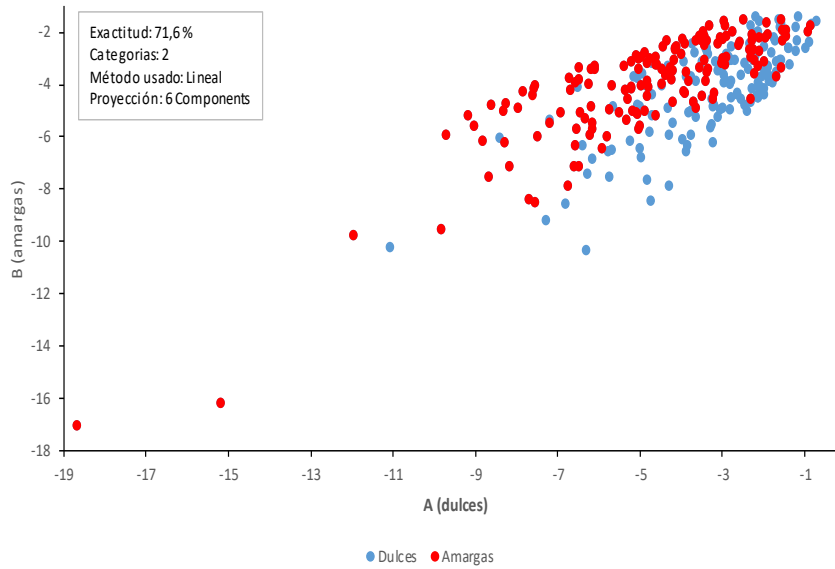


FIGURA 6. Gráfico de discriminación de los resultados de LDA para las muestras del conjunto entrenamiento.

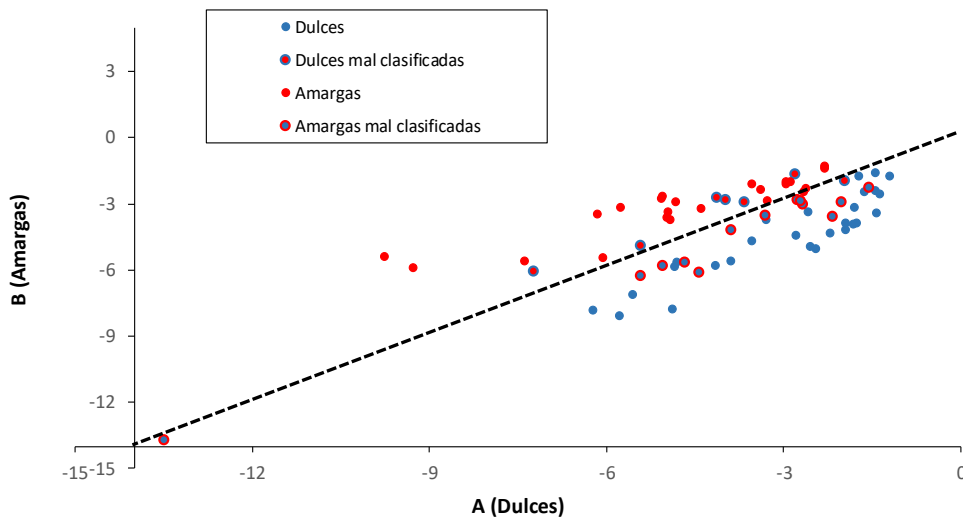


FIGURA 7. Gráfico de discriminación de los resultados de LDA para las muestras del conjunto de validación.

La capacidad predictiva de cada uno de los modelos construidos sobre el conjunto de validación, así como el porcentaje de clasificación global de los mismos se muestra en la Tabla 5.

TABLA 5. Matriz de confusión obtenida en la clasificación para los modelos de clasificación construidos en este estudio.

