



**UNIVERSIDAD
DE BURGOS**

MEMORIA TRABAJO FIN DE GRADO

**Optimización de un método para la determinación
de acrilamida mediante espectroscopía de
fluorescencia molecular y técnicas multivariantes**

Sandra Alonso Barrio

TUTORAS: Silvia Sanllorente Méndez
María de la Cruz Ortiz Fernández



**VISTO BUENO PARA PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA DEL
TRABAJO FIN DE GRADO**

GRADO EN: QUÍMICA

CURSO: 2017/18

Dña. Silvia Sanllorente Méndez y Dña. María de la Cruz Ortiz Fernández informan de que el alumno Dña. Sandra Alonso Barrio, ha realizado el trabajo "Optimización de un método para la determinación de acrilamida mediante espectroscopía de fluorescencia molecular y técnicas multivariantes" bajo su tutela, y consideran que la Memoria es adecuada para su presentación pública:

SI

NO *

(*) En caso negativo, indíquense los motivos:

OBSERVACIONES:

Burgos, a 1 de marzo de 2018

Fdo.: Silvia Sanllorente

Fdo.: María Cruz Ortiz

ARCHIVO DE LAS MEMORIA DEL TRABAJO FIN DE GRADO EN RIUBU

Dña. Sandra Alonso Barrio y Dña. Silvia Sanllorente Méndez y Dña. María de la Cruz Ortiz, autora y tutoras del Trabajo Fin de Grado autorizan que esta memoria sea transferida al Repositorio Institucional de la Universidad de Burgos (RIUBU) en la siguiente modalidad:

Acceso restringido

Acceso abierto Acceso abierto con periodo de embargo

Burgos, a 1 de marzo de 2018

Fdo.: Sandra Alonso

Fdo.: María Cruz Ortiz

Fdo.: Silvia Sanllorente

Índice

Resumen	1
Abstract	1
1. OBJETIVOS	2
2. INTRODUCCIÓN	2
3. TEORÍA	4
3.1 Fluorescencia molecular	4
3.2 Preparación de la muestra para análisis mediante fluorescencia molecular	6
3.3 Análisis de factores paralelos (PARAFAC)	7
3.4 Diseño de experimentos (D-optim)	9
4. EXPERIMENTAL	11
4.1 Reactivos	11
4.2 Instrumental	11
4.3 Software	11
4.4 Patrones y muestras	11
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
5.1 Modelos PARAFAC	12
5.2 Diseño de experimentos (D-optim)	14
5.3 Calibrado multivariante de la acrilamida	18
6. CONCLUSIONES	20
7. BIBLIOGRAFÍA	21



Resumen

Este trabajo describe un procedimiento nuevo y barato para determinar acrilamida. La acrilamida está reconocida como sustancia neurotóxica y carcinógena en animales y posiblemente en humanos según la Agencia de Investigación para el Cáncer (IARC).

Este procedimiento ha sido aplicado con éxito a la determinación de acrilamida mediante medidas de fluorescencia de excitación-emisión y PARAFAC (Análisis de Factores Paralelos). La reacción de degradación de Hofmann se lleva a cabo para transformar la amida en amina y posteriormente se forma el derivado fluorescente usando fluorescamina.

En primer lugar, se propone realizar una optimización multirrespuesta, para la determinación de acrilamida, utilizando un diseño D-óptimo para optimizar simultáneamente seis variables, cinco a dos niveles y una a tres niveles. Las dos respuestas optimizadas fueron las señales (loading muestrales) obtenidas de la descomposición PARAFAC: 1) El fluoróforo relacionado con el derivado de la acrilamida, que fue maximizado; 2) El fluoróforo relacionado con la señal del blanco, que fue minimizada. Ambos fluoróforos muestran intensidad fluorescente en el mismo rango de longitudes de onda registradas.

El diseño D-óptimo permite reducir el esfuerzo experimental de 96 a 14 experimentos garantizando la calidad de las estimaciones reduciendo el tiempo y coste del análisis. Las condiciones óptimas fueron: NaClO 0.02 mM, NaOH 0.03 M, 30 min, 85°C y fluorescamina 6mM. El modelo de calibración fue validado en un rango de concentración de 0-80 ppm. La propiedad de 'segundo orden' de PARAFAC permite identificar inequívocamente la acrilamida y diferenciarla del blanco.

Abstract

This work describes a new and cheap procedure to determine acrylamide. Acrylamide is recognized as a neurotoxin and carcinogen substance, in animals and possible in humans, by Agency on Research on Cancer (IARC).

This procedure has been successfully applied to determine acrylamide by means of excitation-emission fluorescence data and PARAFAC (Parallel Factor Analysis). The Hofmann degradation reaction is carried out to transform the amide to the amine and then the fluorescent derivative is formed by a reaction using fluorescamine.

First, a multiresponse optimization using a D-optimal design for simultaneously optimizing six variables, five at two levels and one at three levels, in the determination of acrylamide was proposed in this work. The two responses optimized were the signals (sample loadings) obtained from the decomposition PARAFAC: 1) the fluorophore related to the acrylamide derivate, that was maximized, and 2) the fluorophore related to blank that was minimized. Both fluorophores show fluorescence intensity in the same range of wavelength measured.

The D-optimal design allows reducing the experimental effort from 96 to 14 experiments guaranteeing the quality of the estimates reducing the time and cost of the analysis. The optimal conditions found were: NaClO 0.02 mM, NaOH 0.03 M, 30 min, 85°C and fluorescamine 6mM. The calibration model was validated for the linear range between 0-80 ppm. The second order property of PARAFAC let us to identify unequivocally the acrylamide and differentiating from blank.



1. OBJETIVOS

Los objetivos principales en este trabajo fueron los siguientes:

- Estudiar las variables experimentales que influyen en la reacción de degradación de Hofmann y en la formación del derivado fluorescente de la acrilamida.
- Optimizar estas variables experimentales mediante la utilización de un diseño D-óptimo utilizando como respuesta las señales (loadings muestrales) obtenidas con un modelo análisis de factores paralelos (PARAFAC).
- Identificar inequívocamente la acrilamida utilizando una descomposición PARAFAC junto con datos procedentes de fluorescencia molecular de excitación emisión.
- Ampliar conocimientos específicos sobre espectroscopía de fluorescencia molecular, metodología de diseño de experimentos y PARAFAC.
- Desarrollar competencias tanto transversales como específicas enmarcadas en el trabajo fin de grado, tales como, trabajo autónomo en el laboratorio, búsqueda bibliográfica, capacidad de comunicación oral y escrita.

2. INTRODUCCIÓN

La acrilamida es un producto conocido desde hace años, tiene muchas aplicaciones en la industria química, por ejemplo, como floculante para clarificar el agua, en polimerización "in situ" en presas, como aglutinante en la industria del papel, en cosmética, síntesis de genes en laboratorio, extracción de metales, industria textil, obtención de colorantes, etc [1].

En 2002 científicos de la Universidad de Estocolmo, Suecia, descubrieron la formación de acrilamida en ciertos tipos de alimentos cuando son sometidos a calentamiento a altas temperaturas. Poco después de dicho descubrimiento, investigadores de distintas universidades, industrias y laboratorios oficiales comenzaron una serie de estudios con el objeto de comprender el origen de la producción de acrilamida en los alimentos. Estos estudios pusieron de manifiesto que, a altas temperaturas, la descarboxilación y desaminación de la asparagina producía acrilamida. Sin embargo, otros estudios no detectaron formación de acrilamida al someter asparagina por sí sola a altas temperaturas. Finalmente, se estableció que la formación de acrilamida requería la presencia de azúcares reductores y temperaturas superiores a 100 °C. Esto llevó a la conclusión de que la formación de acrilamida está íntimamente ligada a la reacción de Maillard (Figura 2.1), que también es responsable del sabor y coloración típicos de los productos fritos [1,2].



Figura 2.1 Reacción de formación de la acrilamida

La cantidad producida de acrilamida depende del proceso de cocinado, el tiempo y la temperatura de cocción, largos periodos de tiempo y temperaturas altas constituyen mayor riesgo que tiempos cortos y temperaturas más bajas. Podemos encontrar acrilamida en una amplia variedad de alimentos, preparados de manera industrial, en



restaurantes o en alimentos preparados en casa. Los productos que más acrilamida contienen son las patatas chips, patatas fritas, pan tostado, café, galletas y pastelería [2,3].

