

MEMORIA TRABAJO FIN DE GRADO



UNIVERSIDAD DE BURGOS

***DETERMINACIÓN DE ACRILAMIDA MEDIANTE
ESPECTROFOTOMETRÍA DE INFRARROJO CON
TRANSFORMADA DE FOURIER Y TÉCNICAS DE
MODELADO MULTIVARIANTE***

Grado en Química

Curso 2017-2018

Autora: Laura Vaquero Fernández

Tutoras: Dña. Silvia Sanllorente Méndez

Dña. 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. Maria de la Cruz Ortiz Fernández y Dña. Silvia Sanllorente Méndez informan de que el alumna Dña. Laura Vaquero Fernández, ha realizado el trabajo "Determinación de acrilamida mediante espectrofotometría de infrarrojo con transformada de Fourier y técnicas de modelado multivariante" 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 7 de junio de 2018

Fdo.: María de la Cruz Ortiz

Fdo.: Silvia Sanllorente

ARCHIVO DE LAS MEMORIA DEL TRABAJO FIN DE GRADO EN RIUBU

Dña. Laura Vaquero y Dña. Maria de la Cruz Ortiz y Dña. Silvia Sanllorente, 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 7 de junio de 2018

Fdo.: Laura Vaquero

Fdo.: María de la Cruz Ortiz

Fdo.: Silvia Sanllorente

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Abstract	1
3. Objetivos.....	2
4. Introducción.....	2
5. Fundamento teórico	4
5.1. ATR-FTIR.....	4
5.2. Modelos de regresión lineal múltiple	6
5.2.1. Correlación y colinealidad.....	7
5.3. Modelo de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS).....	7
5.3.1. PLS-CM.....	8
6. Procedimiento experimental	9
6.1. Reactivos, instrumentación y software.....	9
6.2. Preparación de muestras	10
6.2.1. Muestras patrón	10
6.2.2. Muestras puré calentado	10
6.3. Medidas experimentales.....	10
7. Resultados y discusión	10
7.1. Espectros ATR-FTIR	10
7.2. Modelo PLS-CM para muestras patrón.....	12
7.3. Calibrado con muestras patrón en puré.....	15
7.4. Calibrado con muestras de puré calentado	17
7.5. Muestras calentadas a distintas temperaturas	18
8. Conclusions.....	21
9. Bibliografía	21



1. RESUMEN

En esta memoria se describe un método no destructivo para la determinación de acrilamida de forma rápida y barata. La necesidad de medir la acrilamida radica en que ésta es una sustancia reconocida como 'probable carcinógena' en humanos según la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC).

En este trabajo se ha medido acrilamida por espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier en el modo de reflexión total atenuada (ATR-FTIR). Para el tratamiento estadístico de los datos se utiliza un modelo de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS).

En primer lugar, se propone la realización de una técnica de modelado de clases (PLS-CM) que permite diferenciar muestras sin y con acrilamida añadida y evaluar la probabilidad de dar falsas no conformidades y falsas conformidades.

Además, se han realizan dos modelos de calibrado añadiendo cantidades crecientes de acrilamida a muestras de puré de patata. Uno de los calibrados sin calentar las muestras y otro calentando las muestras durante 30 min a 150 °C. En ambos casos se ha conseguido una buena correlación de las señales (espectros) con la concentración de acrilamida añadida.

Por último, se ha construido un modelo PLS para evaluar la influencia de la temperatura de calentamiento en la formación de acrilamida. Observándose un aumento en la cantidad de acrilamida al incrementar la temperatura.

2. ABSTRACT

In this report, a non-destructive, quick and inexpensive method for the determination of acrylamide is described. The need to measure acrylamide is due to it being a substance recognised as 'probable carcinogen' in humans, according to the International Agency for Research on Cancer (IARC).

In this investigation, acrylamide was measured by attenuated total reflectante Fourier-transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR). For the statistical treatment of the data, partial least squares regression (PLS) model is used.

Firstly, we propose the use of a class modelling technique (PLS-CM), which allows the differentiation of samples without and with added acrylamide and to evaluate the probability of giving false non-compliances and false compliances.

In addition, two calibration models have been performed by adding increasing amounts of acrylamide over samples of mashed potatoes. One of the model without heating the samples and another one heating the samples for 30 min at 150 °C. In both cases a good correlation between spectra and the amount acrylamide added, has been achieved.

Finally, a PLS model has been built to evaluate the influence of the heating temperature on the formation of acrylamide, observing an increase in the amount of acrylamide when increasing the temperature.

3. OBJETIVOS

Los objetivos planteados en la realización de este trabajo fueron los siguientes:

1. Realizar calibrados multivariantes con datos procedentes de espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier en el modo de reflexión total atenuada (ATR-FTIR).
2. Construir modelos de clases, evaluando las probabilidades de falsa no conformidad o falsa conformidad al analizar el contenido de acrilamida en una muestra de puré sin y con acrilamida añadida.
3. Describir el comportamiento, mediante técnicas multivariantes y datos de espectroscopía de infrarrojo, de varias muestras de puré que han sido calentadas a distintas temperaturas.
4. 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.

4. INTRODUCCIÓN

La acrilamida es un compuesto de naturaleza orgánica tipo amida, que se produce de forma natural en el cocinado de algunos alimentos ricos en almidón a elevadas temperaturas [1,2].

Los alimentos en los que está presente la acrilamida de manera notable son tanto alimentos precocinados y vendidos listos para su consumo, como cocinados en casa o restaurantes. Los más destacados son los cafés, las patatas fritas y chips, galletas o pasteles y los preparados para niños a base de cereales además de los sucedáneos de los anteriormente expuestos [3].

La reacción del aminoácido asparagina con azúcares reductores como la glucosa y la fructosa a elevadas temperaturas y baja humedad produce acrilamida mediante la reacción de Maillard (Figura 1). Esta reacción química es la causante del color más oscuro y el sabor de los alimentos fritos [2].

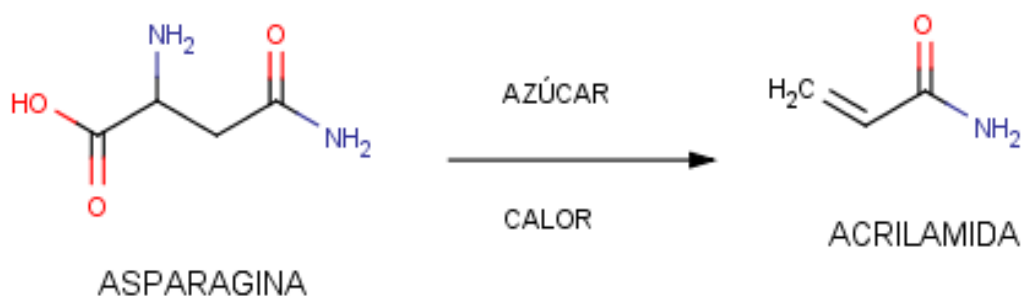


Figura 1. Reacción de Maillard. Formación de acrilamida.



Desde 1991, la acrilamida está declarada como carcinógeno genotóxico, siendo después clasificada como 'probablemente carcinógeno' para los humanos (grupo 2A) por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC). En el año 2002, un estudio de la Universidad de Estocolmo (Suecia) encontró que la formación de acrilamida era espontánea cuando diversos alimentos son sometidos a elevadas temperaturas. Después, se comenzó con un análisis exhaustivo de los efectos de la acrilamida en animales para poder extrapolar y conocer los aspectos toxicológicos en seres humanos.

A pesar de que todavía no exista un estudio concluyente del efecto de la acrilamida en humanos, desde la Comisión Europea se han marcado unas recomendaciones para el cocinado de ciertos alimentos y se han establecido unos límites máximos de cantidad de acrilamida en ellos. La preocupación es tal que, tanto por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) como por la Food Standards Agency (FSA), se trata como un problema de seguridad alimentaria [2-4].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) advierten que la cantidad de acrilamida en alimentos consumidos es de "gran preocupación" y por ello llevan a cabo diversos estudios de determinación y control de dicha sustancia. Así, se intenta conocer el mecanismo de toxicidad de la acrilamida y el riesgo real de consumirla [5-6].