Modelo		Referencia de clases		Exactitud de la clasificación global
		Dulces	Amargas	
PLS-DA	Dulces	100 % (36)	0 % (0)	100 %
	Amargas	0 % (0)	100 % (36)	
SVM	Dulces	80,6 % (29)	19,4 % (7)	88,90 %
	Amargas	2,8 % (1)	97,2 % (35)	
LDA	Dulces	77,8 % (28)	22,2 % (8)	70,90 %
	Amargas	36,1 % (13)	63,9 % (23)	

* Los valores entre paréntesis indican el número de almendras clasificadas como dulces o amargas del total estudiado (n = 72)

Para el método PLS-DA se obtiene una precisión de clasificación del 100 % para ambas clases, mientras que para el método SVM fue de un 80,6 % y 97,2 % y para LDA de un 77,8 % y 63,9 % para la clase dulce y amarga, respectivamente. De este modo, el modelo LDA, en comparación con los otros, es el que alcanza un peor ajuste debido a que ocho de las muestras dulces y trece de las muestras amargas fueron mal clasificadas. En contraposición, el método PLS-DA fue el más apropiado para la discriminación de almendras dulces y amargas, obteniendo excelentes resultados. Estos resultados se pueden explicar al resaltar las desventajas del LDA en contraposición a otros métodos de clasificación (Brereton & Lloyd, 2014): Estos autores señalan que el LDA, al asumir que todas las clases tiene una distribución normal y que la dispersión es la misma en todas, puede dar peores resultados que otros métodos no lineales o multilineales. LDA utiliza una única matriz de covarianza de varianza combinada y por tanto, no siempre es la apropiada si la estructura de varianza difiere para dos o más grupos. Brereton (2009) y Moncayo Martín (2017) señalan que otra limitación del LDA es que no puede haber más variables que muestras y, por tanto, si se diera el caso, sería necesario realizar previamente un PCA para la reducción de dichas variables; sin embargo, en el caso de SVM, su objetivo principal es clasificar las muestras más que determinar la influencia de las variables.

En la bibliografía existen varios ejemplos de modelos de clasificación desarrollados también para almendras. En su investigación, Borrás *et al.* (2014) también utilizan la espectroscopia NIR como método rápido y no destructivo para discriminar almendras dulces y amargas. Mediante PLS-DA obtuvieron altos niveles de sensibilidad y especificidad para ambas clases, alcanzando un 95 % de muestras correctamente clasificadas. En comparación con nuestra investigación, aunque utilizamos un número similar de muestras, ellos 320 en total y nosotros 360, fue posible alcanzar un 100 % de muestras correctamente clasificadas utilizando la misma metodología (PLS-DA), además de aplicar dos métodos más de discriminación. A su vez, se corroboró que eran muestras dulces y amargas mediante la técnica HPLC, análisis de gran importancia para cerciorarse de los grupos.

Otros estudios que utilizaron como materia prima la almendra y que aplicaron la metodología PLS-DA, es el de Rogel-Castillo *et al.* (2016) para detectar daños ocultos en las almendras crudas mediante espectroscopia NIR. En este caso, se alcanzó una clasificación de alrededor del 90 % para un conjunto de datos de 200 muestras en un sistema de detección en línea, aplicación que nos ayuda a plantear futuros trabajos de desarrollo en línea para el control de calidad de este producto, clasificando almendras dulces y amargas y que hoy en día no se encuentra en la bibliografía.

4. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha desarrollado un método de HPLC capaz de cuantificar la amigdalina presente en almendras dulces y amargas tras la optimización de diversos parámetros experimentales y condiciones cromatográficas. Con el método desarrollado se obtuvieron repetibilidades con RSDs menores de 0,31 y 1,41 % para los tiempos de retención y áreas de pico, respectivamente. Además, se obtuvo un LOD del 0,40 mg·L⁻¹ y recuperaciones en todos los casos cercanas al 100 %. El contenido en amigdalina en almendras dulces varió en un rango de 0,67 a 348 mg·Kg⁻¹, en tanto que para las almendras amargas se detectó un contenido de amigdalina entre 14734 y 50412 mg·Kg⁻¹.

Por otro lado, empleando los datos obtenidos por espectroscopia VIS-NIR, se construyeron 3 modelos (PLS-DA, SVM y LDA) con el fin de clasificar a las almendras en dulces y amargas. Los mejores resultados se obtuvieron mediante el método PLS-DA, alcanzando una exactitud en la clasificación del conjunto de validación del 100 %, mientras que con los métodos SVM y LDA se obtuvo una clasificación global del 88,90 % y del 70,90 %, respectivamente. En base a estos resultados, se puede concluir que la técnica de espectroscopia VIS-NIR es una buena alternativa no destructiva para la clasificación de almendras en dulces y amargas, con posibilidades de adaptación in-line en un sistema de clasificación automatizado aportando así ventajas en relación al tiempo de detección, versatilidad de los productos a analizar y reducción de la inversión a realizar en los procesos industriales con el fin de asegurar un correcto control de calidad.