A raíz de dichas investigaciones, se llevó a cabo el estudio en animales para establecer posibles aspectos toxicológicos de la acrilamida en seres humanos. Los resultados de laboratorio han mostrado hasta ahora que la acrilamida en la dieta causa cáncer en animales, la evidencia en humanos no es tan concluyente. Sin embargo, parece que los alimentos en los que se forma acrilamida son potencialmente causantes de algún tipo de cáncer, lo que apunta que sería prudente reducir la exposición, tal y como aseguran los expertos de la Agencia de Normas Alimentarias del Reino Unido o Food Standards Agency (FSA). Por su parte, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) ha clasificado a la acrilamida como un “probable carcinógeno humano”, debido a su potencial para dañar el ADN y causar cáncer. Por eso, tanto la FSA como la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) tratan este tema como un problema de seguridad alimentaria [1,2].

La Organización Mundial de la Salud y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) declararon que las concentraciones de acrilamida en los alimentos representan una “gran preocupación” y que es necesario llevar a cabo más investigaciones para determinar el riesgo de la exposición a la acrilamida a través los alimentos [3].

Actualmente, se siguen realizando estudios para identificar la acrilamida en otros alimentos, así como sus mecanismos de formación, diversos métodos de análisis, toxicología, niveles de exposición, entre otros [3].

Hasta el momento no se especifica ni se recomienda un método de análisis en concreto, sino que algunos existentes están siendo objetos de estudio, y otros se están creando para este fin. Entre los métodos más utilizadas hasta ahora para la determinación de acrilamida con o sin derivatizar se encuentran la cromatografía de gases acoplada con masas (CG-MS) [5,6], detección de captura de electrones (ECD) [7] también se han utilizado métodos de análisis con cromatografía líquida de alta eficacia acoplada con la espectrofotometría de masas (LC-MS) [8], y espectrometría de masas tándem (MS-MS) [9-11] y con espectrometría de masas de alta resolución (HR-MS) [12]. Incluso se ha utilizado fluorescencia de espectroscopia molecular [13].

Cada método difiere en la preparación de la muestra, en el costo, en la complejidad de la matriz y en el tiempo que se requiere para cada uno, sin embargo, dan resultados muy similares. El estudio del método adecuado seguirá hasta poder determinar uno en especial, sin que se tenga problemas de costes y de capacidad de realización del método.

En este trabajo se va a optimizar, empleando la metodología de diseño de experimentos junto con un modelo PARAFAC, un procedimiento analítico para la determinación de acrilamida mediante espectroscopía de fluorescencia molecular. La finalidad es disponer de un procedimiento sencillo y que permita ahorrar tiempo y reactivos.

3. TEORÍA

3.1 Fluorescencia molecular

La fluorescencia molecular es un tipo de espectroscopia basada en un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por absorción de la radiación electromagnética. Las especies excitadas se relajan al estado fundamental, liberando su energía en forma de fotones [14].

En la espectroscopia de fluorescencia, las moléculas son excitadas mediante absorción de fotones, desde su estado electrónico y vibracional fundamental (S_0), a uno de los diversos estadios vibracionales de los estados electrónicos excitados (S_1 , S_2 ...) (Figura 3.1.1). Una vez que la molécula se excita, son posibles varios procesos con los que la molécula pierde su exceso de energía, siendo dos de los más importantes la relajación no radiante y la emisión fluorescente [14,15].

Los dos mecanismos de relajación no radiante de mayor importancia que compiten con la fluorescencia son la relajación vibracional y la conversión interna (Figura 3.1.1). En sistemas condensados, como cuando se opera en disolución, el exceso de energía vibracional se pierde inmediatamente como consecuencia de los choques entre las moléculas excitadas y el disolvente. Este proceso, que recibe el nombre de relajación vibracional, deja a las moléculas en el menor estado vibracional de un estado electrónico [15,16]. También es posible este tipo de relajación entre los niveles vibracionales inferiores de un estado electrónico excitado y los niveles vibracionales superiores de otro estado electrónico inferior, denominándose en este caso conversión interna.

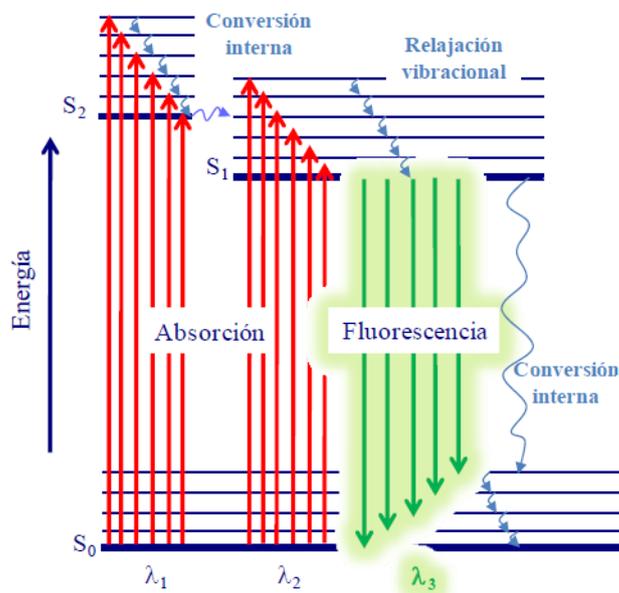


Figura 3.1.1: Diagrama de niveles de energía de una molécula con las vías para la desactivación de un estado excitado.



Especies fluorescentes

Una determinación fluorimétrica puede llevarse a cabo bien tras la formación de un derivado fluorescente o bien aprovechando la fluorescencia “nativa” del compuesto.

Todas las moléculas absorbentes tienen potencial para ser fluorescentes, pero muchos compuestos no lo hacen porque su estructura permite otros mecanismos de relajación sin radiación que ocurren con mayor rapidez que la emisión de fluorescencia [14]. Tanto la estructura molecular como el entorno químico (factores dependientes del medio en que se trabaje) van a influir en que una sustancia sea o no luminiscente y en la intensidad de la emisión cuando tiene lugar la fotoluminiscencia [15,16]. El pH, la temperatura y el disolvente, también influyen en que una sustancia sea o no fluorescente [14,16].

Espectro de fluorescencia

Un espectro de fluorescencia suele constar de una sola banda con muchas líneas estrechas, que representan las transiciones desde el nivel vibracional mínimo del estado excitado hasta los distintos niveles vibracionales del estado fundamental [14]. Las bandas de fluorescencia molecular se componen principalmente de líneas de longitud de onda más larga, frecuencia más baja y, por tanto, menor energía si se comparan con la banda de radiación absorbida que origina su excitación. Esta desviación o desplazamiento a longitudes de onda mayores se denomina desplazamiento de Stokes [15,16].

Pueden registrarse espectros de excitación y de emisión. El espectro de excitación se obtiene midiendo la intensidad de fluorescencia en función de la longitud de onda de excitación a una longitud de onda de emisión fija. El espectro de emisión se obtiene midiendo la intensidad de la emisión fluorescente en función de la longitud de onda de emisión, a longitud de onda de excitación fija. Ambos espectros reflejan las transiciones electrónicas de la molécula, pero el espectro de emisión aparece, a longitudes de onda más altas que el de excitación, debido a procesos de relajación no radiante [16].

Instrumentación

Un espectrofluorímetro (Figura 3.1.2) consta de una lámpara de arco de Xenón la cual emite luz blanca en un amplio rango de longitudes de onda que abarcan desde el UV, aproximadamente 240 nm, hasta el infrarrojo, aproximadamente 900 nm. Este rayo de luz es recogido por el monocromador primario o de excitación (M_1) el cual selecciona la longitud de onda (λ_{ex}) que va a incidir sobre la muestra y es determinada por el espectro de absorción de cada fluoróforo. El rayo de luz con la longitud de onda λ_{ex} incide sobre la cubeta que contiene a la muestra. Las cubetas pueden ser de diferentes tipos (cuarzo, vidrio, etc.) dependiendo de la longitud de onda en la cual leamos. La emisión de fluorescencia generalmente es detectada a 90° del rayo de luz de excitación. Es recogida por un sistema de lentes y pasa a través de un monocromador secundario o de emisión (M_2) el cual separa la fluorescencia emitida por la muestra de la luz de excitación, con una longitud de onda determinada (λ_{em}). La luz incide en un fotodetector que convierte los fotones de fluorescencia en una señal eléctrica. Otro componente muy importante es el canal de referencia que es un sistema que crea una señal electrónica proporcional a la intensidad de luz incidente en la muestra [14].