Las aplicaciones de la acrilamida son variadas, tanto en procesos industriales (producción de tintes, plásticos o papeles como aglutinante) como en la purificación de aguas potables o residuales, usado como floculante. También se utiliza en productos de consumo como selladores, envases de alimentos o algunos adhesivos y está presente en el humo del tabaco [1].

El 11 de abril de 2018 entró en vigor el REGLAMENTO 2017/2158 [3] por el que se establecen medidas de mitigación y niveles de referencia para reducir la presencia de acrilamida en los alimentos. A partir de esta fecha es obligatorio que los operadores económicos, tanto las industrias como los sectores del catering, hostelería y restauración colectiva, apliquen las medidas para mitigar la formación de acrilamida y realicen un plan de muestreo. Los niveles de referencia para detectar la presencia de acrilamida en los productos alimenticios figuran especificados en el anexo IV de este Reglamento y están en el rango de los 50-4000 mg Kg⁻¹ dependiendo del producto.

Los métodos espectroscópicos, en concreto los basados en espectroscopía de infrarrojo, suelen ser rápidos y baratos, exigiendo poco o nada preparación de la muestra. La única desventaja notable es la baja sensibilidad de los mismos.

Últimamente se utiliza la espectroscopía de infrarrojo en multitud de problemas para realizar calibrados indirectos, es decir, para relacionar el espectro que proporciona esta técnica con una medida de la concentración del analito que se está cuantificando y que se obtiene por otro método de referencia que, en general, es más sensible pero también más costoso. De este modo, se tienen modelos matemáticos altamente predictivos, que en la mayoría de los casos evitan procedimientos complicados de preparación de las muestras antes su análisis.

Son muchos los ejemplos que aparecen en las referencias bibliográficas analizadas, donde se utiliza este tipo de calibrados con datos espectroscópicos [7]. En todos estos trabajos se utilizan datos procedentes del infrarrojo (IR) ya sea en la región del infrarrojo medio (MIR) o en el infrarrojo próximo (NIR).



Todos estos trabajos necesitan utilizar potentes técnicas quimiométricas basadas en variables latentes. En general, las más utilizadas son técnicas de regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS, por sus siglas en inglés).

Como señal se registra absorbancia, transflectancia, o transmitancia según la técnica utilizada y el tipo de muestra analizada (sólida o líquida). En la referencia [8] se utiliza una técnica de transmitancia en el infrarrojo próximo (NIT) para determinar el porcentaje en peso de materia seca, proteína y grasa de un queso Zamorano de Denominación de Origen.

En la referencia [9] se han utilizado datos procedentes de espectroscopía MIR (por transflectancia) para determinar varias variables enológicas rutinarias que se miden en vino. En la referencia [10] se utiliza espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) y se propone un modelo basado en un PLS con respuesta binaria (PLS-CM) para determinar siete propiedades sensoriales del jamón curado. En dicho trabajo, los autores utilizan 117 muestras de jamón curado que han sido clasificadas como válidas y no válidas, respecto a siete características sensoriales, evaluadas por jueces expertos. El PLS-CM proporciona modelos para cada categoría y evalúa las probabilidades de cometer falsas no conformidades y falsas conformidades.

En [11], los autores utilizan un modelado mediante PLS-CM como procedimiento rápido y simple de cribado para detectar seis sulfamidas en leche. En este caso, los datos proceden de una técnica de fluorescencia molecular de excitación-emisión con medidas hechas en modo fluorescencia frontal.

Este TFG es una prueba piloto para decidir si es posible utilizar datos procedentes de espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (ATR-FTIR) con fines cualitativos y cuantitativos utilizando como técnica de regresión una regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) y otra de modelado (PLS-CM).

En el análisis cualitativo, se utiliza esta técnica para modelar o distinguir entre muestras que contengan o no una cantidad de acrilamida. También se estudiará el efecto de la temperatura para ver de forma cualitativa si se incrementa o no su concentración con el aumento de ésta.

En cuanto al análisis cuantitativo, se pretende realizar un calibrado con cantidades de acrilamida conocidas y así poder determinar la concentración de una muestra problema con la recta de predicción a un nivel de significación estadístico predeterminado.

5. FUNDAMENTO TEÓRICO

5.1. ATR-FTIR

La región del espectro electromagnético correspondiente al infrarrojo abarca la radiación con números de onda comprendidos entre 12800 y 10 cm^{-1} . Dentro de este rango se diferencian tres regiones, para trabajar en cada una de ellas, se necesita distinta instrumentación y tienen diferentes aplicaciones. Las zonas son denominadas infrarrojo próximo (NIR), medio (MIR) y lejano (FIR). La región más utilizada tanto para análisis cualitativos como cuantitativos es la región del infrarrojo medio (MIR) que se extiende entre aproximadamente 670-4000 cm^{-1} [12, 13].



La aparición en los últimos años de espectrómetros de transformada de Fourier relativamente baratos ha incrementado de forma notable el campo de aplicación de esta técnica. Ya que el funcionamiento de estos equipos presenta como principal ventaja un incremento considerable en la relación señal/ruido puesto que permiten obtener el espectro como un promedio de varios barridos, además, proporcionan mayor rapidez y una alta resolución espectral.

La espectrometría de absorción y reflexión en el infrarrojo medio es la principal herramienta para la determinación estructural de especies orgánicas y bioquímicas. La espectroscopía de reflexión en el infrarrojo se utiliza fundamentalmente en el caso de muestras sólidas difíciles de manipular como películas de polímeros, fibras, alimentos, productos agrícolas y muchos otros.

La reflexión de la radiación es de cuatro tipos: reflexión especular, reflexión difusa, reflexión interna y reflexión total atenuada. En la reflexión total atenuada (ATR), cuando un haz de radiación pasa de un medio más denso a otro menos denso, se produce la reflexión. El haz infrarrojo se dirige hacia un cristal de elevado índice de refracción (diamante, seleniuro de cinc,..) incidiendo con un ángulo determinado, en este momento se produce una onda evanescente que sobresale y llega a la muestra que está en contacto con el cristal. La muestra atenúa la señal cuando está en la región del espectro en la que absorbe la energía.

La onda atenuada vuelve a un cristal opuesto que la dirige al detector, en el cual se registra como una señal del interferograma, y se genera a continuación un espectro de infrarrojos [14, 15]. En la figura 2 se muestran los esquemas de: el recorrido de la radiación dentro del instrumento y del módulo de ATR para un impacto o cinco impactos.

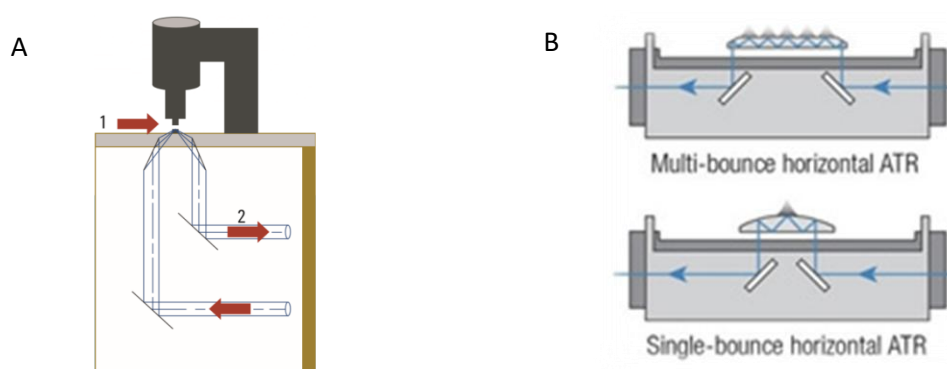


Figura 2. A. Posición de la muestra. B. Esquema de funcionamiento del módulo ATR para un impacto (single bounce) y cinco impactos (multi-bounce) [8].

La medida es de buena calidad cuando la muestra está en contacto directo con el cristal ATR y el índice de refracción del cristal es significativamente mayor que el de la muestra. Las muestras que se pueden medir con este equipo pueden ser líquidas o sólidas y pueden tener distintas características [14].

Los espectros de ATR son similares, pero no idénticos, a los espectros de absorbancia ordinarios. En general, se observan los mismos picos pero sus intensidades relativas son distintas.