5. REFERENCIAS

Adams, M. J. 1995. Chemometrics in analytical spectroscopy. The Royal Society of Chemistry.

Arrazola, P., Grané, N., Martín, M. L., & Dicenta, F. 2013. Determination of cyanogenic compound amygdalin and prunasin in almond kernels (*Prunus dulcis* L.) by using liquid chromatography. *Revista Colombiana de Química*, 42(3), 365-386.

Bakeev, K., 2010. Process Analytical Technology: Spectroscopic Tools and Implementation Strategies for the Chemical and Pharmaceutical Industries. Second Edition. Editor Wiley & Sons, Incorporated, John. Chapter 15 (493–520).

Brereton, R. G. 2009. Chemometrics for pattern recognition. John Wiley & Sons.

Brereton, R. G., & Lloyd, G. R. 2014. Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. *Journal of Chemometrics*, 28(4), 213-225.

Bolarinwa, I. F., Orfila, C., & Morgan, M. R. 2014. Amygdalin content of seeds, kernels and food products commercially-available in the UK. *Food chemistry*, 152, 133-139.

- Borràs, E., Amigo, J. M., van den Berg, F., Boqué, R., & Busto, O. 2014. Fast and robust discrimination of almonds (*Prunus amygdalus*) with respect to their bitterness by using near infrared and partial least squares-discriminant analysis. *Food chemistry*, 153, 15-19.
- Bouveresse, E., Hartmann, C., Massart, D. L., Last, I. R., & Prebble, K. A. 1996. Standardization of near-infrared spectrometric instruments. *Analytical Chemistry*, 68(6), 982-990.
- Bruun, S.W., Søndergaard, I., Jacobsen, S., 2007a. Analysis of protein structures and interactions in complex food by near-infrared spectroscopy. 1. Gluten Powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 7234–7243.
- Bruun, S.W., Søndergaard, I., Jacobsen, S., 2007b. Analysis of protein structures and interactions in complex food by near-infrared spectroscopy. 2. Hydrated Gluten. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 7244–7251.
- Cortés, V., Ortiz, C., Aleixos, N., Blasco, J., Cubero, S., & Talens, P. 2016. A new internal quality index for mango and its prediction by external visible and near-infrared reflection spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology*, 118, 148-158.
- Dicenta, F.; Martínez-Gómez, P.; Grane, N.; Martín, M. L.; Leon, A.; Canovas, J. A.; Berenguer, V. 2002. Relationship between cyanogenic compounds in kernels, leaves, and roots of non-bitter and bitter kernelled almonds. *J. Agric. Food Chem.*, 50(7), 2149–2152.
- He, D.J., Maekawa, T., Morishima, H., 2001. Detecting device for on-line detection of internal quality of fruits using near infrared spectroscopy and the related experiments. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering* 17, 146–148.
- Hernández, Y., Lobo, M.G., González, M., 2006. Determination of vitamin C in tropical fruits: a comparative evaluation of methods. *Food Chem.* 96 (4), 654– 664.
- Huang, H., Yu, H., Xu, H., & Ying, Y. 2008. Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review. *Journal of Food Engineering*, 87(3), 303-313.
- Izquierdo García, J. L. 2012. Análisis metabonómico para la identificación de biomarcadores en enfermedades respiratorias (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones).
- Ferrara, G., Maggio, P., & Pizzigallo, M. D. R. 2010. Cyanogenic D-amygdalin contents of the kernels of cultivated almonds and wild *Amygdalus webbii* Spach. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 85(5), 410-414.
- Lee, J., Zhang, G., Wood, E., Rogel Castillo, C., & Mitchell, A. E. 2013. Quantification of amygdalin in nonbitter, semibitter, and bitter almonds (*Prunus dulcis*) by UHPLC-(ESI) QqQ MS/MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(32), 7754-7759.
- Liang, P. S., Slaughter, D. C., Ortega-Beltran, A., & Michailides, T. J. 2015. Detection of fungal infection in almond kernels using near-infrared reflectance spectroscopy. *Biosystems Engineering*, 137, 64-72.
- Liu, Y., Sun, X., Ouyang, A., 2009. Nondestructive measurement of soluble solid content of navel orange fruit by visible–NIR spectrometric technique with PLSR and PCA-BPNN. *Food Sci. Technol.* 43 (4), 602–607.
- Martens, H., Nielsen, J. P., & Engelsen, S. B. 2003. Light scattering and light absorbance separated by extended multiplicative signal correction. Application to near-infrared transmission analysis of powder mixtures. *Analytical Chemistry*, 75(3), 394-404.
- Moncayo Martín, S. 2017. Desarrollo y aplicación de métodos quimiométricos para el estudio de muestras mediante Espectroscopia de Ablación Láser (LIBS) (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).
- Moscetti, R., Haff, R. P., Aernouts, B., Saeys, W., Monarca, D., Cecchini, M., & Massantini, R. 2013. Feasibility of Vis/NIR spectroscopy for detection of flaws in hazelnut kernels. *Journal of Food Engineering*, 118(1), 1-7.
- Moscetti, R., Monarca, D., Cecchini, M., Haff, R. P., Contini, M., & Massantini, R. 2014. Detection of mold-damaged chestnuts by near-infrared spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology*, 93, 83-90.
- Næs, T., Isaksson, T., Fearn, T., & Davies, T. 2002. A user friendly guide to multivariate calibration and classification. NIR publications.
- Nakariyakul, S. 2014. Internal damage inspection of almond nuts using optimal near-infrared waveband selection technique. *Journal of Food Engineering*, 126, 173-177.