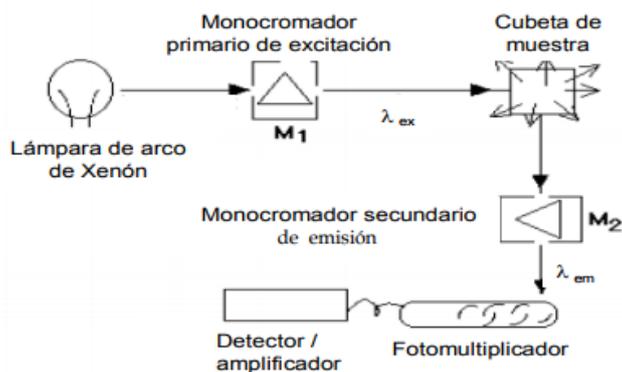


Imagen 3.1.2: Representación esquemática de un espectrofluorímetro

3.2 Preparación de la muestra para análisis mediante fluorescencia molecular

Para poder analizar la acrilamida empleando espectroscopía de fluorescencia molecular es necesario realizar una serie de reacciones químicas para formar un derivado fluorescente. Para lo cual, en primer lugar, se lleva a cabo un proceso de transformación de la acrilamida de acuerdo con la reacción de la degradación de Hoffman (Figura 3.2.1), donde la acrilamida (amida primaria) es convertida en una amina primaria en presencia de hipoclorito de sodio, hidróxido de sodio y calor [13,17].

La acrilamida es desprotonada por la base hidróxido de sodio, la cual sustrae el protón N-H ácido produciendo un anión amida. Después, el anión amida reacciona con el cloro del hipoclorito de sodio en una reacción de sustitución alfa para dar cloroamida. El efecto inductivo atractor de electrones del cloro sobre el nitrógeno aumenta la acidez de la cloroamida permitiendo su deprotonación por la base formándose anión cloroamida estabilizado por resonancia, el cual se reajusta cuando el grupo R unido al carbono del grupo carbonilo migra al nitrógeno al mismo tiempo que sale el ion cloro, formando un isocianato. Al isocianato se le adiciona agua en un paso de adición nucleófila para producir un ácido carbámico. El ácido carbámico pierde espontáneamente CO_2 para dar la amina [17].

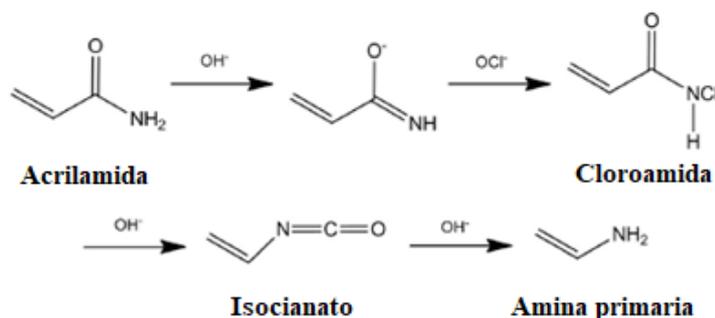


Figura 3.2.1 Reacción de degradación de Hofmann

Para la detección mediante fluorescencia molecular, se utiliza fluorescamina, la cual, al reaccionar con el grupo amino primario genera un complejo fluorescente (Figura 3.2.2) [17].

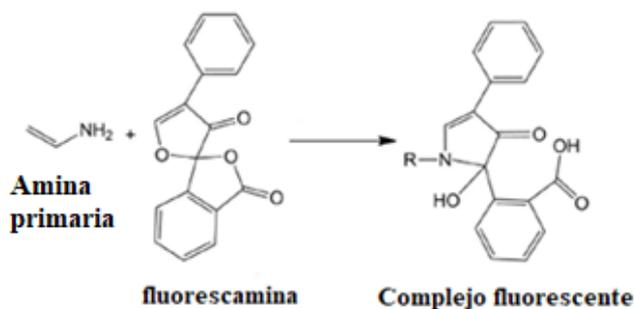


Figura 3.2.2 Reacción de formación del derivado fluorescente

3.3 Análisis de factores paralelos (PARAFAC)

El Análisis de Factores Paralelos (PARAFAC, Parallel Factor Analysis) es una técnica multivariante [18] apropiada para analizar datos de tres vías, es decir, datos estructurados en un cubo. A estos cubos de datos se les denomina también tensores. La técnica analítica utilizada en este trabajo, fluorescencia molecular de excitación-emisión, es especialmente indicada para proporcionar este tipo de datos ya que por cada muestra medida se tiene una matriz de intensidades fluorescentes (para cada longitud de onda de excitación se tiene un espectro completo de emisión) y concatenando matrices de distintas muestras se obtiene en cubo de datos.

PARAFAC es un método de descomposición muy utilizado con datos multivía [19]. En el caso particular de tres vías, la descomposición del cubo de datos \underline{X} , de dimensión $(I \times J \times K)$, origina triadas o factores, F , estando cada uno de ellos formado por tres vectores *loading* (*pesos*) a_f , b_f y c_f . De esta forma, el modelo PARAFAC de un tensor de tres vías viene dado por tres matrices *loadings*, A, B y C, cuyas columnas se corresponden con los vectores *loadings* anteriores y las dimensiones de estas matrices son $I \times F$, $J \times F$ y $K \times F$, respectivamente. El modelo PARAFAC se obtiene minimizando la suma de cuadrados de los residuos, e_{ijk} , de la ecuación (1).

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk}, \quad i = 1, 2, \dots, I; \quad j = 1, 2, \dots, J; \quad k = 1, 2, \dots, K \quad (1)$$

La Figura 3.3.1 es una representación gráfica de un modelo PARAFAC con F factores. En la misma se observan tres perfiles (o vías), el perfil de excitación, el de emisión y el muestral y también la ecuación general de un modelo PARAFAC. Si los datos son trilineales la descomposición PARAFAC es única y es capaz de dar el perfil específico de cada uno de los fluoróforos contenidos en la muestra: el de excitación, el de emisión y el muestral. PARAFAC es muy importante en Química Analítica, porque tiene la propiedad de unicidad: si en estos cubos de datos, cada matriz (muestra) difiere de las otras sólo en la cantidad del fluoróforo, PARAFAC es capaz de obtener un perfil único para cada uno de los fluoróforos contenidos en la muestra. Esta propiedad también se denomina ‘propiedad de segundo orden’.

Modelo Trilineal (EEM)

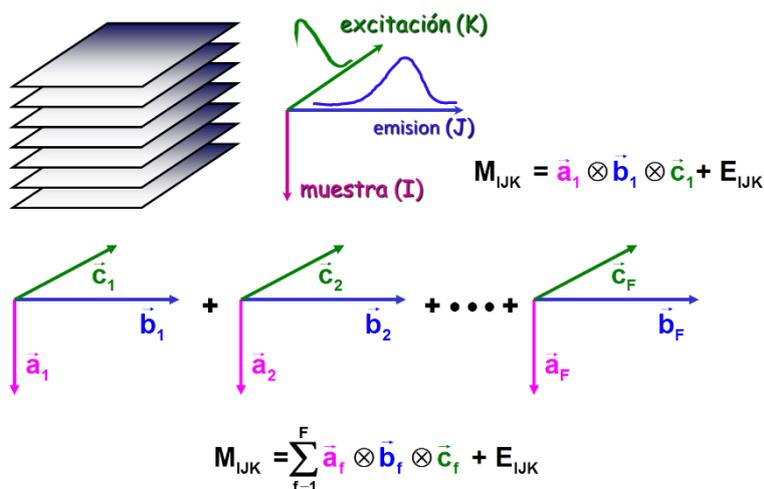


Figura 3.3.1 Representación gráfica y ecuación general de un modelo PARAFAC, de F factores, obtenido a partir de un tensor de datos de tres vías.

La espectroscopía de fluorescencia molecular es una técnica rápida y barata respecto a otro tipo de instrumentación, sin embargo, las señales que proporciona en determinados análisis son complejas, ya que los fluoróforos presentes en la muestra pueden tener sus señales solapadas en el rango de medida y por este motivo se considera una técnica inespecífica. En la Figura 3.3.2 se muestran dos matrices de excitación-emisión para un blanco y para un patrón de acrilamida con 40 ppm donde se observa este fuerte solapamiento.