ATR presenta una serie de ventajas frente a otras técnicas de análisis más convencionales. Requiere poco o ningún tratamiento de la muestra, es fácilmente adaptable al estudio de fibras, hilos, tejidos, pastas, polvos o suspensiones, comprimiendo la muestra sobre el cristal. También se pueden analizar disoluciones acuosas líquidas siempre que el cristal sea insoluble en agua. Además, los ensayos no son destructivos con la muestra y proporciona información tanto cualitativa como cuantitativa de varios compuestos simultáneamente de forma rápida y económica.

5.2. MODELOS DE REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE

Una regresión tiene como objetivo predecir una variable respuesta (en este caso la cantidad de acrilamida) a partir de un conjunto de variables predictoras (en este trabajo los espectros de infrarrojo). Manejar el espectro completo implica tener que aplicar una técnica de regresión múltiple.

Un modelo de regresión lineal múltiple relaciona una respuesta, y , con K variables físico-químicas, x_k . Este modelo puede generalizarse como la ecuación 1:

$$y = b_0 + \sum_{k=1}^K b_k x_k + e \quad (1)$$

donde y se corresponde, en este trabajo, con la concentración de acrilamida, x_k son las variables predictoras (absorbancias registradas a 1798 números de onda en el espectro de infrarrojo) y e es el error del modelo. En notación matricial el modelo se puede expresar como en la ecuación 2:

$$y = \mathbf{bX} + e \quad (2)$$

donde \mathbf{b} es el vector de los coeficientes de regresión y \mathbf{X} , la matriz de las variables predictoras, donde cada fila se corresponde con una muestra y cada columna con una variable.

La regresión lineal múltiple puede llevarse a cabo mediante la generalización de la regresión lineal por mínimos cuadrados a múltiples variables. Esta regresión suele denominarse regresión lineal múltiple (MLR) o regresión ordinaria por mínimos cuadrados (OLS) y garantiza la estimación de los parámetros de regresión (b_i) más precisos entre los exactos. El principal problema de esta regresión es que se vuelve inestable cuando existe un alto grado de correlación entre las variables predictoras y/o cuando hay colinealidad entre ellas [16]. Esta situación es común en medidas instrumentales procedentes de espectroscopía, donde las variables predictoras suelen estar muy correlacionadas causando una situación de casi-multicolinealidad. Otro problema de esta regresión es el tamaño muestral, no puede haber más variables que muestras medidas [16-17].



5.2.1. Correlación y colinealidad

El grado de relación lineal entre dos variables se mide habitualmente mediante el coeficiente de correlación lineal (ρ). El test de hipótesis que permite medir la correlación lineal entre dos variables tiene de hipótesis nula: $H_0: \rho = 0$ frente a la alternativa: $H_a: \rho \neq 0$. Todos aquellos 'P-valores' menores de 0.05 indican que se ha de rechazar la hipótesis nula, es decir, el par de variables que se está analizando están correlacionadas al nivel de significación del 5%.

Sin embargo, es posible que grupos de variables con poca correlación dos a dos sean colineales, es decir, presenten combinaciones lineales entre ellas, lo que significa que las muestras realmente no están distribuidas en las 1798 dimensiones del espacio de todas las variables, sino en un subespacio "físico-químico" de menor dimensión. Un índice para medir la colinealidad es el cociente entre el autovalor mayor y el menor obtenidos al hacer la componentes principales con la matriz de los datos autoescalados. Si este cociente es mayor que 10 puede afirmarse que hay colinealidad en las variables [17].

5.3. MODELO DE REGRESIÓN POR MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLS)

Como alternativa a los modelos de regresión multivariantes, existe otro tipo de modelos de regresión basado en la construcción de variables latentes (o componentes principales) denominados modelos blandos (*soft-modeling*) que deben ser utilizados en los siguientes casos: i) exista un gran número de variables predictoras, siendo el número de variables mayor que el de muestras; ii) exista gran correlación entre las variables predictoras; iii) exista colinealidad (haya menos dimensiones reales que las variables químicas registradas) o iv) si se desea que los modelos tengan buena capacidad de predicción.

Las técnicas de regresión blanda más habituales son los modelos de regresión sobre componentes principales (PCReg) y los denominados modelos por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) [17]. En el trabajo de esta memoria se ha utilizado esta última regresión blanda.

PLS es una técnica de regresión [18, 19] que combina algunas características de la regresión en componentes principales (PCReg) y otras de la regresión lineal por mínimos cuadrados (OLS). La regresión PLS consiste en la extracción, a partir de las variables predictoras, de un conjunto de factores que se denominan variables latentes (VL). La complejidad de los modelos PLS, es decir, el número total de variables latentes que es necesario tomar en cada modelo, se determina a través de técnicas de validación cruzada ('cross-validation'). En concreto se ha utilizado la técnica de 'uno a la vez' ('leave one out').

Específicamente, la regresión PLS busca un conjunto de VL a través de una descomposición simultánea de X e Y con una restricción consistente en que estas VL deben explicar lo máximo posible la varianza entre X siempre que esta esté correlacionada con la respuesta Y.

El criterio matemático puede escribirse como en la ecuación 3:

$$\max [\text{corr}^2(\mathbf{Y}, \mathbf{Xb}) \times \text{var}(\mathbf{Xb})] \quad (3)$$



En este trabajo la matriz de las variables predictoras es de tamaño ($N \times 1798$) siendo N el número de muestras (variables en cada caso de estudio) y 1798 el número de absorbancias medidas en el espectro obtenido en la zona del infrarrojo (entre 650 y 4000 cm^{-1}). La respuesta Y , será la concentración de la acrilamida cuando se realizan los modelos de calibrado y 1 ó 2 en los casos que se utilice el modelado por mínimos cuadrados parciales (PLS-CM).

Un aspecto muy importante en el caso de tener datos procedentes de espectros de infrarrojo, es el preprocesado al que hay someter a estos datos antes de realizar los modelos PLS. Las señales en estos espectros tienen mucho ruido, dependen mucho de la composición de la muestra (y de su aspecto), y los espectros pueden sufrir desplazamientos tanto verticales como horizontales.

Existen muchos modos de preprocesar los datos [19]. En este trabajo se ha realizado un preprocesado que consta de dos etapas: a) SNV (Standard Normal Variate) que consiste en restar la media por filas de la matriz de datos y dividir por la desviación típica de cada fila, b) Filtrado y suavizado de datos mediante un filtrado Savitzky Golay utilizando un polinomio de grado dos, la segunda derivada y tomando como tamaño de ventana 25 puntos. Además, después de esto se autoescalan los datos tanto de las predictoras como de la respuesta.

Una vez realizado el modelo, se tienen que identificar, estudiar y descartar los datos anómalos. En este tipo de regresión, una de las medidas que denotan la anomalía es un valor del residuo estandarizado superior a 2.5 (en valor absoluto) en los valores predichos de la respuesta; otra es el valor de los índices T^2 y Q . Si estos dos índices superan un valor crítico para un nivel de significación (1% o 5%) el dato será considerado anómalo. El valor de T^2 indica la distancia de cada medida al centroide dentro del mismo hiper-plano y el valor de Q indica el residuo ortogonal de cada medida al espacio (hiper-plano) de las variables latentes elegidas en el modelo.

5.3.1. PLS-CM

El modelado mediante la técnica PLS (PLS-CM) [20] consiste en el uso de PLS del mismo modo que en el apartado anterior pero utilizando como respuesta Y una variable binaria (se asigna 1 para las muestras sin acrilamida y 2 para aquellas muestras que contienen acrilamida). Después de realizado el modelo en ajuste, se construyen las funciones de densidad, con los valores medios y sus desviaciones típicas, obtenidos para las muestras codificadas como '1' y como '2'. Se construye el test de hipótesis con su región crítica o de rechazo. Finalmente se aplicará este modelo para evaluar la capacidad de predecir la categoría a la que pertenece una muestra problema conociendo los valores de las variables predictoras X (en nuestro caso los espectros).

En el trabajo se evalúa mediante esta técnica la posibilidad de diferenciar una muestra que no contiene acrilamida de otra que si lo tiene. Como en todo test de hipótesis se calcula la significación estadística de la decisión tomada, es decir, se calculará el riesgo que hay de confundirse al asignar una muestra a una u otra categoría.



El test de hipótesis que se va a aplicar se muestra esquemáticamente en la figura 3. Los resultados obtenidos después de la aplicación del test permiten evaluar la probabilidad de error α y β (errores de tipo I y II del test). Donde α es la probabilidad de dar una falsa no conformidad y β se corresponde con la probabilidad de dar una falsa conformidad. Una revisión de estos temas para métodos analíticos multivariantes cualitativos puede verse en [20-21].