Otto M., 1999. *Chemometrics: Statistics and computer application in analytical chemistry* Wiley-VCH, Chichester, UK.

Pearson, T. C. (1999). Spectral properties and effect of drying temperature on almonds with concealed damage. *LWT-Food Science and Technology*, 32(2), 67-72.

Rogel-Castillo, C., Boulton, R., Opastpongkarn, A., Huang, G., & Mitchell, A. E. 2016. Use of Near-Infrared Spectroscopy and Chemometrics for the Nondestructive Identification of Concealed Damage in Raw Almonds (*Prunus dulcis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(29), 5958-5962.

Santos, J., Trujillo, L.A., Calero, N., Alfaro, M.C., Muñoz, J., 2013. Physical characterization of a commercial suspoemulsion as a reference for the development of suspoemulsions. *Chem. Eng. Technol.* 11, 1–9.

Shao, Y., He, Y., Gómez, A.H., Pereir, A.G., Qiu, Z., Zhang, Y., 2007. Visible/near infrared spectrometric technique for nondestructive assessment of tomato 'Heatwave' (*Lycopersicon esculentum*) quality characteristics. *J. Food Eng.* 81 (4), 672–678.

Soares, S. F. C., Gomes, A. A., Araujo, M. C. U., Galvao Filho, A. R., & Galvão, R. K. H. 2013. The successive projections algorithm. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 42, 84-98.

USDA, 2017. Laboratorio de Datos de Nutrientes, Servicio de Investigación Agrícola (ARS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos Base de datos del USDA Nacional de Nutrientes para Referencia Estándar, Versión 27; Laboratorio de Datos de Nutrientes, ARS, USDA : Beltsville, MD; <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/search>

Vitale, R., Bevilacqua, M., Bucci, R., Magrì, A. D., Magrì, A. L., & Marini, F. 2013. A rapid and non-invasive method for authenticating the origin of pistachio samples by NIR spectroscopy and chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 121, 90-99.

Yıldırım, A. N., San, B., Koyuncu, F., & Yıldırım, F. 2010. Variability of phenolics, α tocopherol and amygdalin contents of selected almond (*Prunus amygdalus* Batsch.) genotypes. *J Food Agr Environ*, 8, 76-79.

Zheng, T. T., & Zhang, J. 2015. Quality Analysis of Peanut Seed by Visible/Near-Infrared Spectra. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 35(3), 622-625.