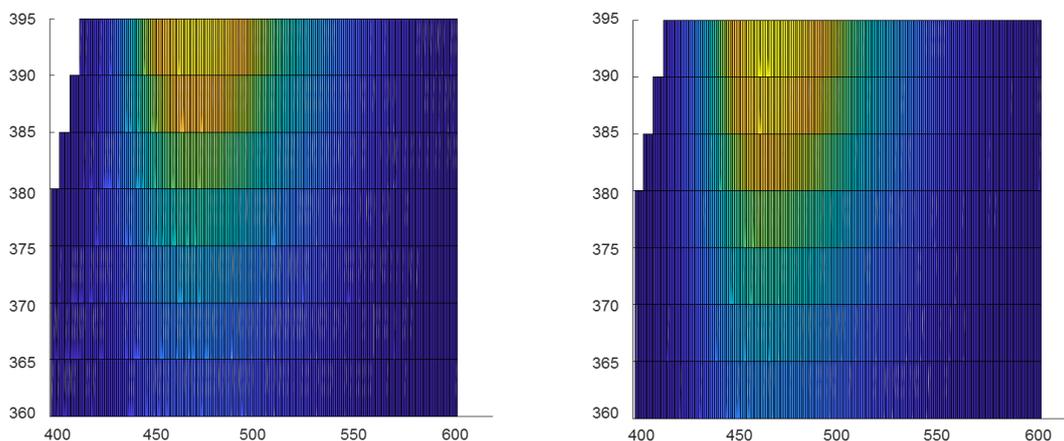


Figura 3.3.2 Matrices de excitación-emisión de un blanco y de un patrón de acrilamida de 40 ppm.

Mediante el uso apropiado de datos multivía y una descomposición PARAFAC es posible obtener la especificidad necesaria para poder separar de la señal de la acrilamida la parte que se corresponde al blanco. Con esta descomposición los datos del perfil muestral, de cada factor, son proporcionales a la cantidad de cada analito en la muestra y es posible utilizarlos como respuesta en diseños de experimentos (donde el perfil



muestral cambia debido a las distintas condiciones analíticas en las que se realiza el experimento). También se utiliza este perfil muestral para construir la función de calibrado, siendo en este caso cada matriz del cubo un patrón de calibrado. La utilización de técnicas multivía en los análisis oficiales es posible debido a la introducción de la noción de método validado como alternativa al método de referencia [20].

En el caso de la espectroscopía de fluorescencia molecular, la identificación inequívoca del analito se lleva a cabo mediante la correlación entre un espectro de referencia registrado y el espectro de la muestra problema que ha sido obtenido después de hacer la descomposición con PARAFAC. Suponiendo que una muestra tenga más de un fluoróforo que proporciona señal en el mismo rango de medida, el uso de PARAFAC permitirá separar (identificar) y atribuir inequívocamente cada señal al analito correspondiente.

3.4 Diseño de experimentos (D-óptimo)

En este trabajo se ha utilizado la metodología de diseño de experimentos. Esta metodología permite hacer experimentos de modo que la información requerida se obtenga del modo más eficiente y sea la más precisa posible. Al hacer un diseño de experimentos hay que definir: i) los factores que pueden influir en las respuestas que luego se van a optimizar, ii) las respuestas, iii) una función matemática (modelo) para relacionar la variación en los factores con la variación en la respuesta, iv) finalmente se establece el dominio experimental de interés para el problema. Este dominio recoge las limitaciones experimentales para los factores y otras de tipo práctico como coste, gasto de reactivos, tiempo etc.

Mediante el modelo se decide la influencia de los factores sobre la respuesta. Los coeficientes del modelo (en nuestro caso concreto la Ecuación 2 se estiman por mínimos cuadrados. El factor i -ésimo (variable X_i del modelo) es significativo si el coeficiente b_i es distinto de cero. El signo en el modelo final de presencia-ausencia nos indicará en qué nivel han de ponerse los factores experimentales para obtener un máximo o un mínimo en las respuestas.

$$Y = b_0 + b_{1A}X_{1A} + b_{2A}X_{2A} + b_{3A}X_{3A} + b_{4A}X_{4A} + b_{5A}X_{5A} + b_{6A}X_{6A} + b_{6B}X_{6B} + b_{3A4A}X_{3A}X_{4A} + \varepsilon \quad (2)$$

Como consecuencia de haber utilizado un modelo y dar significado a sus coeficientes hay que validar estadísticamente el mismo y ver si es compatible con los datos experimentales obtenidos en el laboratorio. Para esto último se utilizan dos test de hipótesis el de significación del modelo y el test de fallo de ajuste. Las hipótesis nulas de estos dos test son H_0 : El modelo no es significativo y H_0 : El modelo no tiene fallo de ajuste para el primero y segundo respectivamente.

En este trabajo se han utilizado diseños D-óptimos, estos diseños permiten con menor esfuerzo experimental optimizar procedimientos analíticos que dependen de muchas variables, en los que si se utilizara un diseño factorial completo exigiría hacer demasiados experimentos y por tanto consumir más reactivos y tiempo.

En los diseños D-óptimos se parte de un diseño factorial completo, en nuestro caso vamos a trabajar con seis variables cinco de ellas (cinco primeras de la Tabla 3.4.1) a dos niveles y una sexta a tres niveles y además se quiere ver si existe interacción entre dos de ellas, el tiempo y la temperatura en la que se lleva a cabo una de las reacciones utilizada para formar el compuesto fluorescente con la acrilamida. El diseño completo



estaría formado por 96 experimentos ($2^5 \times 3^1$) y, sin embargo, mediante el diseño D-óptimo se ha logrado reducir a 12 experimentos (dos de las experiencias se han replicado dos veces figuran con una 'r' (ver Tabla 5.2.1). Se han replicado para obtener un modo eficaz de estimar la varianza y poder realizar el test del fallo de ajuste.

El modelo que se ha ajustado para observar el efecto de estos factores sobre las dos respuestas es el de la Ecuación 2. Todos los factores y sus niveles se muestran en la Tabla 3.4.1. Las respuestas que se quieren optimizar son la señal fluorescente del producto derivatizado (derivado de la acrilamida) y la señal del blanco, que también presenta fluorescencia en el rango de medida de la propia acrilamida. Se pretende maximizar la primera y minimizar la señal del blanco.

Tabla 3.4.1. Factores, variables codificadas y dominio experimental de interés en la optimización de las reacciones químicas efectuadas.

Factores	Nivel A	Nivel B	Nivel C
1 NaClO (mM)	0.02	0.05	--
2 NaOH (M)	0.02	0.03	--
3 t (min)	10	30	--
4 T (°C)	30	85	--
5 pH	7	9	--
6 Fluorescamina (mM)	1	3.5	6

Las variables discretas x_{ij} ($i = 1, 2, 3, 4, 5, 6$ y $j = A, B$) del modelo de la Ecuación 2 codifican el factor y nivel de acuerdo a los valores contenidos en la Tabla 3.4.2. En este modelo (reducido) las cinco variables (NaClO, NaOH, t, T, pH) están a dos niveles y la concentración de fluorescamina a tres niveles lo que permite observar el cambio entre los niveles del mismo factor. En el modelo reducido, por ejemplo, x_{1A} es igual a 1 cuando el factor 1 está a nivel A, y vale -1 cuando el factor 1 está en el nivel B. En el caso de factor 6 con tres niveles puede verse la codificación en la Tabla 3.4.2.

Tabla 3.4.2. Valores de las variables x_{ij} en la ecuación 2.

Factor i ($i = 1, 2, 3, 4, 5$)		Factor 6		
Nivel A	$x_{iA} = 1$	Nivel A	$x_{6A} = 1$	$x_{6B} = 0$
Nivel B	$x_{iA} = -1$	Nivel B	$x_{6A} = 0$	$x_{6B} = 1$
		Nivel C	$x_{6A} = -1$	$x_{6B} = -1$

Después de calcular los coeficientes, el modelo se transforma en un modelo de 'presencia-ausencia' que modela separadamente el efecto de cada nivel sobre las respuestas, de este modo si el factor tiene un efecto no lineal sobre las respuestas se puede detectar en el caso de utilizar tres niveles para ese factor (fluorescamina en nuestro caso).



El modelo de la Ecuación 2 tiene 9 coeficientes b_{ij} , por tanto, como mínimo tenemos que hacer 9 experiencias para estimar los coeficientes. El algoritmo realizado con el programa [23] nos indica qué experimentos hay que realizar. Nos proporciona varios conjuntos de experiencias tomando de varias formas posibles 'n' experimentos del total de los 96 que conforman el diseño factorial completo. Todos estos conjuntos de 'n' experimentos son los que dan la estimación global más precisa. En el trabajo se ha elegido $n=12$ experimentos para tener suficientes grados de libertad. Además, se han repetido dos veces dos de ellos para evaluar mejor la varianza y poder hacer el test de fallo de ajuste. La precisión en las estimaciones de los coeficientes del modelo se puede ver observando los factores de inflación de varianza, denominados VIF (Variance Inflation Factor), que según la teoría deben ser menores de 4 [24].