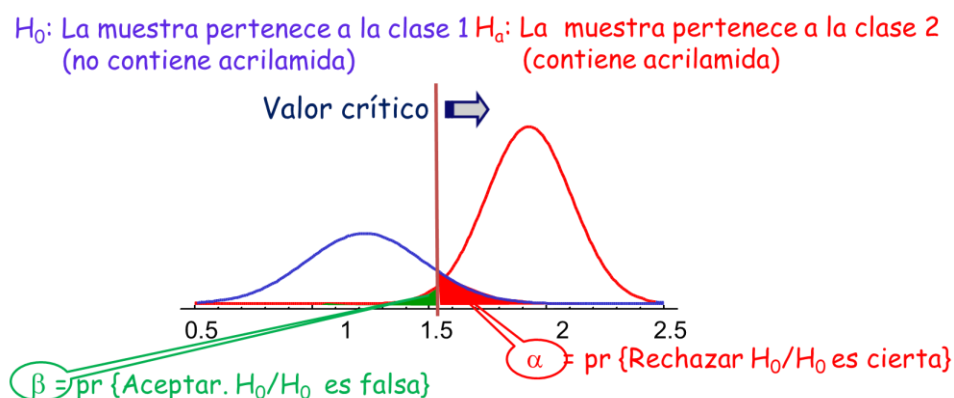


Figura 3. Test de hipótesis para aplicar a las respuestas predichas con el modelo PLS.

6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

6.1. REACTIVOS, INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE

Para la preparación de las disoluciones para el "spiked" se utilizó acrilamida (Merck; nº CAS 78-06-1) y preparado de puré de patata natural "Maggi".

El análisis espectrofotométrico se ha realizado con el espectrofotómetro Cary 630 FTIR de Agilent, con la aplicación MicroLab dentro de su paquete de programas. Usando el módulo de un impacto con cristal de diamante. Se muestra en la figura 4.



Figura 4. Equipo utilizado en el trabajo. Cary 630 FTIR. Agilent.

Los modelos PLS se han realizado con el PLS Toolbox [22] para MATLAB (versión 8.4.0) [23]. El resto de análisis estadísticos (funciones de distribución, rectas de veracidad y test de hipótesis) se han hecho con STATGRAPHICS Centurion XVII [24].



6.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

6.2.1. Muestras patrón

Se prepararon 6 muestras patrón de 10 g de polvo de puré de patata "Maggi" añadiendo 25 mL de distintas disoluciones de acrilamida para obtener una concentración en el puré final de: 733, 1513, 2166.3, 2913.7, 5718.3 ppm, pesando para ello distintas cantidades de ella.

6.2.2. Muestras puré calentado

Para preparar las muestras de puré, se pesan 6 porciones de 10 g cada una de polvo de puré de patata "Maggi" triturado. Se le añaden distintas disoluciones de acrilamida para obtener una concentración en el puré final de: 733, 1513, 2166.3, 2913.7, 5718.3 ppm.

A continuación, se calientan enteras o porciones de éstas a distintas temperaturas, dependiendo del experimento realizado. En el caso de la realización del calibrado se calienta a 150 °C durante media hora toda la muestra, mientras que para el análisis cualitativo se calientan porciones a las temperaturas de 150 °C, 175 °C y 200 °C.

6.3. MEDIDAS EXPERIMENTALES

En todos los casos, se registra el espectro de absorción molecular de la muestra como promedio de 32 barridos. Tomando 1798 medidas cada 1.86 cm^{-1} entre los valores de 650 y 4000 cm^{-1} . Utilizando en todas ellas una ganancia de 225 para el cristal de diamante. Se ha recogido también el espectro de la acrilamida pura, en estas mismas condiciones mostrado en la figura 5.

Para los calibrados, el número de réplicas de cada nivel de concentración es de 25 (en total 150 muestras), mientras que para el análisis cualitativo para observar la influencia de la temperatura sobre la concentración de acrilamida añadida al puré, únicamente se realizan 5 réplicas de cada una. En el caso del modelado PLS-CM se disponen de 25 muestras sin acrilamida y otras 25 con contenidos de acrilamida.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. ESPECTROS ATR-FTIR

Para estudiar la viabilidad de este trabajo, en primer lugar se realiza un análisis previo consistente en caracterizar las bandas obtenidas a partir de una muestra pura de acrilamida con el fin de identificarlas cuando se lleva a cabo la determinación en una muestra alimentaria, en este caso puré de patata.



En el espectro de la acrilamida pura (Figura 5) pueden verse las bandas características de la acrilamida que se sitúan en torno a 3150 cm^{-1} para la tensión de los enlaces N-H, en la zona de 1650 cm^{-1} la tensión de los dobles enlaces C=C y C=O; y en la región más baja de los números de onda $1250\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ para la flexión de los enlaces C-H.

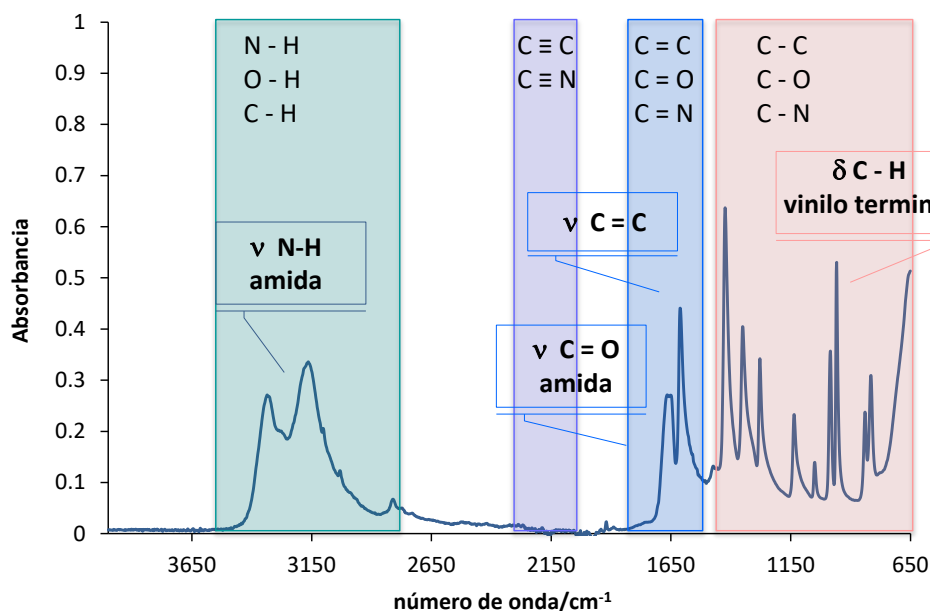


Figura 5. Espectro ATR-FTIR de acrilamida pura con sus bandas más características.

En la Figura 6 se muestran los espectros ATR-FTIR para una muestra de puré sin y con acrilamida añadida. Como puede verse, las bandas características de la acrilamida aparecen enmascaradas por el resto de los compuestos existentes en la muestra. Sin embargo, sí que se observa un incremento de la señal en las zonas en las que aparecen dichas bandas. Sobre todo es evidente el crecimiento en la zona en torno a los 3300 cm^{-1} (correspondiente a las bandas de tensión N-H) aunque también es la región correspondiente a la presencia de agua en las muestras. También se produce un incremento en la región correspondiente a los dobles enlaces C=C y C=O.

A la vista de estos cambios en los espectros, el primer análisis que se plantea en este trabajo es la posibilidad de diferenciar entre muestras de puré de patata sin y con acrilamida utilizando la técnica de modelado PLS-CM.

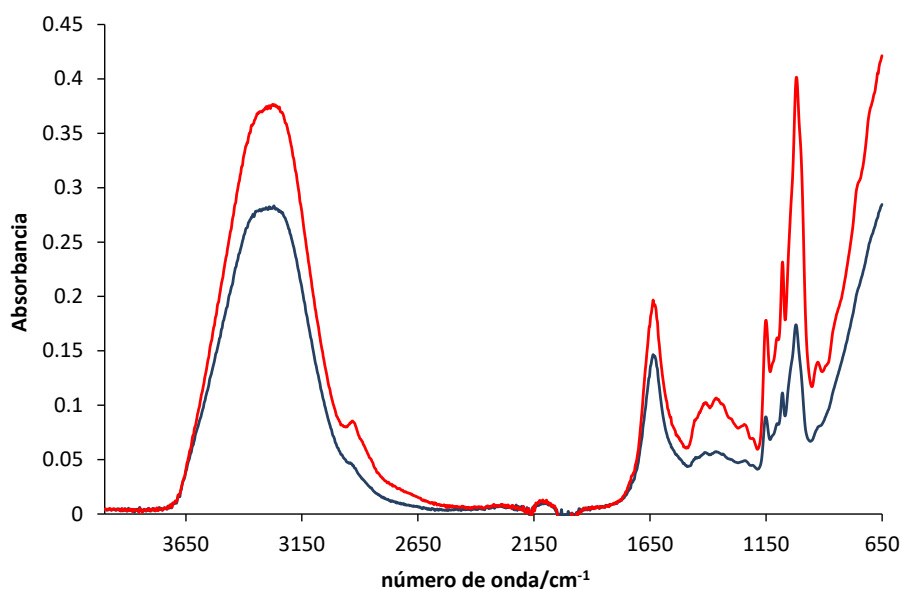


Figura 6. Espectro ATR-FTIR de una muestra de puré (azul) y otra de puré con acrilamida (rojo).

7.2. MODELO PLS-CM PARA MUESTRAS PATRÓN

Para construir los modelos PLS, se ha tomado el número de variables latentes que minimizaba la raíz cuadrada de la media de los errores en validación cruzada RMSECV (Root Mean Square Error in Cross-Validation). El número de variables latentes obtenidas es diferente en cada caso, así como la varianza explicada de predictoras y respuesta. En todos los casos se ha intentado que los modelos sean predictivos, esto se consigue cuando la varianza en ajuste (con los datos actuales) es similar a la varianza en predicción. Los pasos seguidos para realizar los modelos PLS han sido:

- i. Preprocesado de datos espectrales (SNV + filtrado y suavizado con 2ª derivada y 25 puntos de ventana).
- ii. Autoescalar las variables predictoras y respuesta.
- iii. Elegir el número de variables latentes mediante RMSECV, utilizando como técnica de validación cruzada 'uno a la vez'.
- iv. Eliminar las muestras con residuo estandarizado mayor que 2.5 en valor absoluto.
- v. Eliminar muestras anómalas en el espacio de las variables predictoras: muestras con valores de Q y T² mayores que el valor umbral elegido.
- vi. Repetir los pasos iv. y v. hasta que no haya datos anómalos.



Para realizar los modelos PLS-CM, se codificó la respuesta con un '1' si la muestra no contenía acrilamida y con un '2' para las muestras que se les había añadido una cantidad de acrilamida. Para obtener el modelado de las clases se realiza un test de hipótesis con las distribuciones obtenidas para las respuestas '1' y '2' ajustadas por el modelo. Se comprobó que estas funciones de densidad para cada clase, eran compatibles con una distribución normal y finalmente se evaluó la probabilidad α y β , del test de hipótesis, de acuerdo a lo mostrado en la Figura 3.

En primer lugar, se discutió la posibilidad de comprobar si las muestras de puré que no tienen acrilamida añadida se pueden distinguir de aquellas que sí tienen. En la tabla 1, se resumen los valores de los modelos PLS-CM obtenidos para dos de los experimentos realizados. No se muestran otros modelos con cantidades superiores de acrilamida añadida porque al realizar los análisis, la separación de las clases era total tanto en ajuste como en predicción. Puede observarse que en ambos modelos, muy poca varianza de las variables X (espectros) explica mucha varianza de la respuesta Y, que es lo normal y esperado cuando se trabaja con una matriz con gran número de variables (1798).

Tabla 1. Modelos PLS-CM para distinguir muestras sin acrilamida frente a muestras que contienen 733 o 2167 ppm respectivamente.

	Modelos PLS-CM				
	VL	Varianza explicada		R ² cal	R ² pred
		X (%)	Y (%)		
Exp. 1 733 ppm	3	28.65	96.13	0.911	0.845
Exp. 2 2167 ppm	4	35.4	99.30	0.993	0.813

Las características de los valores predichos con estos dos modelos para las respuestas, figuran en la tabla 2. Además, se recoge el valor medio de las respuestas tanto en ajuste como en predicción para los dos experimentos. Los valores medios para la clase 1 en ambos experimentos deberán ser próximos a '1' mientras que para la clase 2 serán próximos a '2'.



Tabla 2. Respuestas ajustadas para los modelos PLS-CM contenidos en la tabla 1.

	Y predicha (experimento 1)				Y predicha (experimento 2)			
	Ajuste		Predicción		Ajuste		Predicción	
	Clase 1	Clase 2	Clase 1	Clase 2	Clase 1	Clase 2	Clase 1	Clase 2
Nº. muestras	25	25	25	25	25	25	25	24
Media	1.02	1.99	1.11	1.86	1.00	1.99	1.21	1.82
Desv. típica	0.10	0.09	0.18	0.15	0.04	0.045	0.147	0.157
CV%	9.9	4.8	16.17	8.15	4.4	2.24	11.9	8.62
Mínimo	0.82	1.80	0.71	1.60	0.9	1.91	0.93	1.53
Máximo	1.30	2.15	1.58	2.17	1.07	2.12	1.45	2.19

Puede observarse, como era de esperar, que las respuestas para la clase 1 (muestras sin acrilamida) tienen en ambos experimentos como media un valor próximo a '1' mientras que para la clase 2 (con acrilamida añadida) es próxima a '2' en ambos casos. Los modelos son predictivos, ya que los valores de varianza explicada en ajuste y en predicción son muy similares. Además, se observa como en todos los modelos PLS realizados, muy poca varianza de las predictoras (espectros) explica mucha varianza de la respuesta Y (acrilamida).

En la figura 7, se muestra un gráfico de las funciones de densidad ajustadas para el caso del experimento 1 (concentración 733 ppm). Los valores de las probabilidades de error α y β en ajuste son muy bajos (menores de 10^{-7}) para un valor crítico de 1.530; mientras que en predicción, el valor de estos errores es del 0.01 (1%), para un valor crítico igual a 1.528. Esta regla de decisión consistiría en medir una muestra problema y al predecirla con el modelo ya construido del experimento 1 si el valor de la Y-predicha es mayor o igual a 1.530 se concluiría que esa muestra tiene acrilamida al menos en una cantidad de 733 ppm.

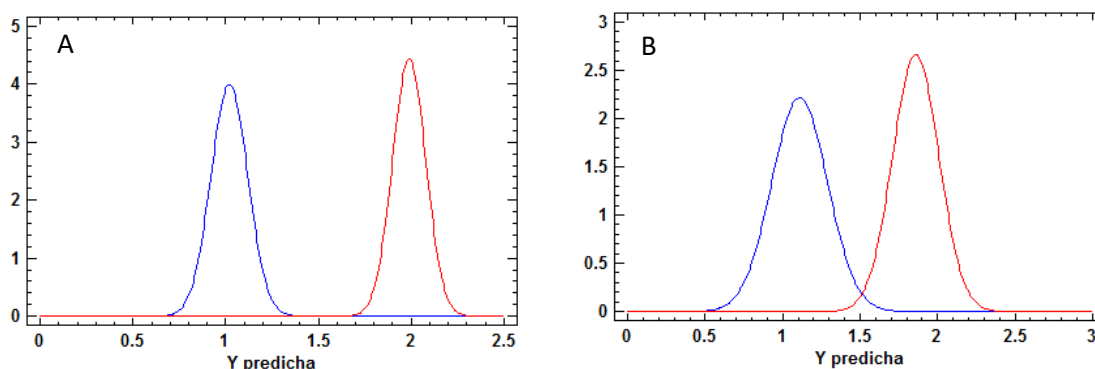


Figura 7. A. Funciones de densidad del experimento 1 en ajuste. B. Funciones de densidad del experimento 1 en predicción. En azul la función de densidad para las muestras sin acrilamida, en rojo para muestras con acrilamida (733 ppm).