4. EXPERIMENTAL

4.1 Reactivos

Para la preparación de muestras y patrones se utilizó acrilamida (MERCK; N.º CAS 78-06-1), hipoclorito de sodio 14% Cl_2 en solución acuosa (VWR CHEMICALS; N.º CAS 7681-52-9), hidróxido de sodio (PANREAC; N.º CAS 1310-73-2), ácido bórico (SIGMA-ALDRICH; N.º CAS 10043-35-3), cloruro de potasio (SCHARLAU; N.º CAS 7447-40-7), fluorescamina (ALFA AESAR; N.º CAS 38183-12-9), acetona (MERCK; N.º CAS 67-64-1).

4.2 Instrumental

Las derivatizaciones a temperatura controlada se desarrollaron en un baño de agua equipado con un termostato de inmersión Digiterm 200 (JP Selecta S.A., Barcelona, Spain).

El análisis de las muestras se ha realizado a temperatura ambiente empleado un espectrofluorímetro PerkinElmer LS 50B (Waltham, MA, USA) equipado con una lámpara de descarga de xenón, una cubeta de cuarzo SUPRASIL® de 10 mm y volumen de 3.5 mL (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Las matrices de datos correspondientes de excitación-emisión fueron registradas en los siguientes rangos de longitudes de ondas: emisión entre 400–600 nm (cada 1 nm) y excitación 360–395 nm (cada 5 nm). La anchura de la rendija del monocromador fue en ambos casos de 10 nm. La velocidad de barrido 1500 nm min^{-1} y el software utilizado FL WinLab (PerkinElmer) se empleó para la adquisición de las señales.

4.3 Software

El diseño experimental se ha realizado y analizado con NEMROD W [23]. Los modelos de regresión por mínimos cuadrados se han ajustado con STATGRAPHICS Centurión XVII [25]. Los modelos PARAFAC han sido obtenidos con MATLAB [21] utilizando el Toolbox 7.9.5 [22].

4.4 Patrones y muestras

Inicialmente se prepararon las disoluciones madre de 1 M de hidróxido de sodio, 0.24 mM de hipoclorito de sodio y 100 ppm de acrilamida, todas ellas en agua destilada.

Para llevar a cabo la reacción de Hofmann, se preparan una serie de muestras a una concentración constante de acrilamida de 20 ppm y se añaden concentraciones de



hipoclorito de sodio y de hidróxido de sódico en las cantidades marcadas por el diseño (tabla 4.4.1).

Cada una de estas muestras se colocan en un baño termostático a las temperaturas y tiempos marcados por el diseño.

Una vez realizada la reacción de Hofmann, la siguiente etapa es formar el derivado fluorescente, para lo cual se toma 1.5 mL de muestra derivatizada y se añaden 2 mL de tampón borato para ajustar los pH, y 0.5 mL de fluorescamina según las especificaciones del diseño (tabla 4.4.1).

Se esperan cinco minutos para estabilizar la reacción y finalmente se registran los espectros de emisión para ocho longitudes de onda de excitación en los rangos especificados en el apartado 4.2.

El mismo procedimiento descrito anteriormente se ha llevado a cabo para realizar los blancos en ausencia de acrilamida.

Tabla 4.4.1: Plan de experimentación del diseño D-óptimo

Núm. del experimento del diseño factorial	Reacción de derivatización				Fluorescencia	
	NaClO	NaOH	t	T	pH	Fluorescamina
	mM	M	min	°C		mM
7	0.02	0.03	30	30	7	1
11	0.02	0.03	10	85	7	1
18	0.05	0.02	10	30	9	1
30	0.05	0.02	30	85	9	1
33	0.02	0.02	10	30	7	3.5
48	0.05	0.03	30	85	7	3.5
53	0.02	0.02	30	30	9	3.5
60	0.05	0.03	10	85	9	3.5
70	0.05	0.02	30	30	7	6
73	0.02	0.02	10	85	7	6
84	0.05	0.03	10	30	9	6
95	0.02	0.03	30	85	9	6

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Modelos PARAFAC

Una vez obtenidas las matrices de excitación-emisión (EE), de los experimentos del diseño se procede a construir el cubo datos concatenando estas 12 matrices más los 4 experimentos replicados que figuran en la Tabla 5.2.1.

Los modelo PARAFAC se han llevado a cabo con los dos cubos de datos (en ausencia y presencia de acrilamida) de dimensión $(8 \times 201 \times 16)$ dónde 8 indica las longitudes de onda de excitación, 201 las longitudes de onda de emisión y 16 el número de muestras del diseño de experimentos.



El modelo para la acrilamida consta de dos factores (uno relacionado con la acrilamida y el segundo con el blanco), su índice CORCONDIA que es una medida de la trilinealidad del modelo alcanza el 100%. Los 16 loadings del perfil muestral son los que figuran como respuesta Y_1 en la Tabla 5.2.1. Se ha identificado los perfiles de excitación y emisión con el primer factor (en azul en la Figura 5.1.1.a-b). La correlación del espectro de emisión extraído matemáticamente con el modelo PARAFAC para este factor y una muestra de referencia de acrilamida, es 0.999. También se ha identificado el perfil de excitación, en este caso la correlación del perfil extraído en la descomposición PARAFAC y el de la muestra de referencia es de 0.997.

En el caso del modelo para los blancos PARAFAC proporciona un modelo de un único factor como era de esperar. En el caso de un único factor el índice de CORCONDIA es siempre 100%. Los loadings figuran, en la columna Y_2 , en la Tabla 5.2.1.

La Figura 5.1.1. muestra los tres perfiles con los dos factores (en azul la acrilamida, en rojo el blanco).

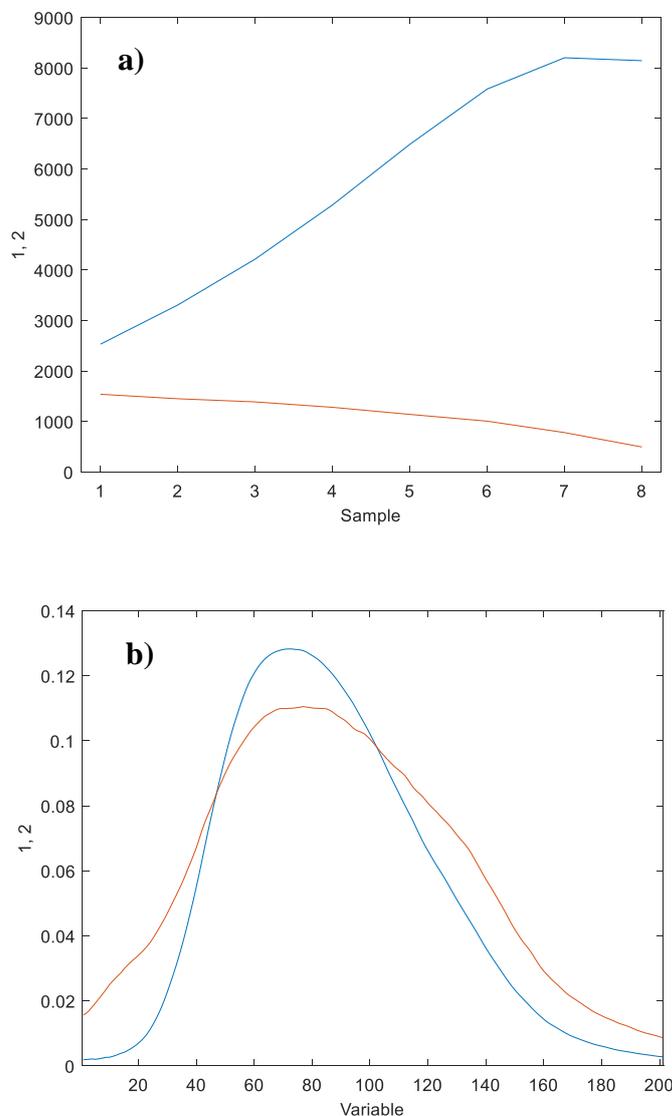


Figura 5.1.1. Perfil de excitación (a), emisión (b) y muestral (c) para el modelo PARAFAC de la acrilamida. En azul el factor para la acrilamida, el blanco en rojo.

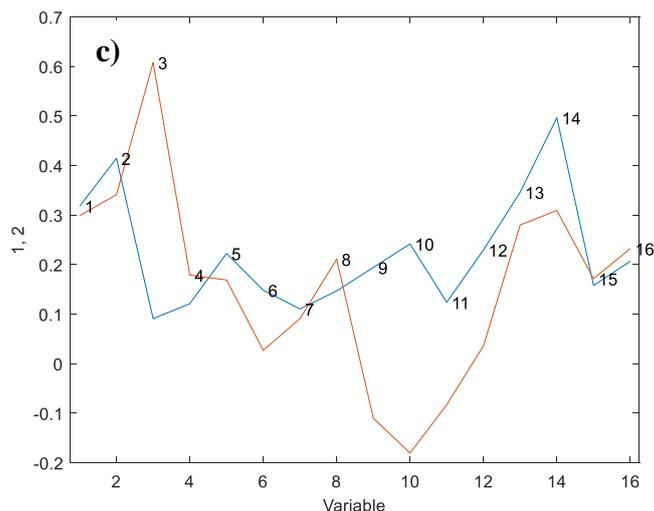


Figura 5.1.1 continuación. Perfil de excitación (a), emisión (b) y muestral (c) para el modelo PARAFAC de la acrilamida. En azul el factor para la acrilamida, el blanco en rojo.