La figura 8 muestran las funciones de densidad ajustadas con los datos del experimento 2. En el caso A (datos en ajuste) para un valor crítico de 1.380, las probabilidades de error α y β son menores de 0.003 (3‰). En el caso de calcular estos errores con los resultados de los modelos en predicción los errores son 0.02 (2%). En todos los casos estudiados se ha hallado el valor crítico que iguala ambos errores para que el riesgo de falsas no conformidades (α) y falsas conformidades (β) fuera el mismo. Pero también se puede calcular estos riesgos aceptando que uno sea mayor que otro. Por ejemplo, si se quisiera proteger al consumidor podría ser conveniente que el riesgo menor fuera el de falsa conformidad. Aunque esto podría ser perjudicial para el fabricante.

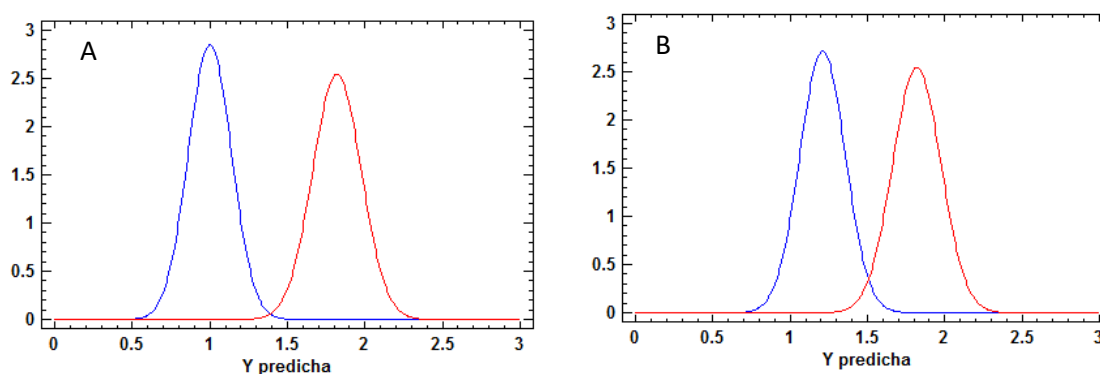


Figura 8. A. Funciones de densidad del experimento 2 en ajuste. B. Funciones de densidad del experimento 2 en predicción. En azul la función de densidad para las muestras sin acrilamida, en rojo para muestras con acrilamida (2167 ppm).

7.3. CALIBRADO CON MUESTRAS PATRÓN EN PURÉ

En este apartado se va a estudiar la viabilidad de realizar un calibrado con el ATR-FTIR en los rangos de patrones que van de 733 ppm a 5718.3 ppm. Para lo cual se han utilizado seis patrones, replicados 25 veces cada uno. La razón de hacer tantas réplicas es para observar la repetibilidad del procedimiento (no repetibilidad instrumental) ya que al tratarse de un sólido puede haber problemas de homogeneidad de la muestra. Estas réplicas son distintas porciones de muestra sólida.

El modelo PLS realizado con las muestras de puré a las que se ha añadido las cantidades de acrilamida indicadas anteriormente, tiene 4 variables latentes (tabla 3). Estas variables se han seleccionado después de eliminar 3 datos anómalos: dos de ellos por tener un residuo estandarizado, en valor absoluto, mayor de 2.5 (experiencias 11 y 140) y otro por tener los dos índices T^2 y Q superiores al valor umbral (significación 1%).

El modelo explica un 98% de la variabilidad de la respuesta con tan solo 29.36% de la variabilidad de los espectros, esto indica que la mayor parte del contenido del espectro no está relacionado con la acrilamida. El modelo es predictivo, ya que el R^2 cal (con los datos en ajuste) es muy similar al R^2 pred (en predicción).



Tabla 3. Modelo calibrado PLS y recta de veracidad (concentración predicha frente a concentración real). Calibrado con muestras de puré sin calentar.

Tamaño matriz experimento	Modelo PLS					Recta de veracidad		
	VL	Varianza explicada		R ² cal	R ² pred	Pendiente	T.ind	ρ
		X (%)	Y (%)					
147 x 1798	4	29.36	98.56	0.986	0.933	0.985	31.04	0.993

Con los valores predichos por este modelo se realiza la recta de veracidad (figura 9) representando la regresión de los valores predichos frente a los valores añadidos de acrilamida. Esta recta debe pasar por el cero y tener de pendiente uno. La validación del modelo se comprueba con dos test de hipótesis, uno para el término independiente (H_0 : Término independiente igual a cero) y otro para la pendiente (H_0 : pendiente igual a 1). Los P-valores de estos dos test son 0.148 y 0.269 respectivamente. Al 5% de significación se puede concluir que estadísticamente el modelo es veraz (no tiene error ni constante ni proporcional).

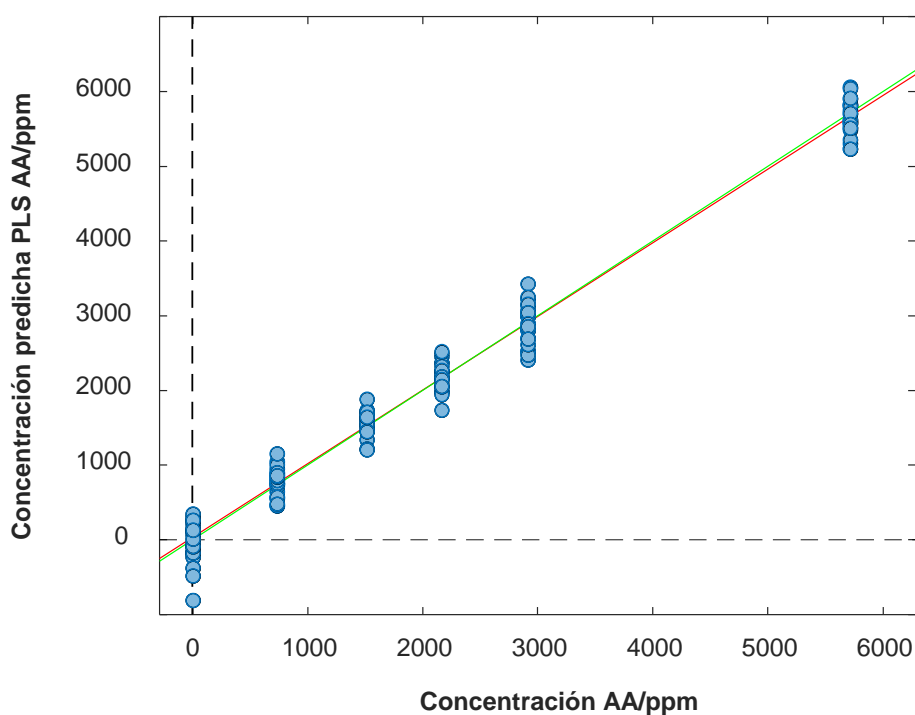


Figura 9. Concentración predicha con el modelo PLS con 4 VL frente a concentración real de acrilamida añadida al puré: 0, 733, 1513, 2166.3, 2913.7, 5718 ppm.



El coeficiente de variación de cada una de las muestras predichas se encuentra recogido en la tabla 4. Se puede considerar adecuado para todas ellas excepto para la medida del puré sin acrilamida, que es muy alto.

Tabla 4. Valores predichos con el modelo PLS con 4VL, CV: coeficiente de variación por niveles en porcentaje.

AA/ppm	Núm. muestras	Valor medio/ppm	% CV
0	24	-32.2	-
733	25	769.3	23.7
1513	25	1580.3	10.02
2166.3	25	2180.0	8.50
2913.7	24	2893.8	9.20
5718.3	24	5648.2	4.08

7.4. CALIBRADO CON MUESTRAS DE PURÉ CALENTADO

El calibrado de las muestras de puré se realiza con 6 muestras de 10 gramos de puré con concentraciones de acrilamida conocidas (0, 733, 1513, 2166.3, 2913.7, 5718 ppm). Se calientan durante 30 min a 150°C. El número de réplicas para cada muestra es de 25 por nivel, para evitar el efecto de muestreo (falta de homogeneidad en la muestra sólida). Con el calentamiento del puré se ha querido simular lo que ocurre al meterlo a un horno en el cocinado. Los resultados obtenidos para el modelo de calibrado PLS se recogen en la tabla 5. La dimensión de la matriz de datos es 150x1798.

El modelo PLS construido tiene 4 variables latentes, después de eliminar las muestras anómalas número 21, 33 y 113 por superar el valor umbral para los índices T^2 y Q (5% de significación). La varianza explicada de la Y es muy alta 98.4% aunque esta varianza está explicada con tan sólo el 24.96% de la variabilidad de los espectros. El modelo es predictivo ya que los valores de R^2_{cal} (varianza explicada en ajuste) y R^2_{pred} (varianza explicada en predicción) son muy similares, como se observa en la tabla 5.

Tabla 5. Modelo calibrado PLS y recta de veracidad (concentración predicha frente a concentración real). Muestras de puré calentadas a 150 °C.

Tamaño matriz experimento	Modelo PLS				Recta de veracidad			
	VL	Varianza explicada		R^2_{cal}	R^2_{pred}	Pendiente	T. ind.	ρ
		X(%)	Y(%)					
150 x 1798	4	24.96	98.36	0.984	0.857	35.9	0.984	0.992



La veracidad del modelo se comprueba cómo se ha indicado anteriormente, con dos test de hipótesis, uno para el término independiente (H_0 : Término independiente igual a cero) y otra para la pendiente (H_0 : pendiente =1). Al 5% de significación hay que concluir que no es posible rechazar ambas hipótesis nulas (P-valores igual a 0.236 y 0.122 respectivamente) por lo tanto el modelo es veraz, no tiene ni sesgo constante, ni proporcional. La figura 10 muestra los espectros de todas las muestras calentadas a 150 °C junto con esta recta de veracidad.

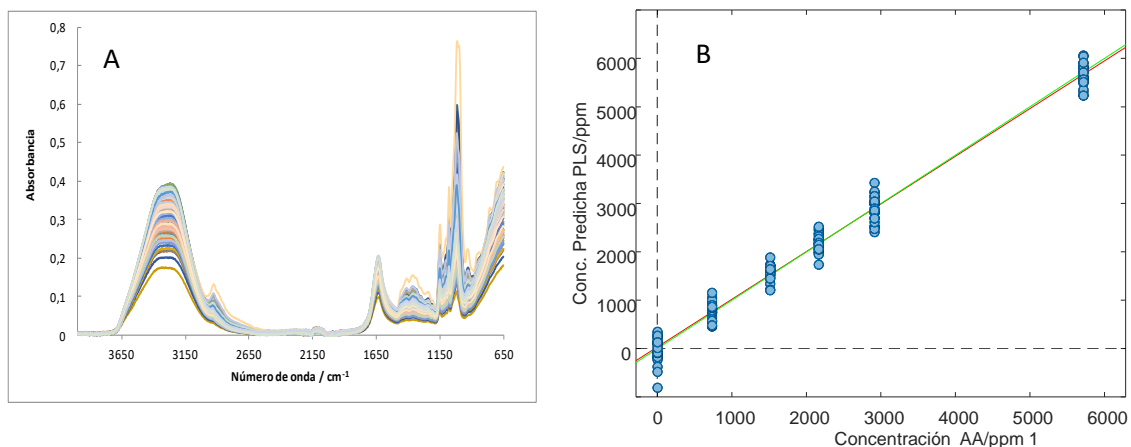


Figura 10. A. Espectros de patrones de acrilamida añadidos a puré (0, 733, 1513, 2166.3, 2913.7, 5718 ppm) después de calentarlos media hora a 150°C. B. Concentración predicha con el modelo PLS con 4 variables latentes.

7.5. MUESTRAS CALENTADAS A DISTINTAS TEMPERATURAS

Para poder observar de forma cuantitativa el efecto que tiene el calentamiento de la muestra de puré sobre la concentración de acrilamida, se han añadido cantidades crecientes de acrilamida: 0, 722.3, 1442.8, 2155.4, 2929.7, 5717.4 ppm a 10 g de puré, a continuación se han realizado 4 porciones distintas y se han sometido cada una de ellas a distintas temperaturas de calentamiento (temperatura ambiente, 150 °C, 175 °C y 200 °C). Además, de cada muestra así tratada, se han analizado cinco porciones que actuarán como réplicas en el experimento.

La figura 11 muestra la diferencia notable de color de las muestras sin calentar y calentadas a 200°C. Se presupone [2] que con una temperatura elevada se forma acrilamida y, por tanto, las muestras tendrán mayor cantidad.

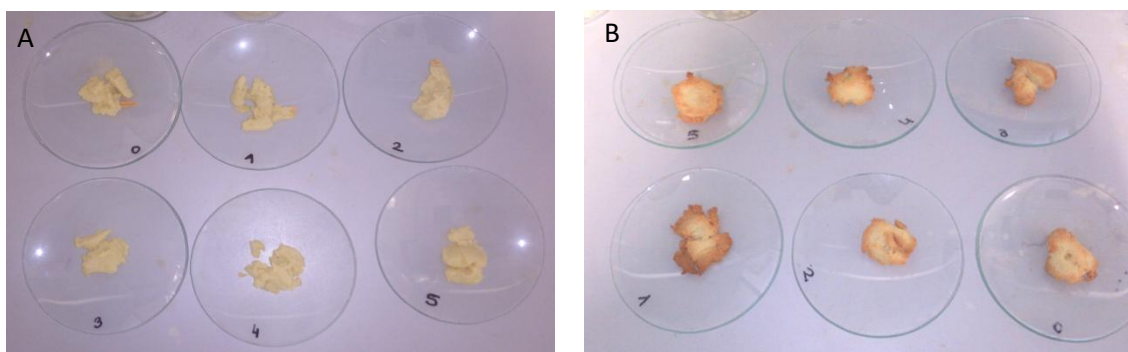


Figura 11. A. Muestras de puré sin calentar. B. Muestras de puré después de un calentamiento a 200 °C durante 30 min.

Como en casos anteriormente estudiados se registra el espectro de estas muestras calentadas. La matriz de datos en este caso es de tamaño 120 x 1798. Las 20 primeras filas de esta matriz se corresponden al puré sin añadir nada, dónde las cinco primeras están a temperatura ambiente (sin calentar), las siguientes cinco muestras calentadas a 150 °C, las cinco siguientes a 175 °C y las cinco últimas a 200 °C. El siguiente grupo de 20 muestras sigue esta misma pauta sólo que en este caso tiene 722.3 ppm y así hasta las últimas 20 que contienen 5717.4 ppm de acrilamida añadida.

El modelo PLS construido tiene 5 variables latentes, los resultados figuran en la tabla 6. Con un 51.2% de la varianza de las X (los espectros) se explica el 95.8% de la Y (cantidad de acrilamida). El modelo es veraz al 2.5% de significación, los P valores de los test de hipótesis para la pendiente y término independiente son 0.088 y 0.025 respectivamente.

Tabla 6. Modelo de calibrado PLS y recta de veracidad (concentración predicha frente a concentración real). Muestras de puré: temperatura ambiente, calentadas a 150 °C, 175 °C y 200 °C, con concentraciones crecientes de acrilamida (0, 722.3, 1442.8, 2155.4, 2929.7, 5717.4 ppm).

Tamaño matriz experimento	Modelo PLS				Recta de veracidad			
	VL	Varianza explicada		R ² cal	R ² pred	Pendiente	T. ind.	ρ
		X (%)	Y (%)					
120 x 1798	1 ^a	19.71	41.04	0.958	0.930	89.7	0.96	0.980
	2 ^a	21.39	31.77					
	3 ^a	4.56	16.08					
	4 ^a	2.78	4.68					
	5 ^a	2.74	2.28					



Sin embargo, con estas 5 VL no se puede explicar el comportamiento del crecimiento de la acrilamida al calentar la muestra ya que los modelos de regresión PLS tratan de ajustar la cantidad de acrilamida real, siempre que esta variación esté contenida en las muestras utilizadas como patrón de calibrado, con todas las variables latentes necesarias (cinco en nuestro caso).

Pero es posible ver el efecto de la temperatura si nos fijamos en los valores predichos con la primera variable latente (ver figura 12), en ella se han marcado con fechas rojas el crecimiento (de la cantidad de acrilamida) con la temperatura. En la parte superior, figura la concentración de acrilamida que ha sido añadida en cada grupo de muestras analizadas.