5.2 Diseño de experimentos (D-óptimo)

Las respuestas implicadas en el diseño son las señales (loadings muestrales) obtenidos para la acrilamida y para el blanco. Estos datos figuran en la Tabla 5.2.1, en las columnas segunda a séptima se muestran los niveles de cada uno de los factores en cada experimento. En las tres últimas columnas de la Tabla 5.2.1 figuran las respuestas obtenidas con el modelo PARAFAC, son los loadings muestrales (pesos) relacionados con la señal fluorescente para la acrilamida (Y_1), para el blanco (Y_2) y para la respuesta obtenida con la transformación Box-Cox para el blanco (inverso de la raíz cuadrada de la señal del blanco, $1/Y_2^{0.5}$). Esta última transformación fue necesaria realizarla para que el modelo del blanco fuera significativo y no tuviera fallo de ajuste. En este modelo el experimento número 12 tiene un residuo en la regresión elevado y ha tenido que ser eliminado.



Tabla 5.2.1. Plan experimental del diseño D-óptimo y respuestas obtenidas. Y_1 : loadings del primer factor para la señal de la acrilamida; Y_2 : loadings de la señal del blanco (modelos PARAFAC del epígrafe 5.1).

Exp	NaClO (mM)	NaOH (M)	t (min)	T °C	pH	Fluorescamina (mM)	Y_1 Acrilamida	Y_2 Blanco	$1/Y_2^{0.5}$ Blanco
1	0.02	0.03	30	30	7	1	0.318	0.098	3.186
2	0.02	0.03	10	85	7	1	0.414	0.115	2.949
3r1	0.02	0.03	10	85	7	1	0.346	0.236	2.058
4r2	0.02	0.03	10	85	7	1	0.497	0.172	2.411
5	0.05	0.02	10	30	9	1	0.088	0.289	1.860
6	0.05	0.02	30	85	9	1	0.121	0.063	3.994
7r1	0.05	0.02	30	85	9	1	0.157	0.066	3.881
8r2	0.05	0.02	30	85	9	1	0.206	0.077	3.594
9	0.02	0.02	10	30	7	3.5	0.223	0.275	1.907
10	0.05	0.03	30	85	7	3.5	0.149	0.225	2.108
11	0.02	0.02	30	30	9	3.5	0.110	0.653	1.237
12	0.05	0.03	10	85	9	3.5	0.146	0.076	3.618
13	0.05	0.02	30	30	7	6	0.196	0.289	1.860
14	0.02	0.02	10	85	7	6	0.244	0.085	3.424
15	0.05	0.03	10	30	9	6	0.125	0.377	1.629
16	0.02	0.03	30	85	9	6	0.230	0.051	4.441

Con estos datos, se estiman por mínimos cuadrados, los coeficientes del modelo para ambas respuestas. Los coeficientes estimados figuran en la Tabla 5.2.2 (segunda y cuarta columna), el asterisco indica aquellos coeficientes que son significativamente distintos de cero. En estos diseños todos los VIF, tanto para el modelo de la acrilamida como para el modelo del blanco, son mucho menores de 4 lo que indica gran precisión en las estimaciones. Cada coeficiente tiene un VIF distinto (tercera y quinta columna de la Tabla 5.2.2) y son distintos para ambos modelos porque en el caso del modelo del blanco un experimento, en número 12, se le consideró anómalo y se tuvo que eliminar para poder obtener un modelo válido.

En las tres últimas filas de esta Tabla 5.2.2 se anotan los valores de probabilidad de los dos test realizados: el de significación y el test del fallo de ajuste. Ambos modelos pasan los dos test (P-valor < 0.05 para el primer test y P-valor > 0.05 para el segundo). El coeficiente de determinación, R^2 , indica en porcentaje, la varianza explicada de la respuesta proporcionando valores de 87.80% y 93.90% para el modelo de la acrilamida y el blanco respectivamente, lo que indica un buen ajuste de ambos modelos.



Tabla 5.2.2 Modelos ajustados para las respuestas Y_1 (acrilamida), $1/Y_2^{0.5}$ (blanco). Coeficientes del modelo de acuerdo con la Eq. (2), coeficiente of determinación (R^2), p-valores de los test de significación de la regresión y del fallo de ajuste.

Coeficientes	Y_1	VIF (Y_1)	$1/Y_2^{0.5}$	VIF($1/Y_2^{0.5}$)
b_0	0.205*		2.242*	
b_{1A}	0.049	1.53	0.655*	2.25
b_{2A}	-0.025	1.24	0.248	1.33
b_{3A}	0.008	1.14	-0.546*	1.39
b_{4A}	-0.020	1.17	-0.379*	1.34
b_{5A}	0.041	1.53	0.228	2.25
b_{6A}	0.054*	1.32	0.560*	1.84
b_{6B}	-0.048	1.24	-1.156*	2.07
b_{3A4A}	-0.012	1.53	0.693*	2.81
Test de significación de la regresión (P-valor)	$1.27 \cdot 10^{-3}$		$4.01 \cdot 10^{-3}$	
Test del fallo de ajuste (P-valor)	0.526		0.326	
R^2 (%)	87.80		93.90	

Las Figuras 5.2.1 (a-b) muestran en forma de barras el efecto de los factores sobre la respuesta. La línea punteada indica el valor crítico para determinar si el coeficiente es significativo. Para el caso del modelo de la acrilamida (Figura 5.2.1.a) se quiere maximizar la señal, por tanto se deberá trabajar en los niveles que proporcionan un coeficiente positivo, es decir el A1 a nivel bajo (NaClO igual a 0.02 mM), el B2 a nivel alto (NaOH igual a 0.03 M), C1 a nivel bajo ($t = 10$ minutos), D2 a nivel alto (85°C), E1 a nivel bajo ($\text{pH} = 7$) y F1 al nivel más bajo (Fluorescamina 1 mM). El coeficiente que rige la interacción es coherente con lo obtenido ya que debemos elegir C1D2.

Para el caso del modelo del blanco (Figura 5.2.1 b), se busca un mínimo, pero como se ha transformado la respuesta haciendo el inverso de la raíz de la respuesta equivale a que tenemos que buscar también valores que maximicen la misma. Y los valores encontrados son: A1, B1, C2, D2, E1, F1 (o F3) y C2D2. Es obvio que las condiciones que van bien al modelo de la acrilamida no todas coinciden con las que maximizan el blanco, hay dos condiciones experimentales, factor B, C y F que no lo hacen. Hay que llegar a una solución de compromiso.

En la Tabla 5.2.3, tercera columna se anotan las condiciones elegidas. El factor B (NaOH) no es significativo con lo cual no tiene mucha importancia elegir uno u otro nivel. El factor C (tiempo) es significativo al nivel C2 para el caso del blanco por lo que se elige nivel alto (C2) también concuerda con la interacción que significativa para el blanco C2D2 como puede verse en la Figura 5.2.1b. El factor F (concentración de fluorescamina) se pone al nivel F3.

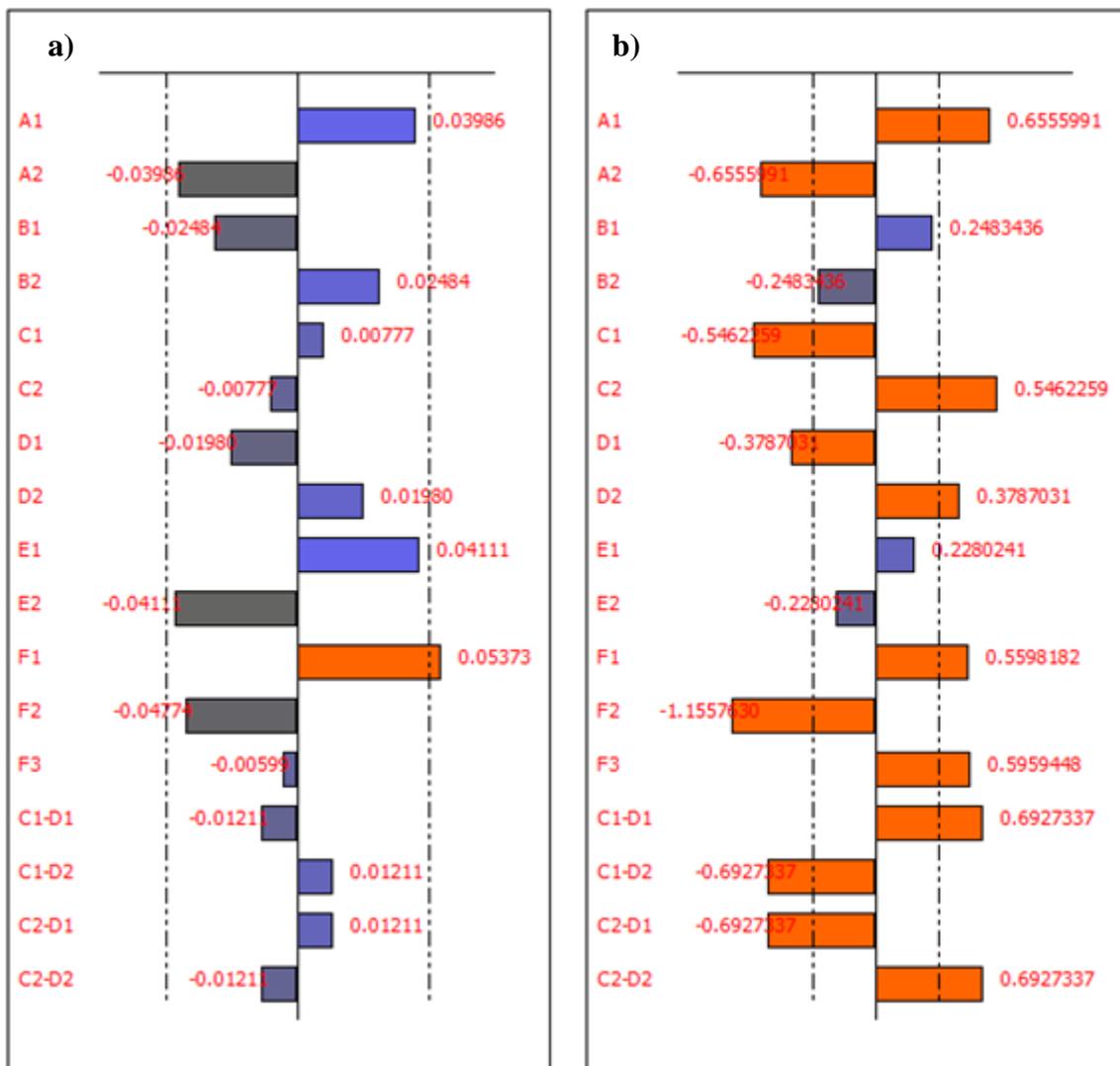


Figura 5.2.1. a) Estudio gráfico de todos los efectos de los factores sobre la respuesta Y1 (acrilamida), b) del $1/Y_2^{0.5}$ (blanco) en el modelo de presencia-ausencia. Los efectos se codifican con dos caracteres, el primero (A, B, C, D, E, F) es el factor y el segundo (1,2,3) el nivel.

Tabla 5.2.3. Condiciones elegidas para maximizar la señal correspondiente a la acrilamida y minimizar la señal del blanco (maximizar el inverso de la raíz cuadrada de Y_2).

Acrilamida (Y_1)	Transformación Box-Cox $1/(Y_2)^{0.5}$	Condiciones óptimas
A1	*A1	A1 (NaClO 0.02 mM)
B2	B1	B2 (NaOH 0.03 M)
C1	*C2	C2 (30 min)
D2	*D2	D2 (85°C)
E1	E1	E1 (pH=7)
*F1	*F1 (o *F3)	*F3 (6 mM)
C1D2 (o C2D1)	C2D2	C2D2

5.3 Calibrado multivariante de la acrilamida

La preparación de los patrones de calibrado se realizó como se ha indicado en el apartado 3.2. y en las condiciones experimentales fijadas al analizar el diseño D-óptimo (ver Tabla 5.2.3)

Para realizar el calibrado se utiliza como señal los loaging muestrales de un modelo PARAFAC. En este caso los modelos PARAFAC se han llevado a cabo con un cubo de datos de dimensión $(8 \times 8 \times 201)$ dónde 8 indica el número de patrones de calibrado, 8 las longitudes de onda de excitación y 201 las longitudes de onda de emisión. El modelo PARAFAC para el calibrado consta de dos factores (un primer factor relacionado con la acrilamida y el otro segundo factor que se asocia al blanco, Figura 5.3.1), su índice CORCONDIA es del 100%.

Se ha identificado el perfil de emisión con el primer factor (en azul en la figura). La correlación del espectro extraído matemáticamente con el modelo PARAFAC para este factor y una muestra de referencia de acrilamida, es 0.981. También se ha identificado el perfil de excitación (en rojo en la figura), en este caso la correlación del perfil extraído en la descomposición PARAFAC y el de la muestra de referencia es de 0.998. Esto permite concluir que los espectros extraídos por el modelo PARAFAC se corresponden con la acrilamida. En la Figura 5.3.2 se muestra la dificultad de esta descomposición ya que el blanco, que no contiene acrilamida, presenta fluorescencia en el mismo rango que la propia acrilamida.

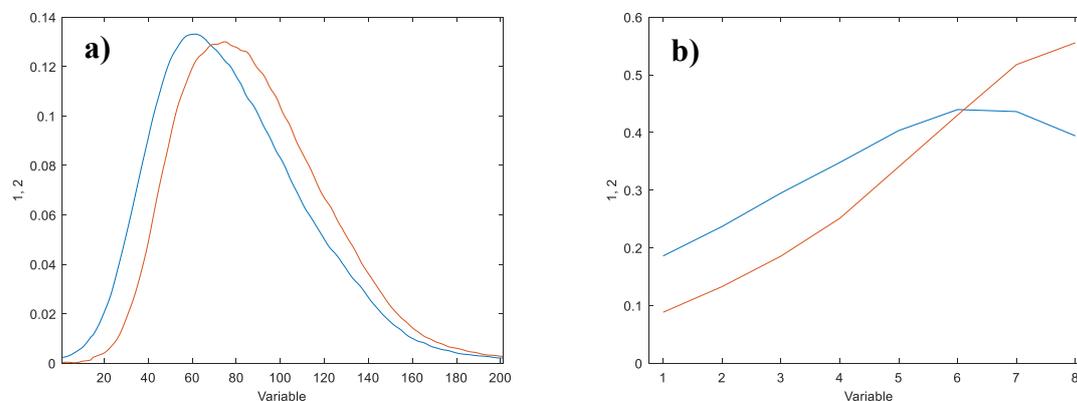


Figura 5.3.1. Loadings del perfil emisión (a) y del perfil de excitación (b) del modelo PARAFAC de dos factores. En azul la acrilamida, en rojo el blanco.

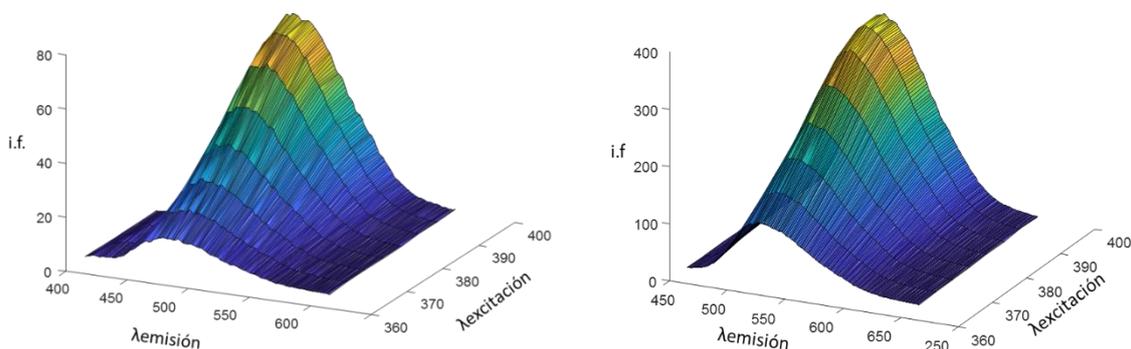


Figura 5.3.2. Matriz de excitación-emisión del blanco (izquierda) y del patrón de calibrado de 80 ppm de acrilamida (derecha).

Con los 8 loadings del perfil muestral se ha realizado una regresión univariante, por mínimos cuadrados, cuyas características se muestran en la tabla 5.3.1 La regresión es significativa (su P-valor <0.05 nos permite rechazar la hipótesis nula H_0). El patrón de calibrado de 20 ppm se ha eliminado por tener un residuo estandarizado superior a 2.5.