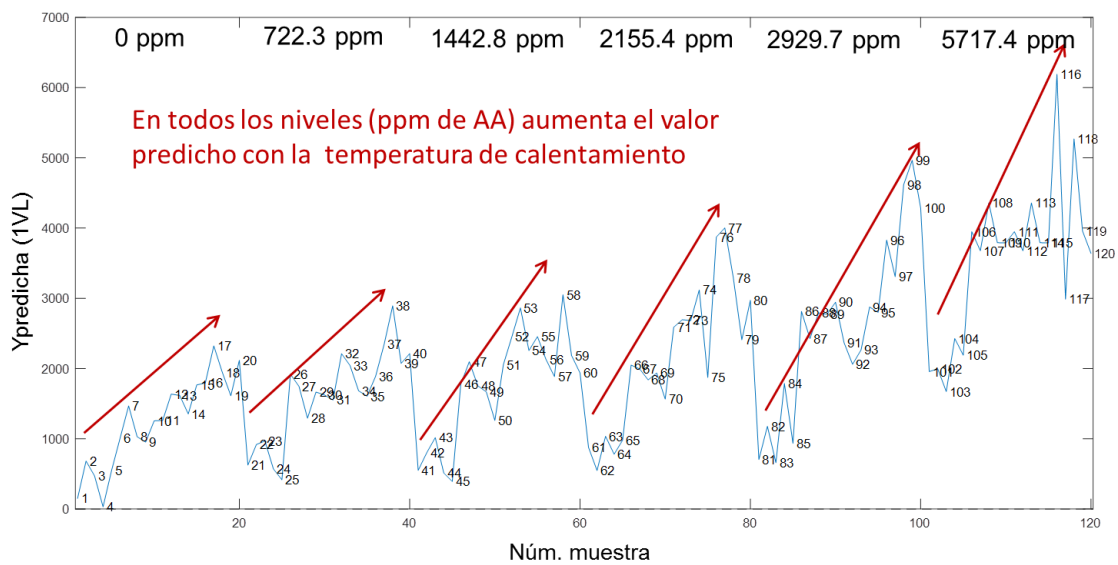


Figura 12. Evolución de los valores predichos, con 1 VL, en función de la temperatura de calentamiento para las distintas cantidades de acrilamida añadida. El número de muestra se corresponde: 1-20 muestras sin acrilamida, 21-40 con 722.3 ppm, 41-60 con 1442.8 ppm, 61-80 con 2155.4 ppm, 81-100 con 2929.7 ppm y 101-120 con 5717.4 ppm.

Además de la tendencia creciente, se observa que las muestras superiores que están dentro de cada nivel de concentración son las que han sido calentadas a una mayor temperatura. Es el caso de las muestras 17 la 20 en el primer nivel, 36 a la 40 en el segundo, 56 a 60 en el tercer, 76 a 80 en el cuarto, 96 a 100 en el quinto y en el último nivel de concentración las muestras 116 a 120.



8. CONCLUSIONS

It is possible to distinguish samples without acrylamide from samples that have been spiked with 733 ppm of acrylamide. The probabilities of false non-compliance and false compliance (α and β) are close to zero in fitting and less than 1% in prediction.

It has been possible to make quantitative determinations of acrylamide in mashed potatoes matrix, being the linear range from 0 to 5718 ppm. The validation lines have a correlation coefficient greater than 0.99, the intercept and the slope are zero and one respectively, which indicates that there is no constant or proportional bias (at the 5% significance level).

In the range of concentrations analyzed, it is possible to differentiate samples of mashed potatoes from those that are not heated.

In order to measure the amount of acrylamide to the concentration levels required by the Regulation (EU) 2017/2158 with the method developed in this project, it would be necessary, previously to starting the investigation, to extract the acrylamide from the sample and/ or know the content of acrylamide through a chromatographic method.

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] NIH, Factores de Riesgo del cáncer, causas y prevención, dieta. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/dieta/hoja-informativa-acrilamida#q1> (Consultado 10 de mayo de 2018)
- [2] Ministerio de Sanidad, servicios sociales e igualdad. Subdirección General de Promoción de la Seguridad Alimentaria. AECOSAN. Disponible en: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/Acrilamida_ficha_ABR18.pdf (Consultado 10 de mayo de 2018)
- [3] Reglamento (UE) 2017/2158 de la Comisión, de 20 de noviembre de 2017, por el que se establecen medidas de mitigación y niveles de referencia para reducir la presencia de acrilamida en los alimentos.
- [4] European Food Safety Authority. Topics A-Z, acrylamide. Disponible en: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/acrylamide> (Consultado 10 de mayo de 2018)
- [5] 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. Disponible en: http://www.who.int/entity/ipcs/food/jecfa/summaries/summary_report_64_final (Consultado el 10 de mayo de 2018)
- [6] Revista chilena de nutrición. Acrilamida en los alimentos. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182007000100001 (Consultado el 10 de Mayo de 2018)



- [7] Fangbo Xia, Chenchen Li, Ning Zhao, He Li, Qi Chang, Xinmin Liu, Yonghong Liao, and Ruile Pan, *Rapid Determination of Active Compounds and Antioxidant Activity of Okra Seeds Using Fourier Transform Near Infrared (FT-NIR) Spectroscopy*, *Molecules*, 2018. 23, 550.
- [8] M. L. Oca, M. C. Ortiz, L. A. Sarabia, A. E. Gredilla, D. Delgado, *Prediction of Zamorano cheese quality by near-infrared spectroscopy assessing false non-compliance and false compliance at minimum permitted limits stated by designation of origin regulations*, *Talanta* 99, 2012. 558–565.
- [9] M. C. Ortiz, L. A. Sarabia, M. E. Meléndez, M. S. Sánchez, *Assessing False Noncompliance and False Compliance with Limits Stated for Physicochemical Parameters in Red Wines Using a MIR-PLS Model*, *Spectroscopy*, 2017, vol. 32 issue 8, 24-31.
- [10] M. C. Ortiz, L. A. Sarabia, R. García-Rey, M. D. Luque de Castro, *Anal. Chim. Acta* 558, 2006. 125.
- [11] R. Díez, L. A. Sarabia, M. C. Ortiz, *Anal. Chim. Acta* 585, 2007. 350.
- [12] D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, *Principios de análisis instrumental*, 5ª Ed., McGraw Hill, New York, 2000.
- [13] D. W. Sun, *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*, Academic Press, Nueva York, 2009.
- [14] Technical note FT-IR. Disponible en: http://www.utsc.utoronto.ca/~traceslab/ATR_FTIR.pdf (Consultado el 17 de mayo de 2018)
- [15] <https://www.thermofisher.com/es/es/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-sample-handling-techniques/ftir-sample-handling-techniques-attenuated-total-reflection-atr.html> (Consultado el 14 de mayo de 2018)
- [16] D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, S. N. Deming, Y. Michotte y L. Kaufman, *Chemometrics: a textbook*, Ed. Elsevier, 1988.
- [17] S. Wold, H. Martens, H. Wold, *The multivariate calibration problem in chemistry solved by the PLS method". Proceedings from the Conference on Matrix Pencils*. March, 1982. Edited by A. Ruhe and B. Kagstrom, Springer-Verlag, Heidelberg , 1983.
- [18] H. Martens and T. Naes in *Multivariate Calibration*. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, UK, 1989.
- [19] R. Bro, *Multivariate Calibration. Multilinear PLS*, *J. Chemometr.*, 1996, 10, 47-61.
- [20] M. C. Ortiz, L. A. Sarabia, M. S. Sánchez, *Tutorial on evaluation of type I and type II errors in chemical analyses: From the analytical detection to authentication of products and process control*, *Analytica Chimica Acta*, 674 (2010) 123–142).



- [21] M. S. Sánchez, M. C. Ortiz, L. A. Sarabia, V. Busto, *Class-modelling techniques that optimize the probabilities of false noncompliance and false compliance*, Chemometr. Intell. Lab. Syst. 103 (2010) 25–42.
- [22] B. M. Wise, N. B. Gallagher, R. Bro, J. M. Shaver, PLS Toolbox 7.9.5.19417, Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA, USA, 2015.
- [23] MATLAB version 8.4.0.150421 (R2014b), The Mathworks, Inc., Natick, MA, USA, 2014.
- [24] STATGRAPHICS Centurion XVII Version 17.1.12 (64bit), Statpoint Technologies, Inc., Herndon, VA, USA, 2016.