Tabla 5.3.1. Regresión ‘loading muestral’ frente ‘concentración real’ de acrilamida

Rango de calibrado	0-80 ppm
Término independiente	30.95
Pendiente	34.23
Coefficiente correlación	0.982
S_{yx}	197.2
Significación de la regresión * (P-valor)	0.0001

s_{yx} : desviación estándar de la regresión

H_0 : La regresión no es significativa; H_a : La regresión es significativa.

En la figura 5.3.3. se muestra la recta de calibrado ajustada.

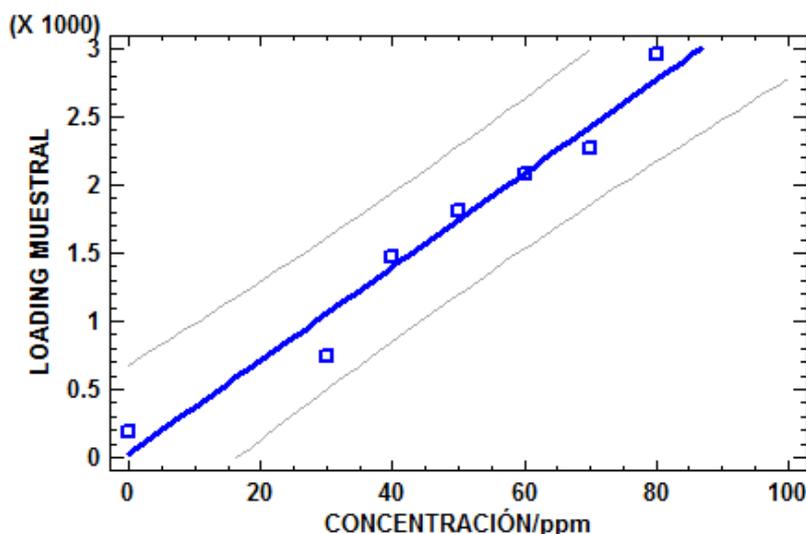


Figura 5.3.3. Recta de calibrado

6. CONCLUSIONES

Se ha puesto a punto un procedimiento para la determinación de acrilamida mediante fluorescencia molecular. Mediante un diseño D-óptimo se ha logrado reducir el esfuerzo experimental de 96 experimentos a 12 (más cuatro réplicas) con el consiguiente ahorro de tiempo y reactivos. Además, se han optimizado las variables experimentales (concentraciones de NaClO, NaOH, tiempo y temperatura de la reacción, pH y concentración de fluorescamina) maximizando la señal de la acrilamida y minimizando la señal del blanco. La propiedad de “segundo orden” que tiene la técnica de descomposición PARAFAC ha permitido identificar inequívocamente el derivado fluorescente de la acrilamida separándolo de los fluoróforos del blanco que emiten en el mismo rango de medida. Finalmente, se ha determinado la cantidad de acrilamida mediante un calibrado univariante utilizando como señal los loadings del modelo PARAFAC.

CONCLUSIONS

A new procedure has been developed for the determination of acrylamide by molecular fluorescence. The use of a D-optimum design has been achieved to reduce the experimental effort from 96 experiments to 12 (plus 4 replicates) with the consequent saved of time and reagents. In addition, several experimental variables have been optimized (concentrations of NaClO, NaOH, time and temperature of the reaction, pH and concentration of fluorescamine), maximizing the signal of acrylamide and minimizing the signal of blank sample. The “second order property” of PARAFAC decomposition technique allowed to unequivocally identifying the fluorescent derivate of acrylamide from the fluorophores of the blank. Both fluorescent signals appear in the same range of wavelengths. Last, the amount of acrylamide was determined by means of a univariate calibration using the sample loadings of the PARAFAC model as a signal.



7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Agencia española de consumo, seguridad alimentaria y nutrición (AECOSAN). F http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/Acrilamida_ficha_JUL17.pdf (consultado el 26 de febrero 2018)
- [2] Autoridad Europea de seguridad alimentaria (EFSA). Acrilamida. Recuperado de <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/acrylamide> (consultado el 26 de febrero 2018)
- [3] Revista chilena de nutrición. Acrilamida en los alimentos. Recuperado de : https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182007000100001 (consultado el 26 de febrero 2018)
- [4] Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. Summary report of the sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Retrieved July 24, 2008, from: http://www.who.int/entity/ipcs/food/jecfa/summaries/summary_report_64_final. (consultado el 26 de febrero 2018)
- [5] Yamazaki, K.; Isagawa, S.; Kibune, N.; Urushiyama, T. A Method for the Determination of Acrylamide in a Broad Variety of Processed Foods by GC–MS Using Xanthidrol Derivatization. *Food Addit. Contam. Part A*. 2012, 29, 705–715.
- [6] Jezussek, M.; Schieberle, P. A New LC/MS-Method for the Quantitation of Acrylamide Based on a Stable Isotope Dilution Assay and Derivatization with 2-Mercaptobenzoic Acid. Comparison with Two GC/MS Methods. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 7866–7871.
- [7] Zhu, Y.; Li, G.; Duan, Y.; Chen, S.; Zhang, C.; Li, Y. Application of the Standard Addition Method for the Determination of Acrylamide in Heat-Processed Starchy Foods by Gas Chromatography with Electron Capture Detector. *Food Chem.* 2008, 109, 899–908.
- [8] Wenzl, T.; Lachenmeier, D.W.; Gokmen, V. Analysis of Heat-Induced Contaminants (Acrylamide, Chloropropanols and Furan) in Carbohydrate-Rich Food. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 389, 119–137.
- [9] Eerola, S.; Hollebekkers, K.; Hallikainen, A.; Peltonen, K. Acrylamide Levels in Finnish Foodstuffs Analysed with Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007, 51, 239–247.
- [10] Delatour, T.; Perisset, A.; Goldmann, T.; Riediker, S.; Stadler, R. H. Improved Sample Preparation to Determine Acrylamide in Difficult Matrixes Such as Chocolate Powder, Cocoa, and Coffee by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 4625–4631.
- [11] Becalski, A.; Lau, B.P.Y.; Lewis, D.; Seaman, S. W. Acrylamide in Foods: Occurrence, Sources, and Modeling. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 802–808.



- [12] Schireberle, P.; Köhler, P.; Granvogl M. New aspects on the formation and analisis of acrylamide, in Mendel Friedman, Don Mottram (Eds), Chem. Saf. Acrilamide Food, Springer, 2005, pp.205–222.
- [13] Congcong, L.; Feng, L.; Dongmei, C., Bin, Q.; Xinhua; T., Huixian K.; Xi, Chen. Fluorescence determination of acrylamide in heat-processed foods. *Talanta* 123 (2014) 95–100.
- [14] Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A. *Principios de análisis instrumental*. 5ª ed. 2000, Madrid: McGraw-Hill.
- [15] Skoog, D.A. *Fundamentos de química analítica*. 8ª ed. 2005, Madrid: Thomson.
- [16] Hernández, L. and González Pérez, C. *Introducción al análisis instrumental*. 1ª ed. Ariel ciencia. 2002, Barcelona: Ariel.
- [17] Mc Murry, John (2004). «Aminas». *Química Orgánica* (sexta edición). Thomson. pp. 909-911.
- [18] Bro, R. PARAFAC. Tutorial and applications, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 38 (1997) 149-171.
- [19] Ortiz, M.C.; Sarabia, L.A.; Sánchez, M.S.; Herrero, A.; Sanllorente, S.; Reguera, C. *Usefulness of PARAFAC for the Quantification, Identification, and Description of Analytical Data*, in: A. Muñoz de la Peña, H.C. Goicoechea, G.M. Escandar, A.C. Olivieri (Eds.), *Fundamentals and Analytical Applications of Multiway Calibration*, Elsevier, 2015, pp. 37-81.
- [20] 2002/657/EC Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Off. J. Eur. Commun.* L221 (2002) 8–36.
- [21] MATLAB version 8.4.0.150421 (R2014b), The Mathworks, Inc., Natick, MA, USA, 2014.
- [22] Wise, B.M.; Gallagher, N.B.; Bro, R.; Shaver, J.M.; Windig, W.; Koch R.S. PLS Toolbox 7.9.5, Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA, USA, 2015.
- [23] Mathieu, D.; Nony, J.; Phan-Tan-Luu, R. (2015). NEMRODW, Ver. 2015, L.P.R.A.I. Marsella, Francia.
- [24] Lewis, G. A.; Mathieu, D.; Phan-Tan-Luu, R. *Pharmaceutical Experimental Design*, Marcel Dekker, New York, 1999.
- [25] STATGRAPHICS Centurion, ver.17.1.12. Statpoint Technologies, INC.