

**IMPLEMENTACION DE UNA METODOLOGÍA PARA DETERMINAR LOS
PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DE PH, ACIDEZ Y HUMEDAD EN LA MIEL
DE ABEJAS UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA INFRARROJA EN EL
DEPARTAMENTO DE SANTANDER**

RICARDO ALFREDO SÁNCHEZ SÁNCHEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2015

**IMPLEMENTACION DE UNA METODOLOGÍA PARA DETERMINAR LOS
PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS DE PH, ACIDEZ Y HUMEDAD EN LA MIEL
DE ABEJAS UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA INFRARROJA EN EL
DEPARTAMENTO DE SANTANDER**

RICARDO ALFREDO SÁNCHEZ SÁNCHEZ

**Trabajo de grado presentado como requisito
Para optar el título de Ingeniero Químico
MODALIDAD: PRACTICA EMPRESARIAL**

Directores:

ENRIQUE MEJIA OSPINO

Química, ph. D

DUBAN FABIAN GARCIA NAVAS

Ing. Químico, Magister en Ing. Química

Codirector:

FREDDY ANDRÉS BLANCO

Químico, Magister en Química

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE FISICOQUIMICAS

ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA

BUCARAMANGA

2015

DEDICATORIA

Quisiera dedicar este proyecto a Dios padre todo poderoso, a la virgen María, y a mi familia: Luis José, Beatriz, John, Armando, Miguel, Lina María, Karen, Keiner, porque esta meta nunca hubiese sido posible sin la ayuda de aquellas personas que me levantaron y sostuvieron cuando las fuerzas ya casi se me agotaban.

Gracias por su comprensión, amor, dedicación y sobre todo por confiar en mí.

Gracias

AGRADECIMIENTOS

Al igual que todos los días, quisiera agradecer primero a Dios, porque el tiempo de él es perfecto y me enseñó que es mejor preguntarse el para qué y no el porqué de las cosas.

A la virgen María, madre protectora que cada día nos cubre con su manto sagrado y nos protege como sus hijos.

A Luis José mi padre y Beatriz mi madre porque gracias a su amor y consejos puede culminar este meta.

A Lina María mi novia por apoyarme en los momentos difíciles.

Al personal del laboratorio departamental de salud pública, liderado por la Dra. Leonor Chacón de Mendieta, Liliana, don Omar, María Eugenia, Robinson, Margarita y todos aquellos que aportaron para que este proyecto se llevara a cabo.

A Freddy blanco quien más que un director fue un amigo en este proceso.

A Viviana y el profesor Cabanzo por su tiempo y colaboración.

A Fernando, líder apicultor en la zona guanentina.

A Duban García, por su confianza en mí.

A Dr. Enrique Mejía por el apoyo incondicional a este trabajo de grado.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	14
1. PRESENTACION DE LA EMPRESA	15
2. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	16
3. OBJETIVOS	17
3.1 OBJETIVO GENERAL	17
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	17
4. MARCO TEORICO	18
4.1 ÁCIDOS EN LA MIEL	18
4.2 CENIZAS	19
4.3 SÓLIDOS INSOLUBLES	19
4.4 CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA	19
4.5 HUMEDAD	20
4.6 INFLUENCIAS DE LA COMPOSICIÓN DE AZÚCAR	20
4.7 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (FTIR)	20
4.7.1 Espectro FTIR de la miel de abejas	21
4.8 QUIMIOMETRÍA	23
4.9 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)	24
4.10 REGRESIÓN EN COMPONENTES PRINCIPALES (PCR)	25
4.11 REGRESIÓN PARCIAL POR MÍNIMOS CUADRADOS (PLS)	26
4.12 TRATAMIENTO DE DATOS ESPECTRALES	26
4.12.1 Corrección de línea Base	26
4.12.2 Normalización	27
4.13 TÉCNICAS DE REDUCCIÓN DE VARIABLES	27
4.14 TÉCNICAS DE CALIBRACIÓN	28
5. METODOLOGIA	30
5.1 MÉTODOS USADOS EN LABORATORIO	30
5.2 PROCESAMIENTO DE DATOS	31

6. RESULTADOS Y ANALISIS	32
6.1 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES APLICADOS A LOS ESPECTROS DE LA MIEL DE ABEJAS	32
6.2 MODELO DE PREDICCIÓN DEL PARÁMETRO DE ACIDEZ EN LA MIEL	33
6.2.1. Regiones del espectro para la acidez	33
6.3 MODELO DE PREDICCIÓN DE PARÁMETRO DE PH EN LA MIEL	35
6.3.1 Regiones del espectro para pH	35
6.4 MODELOS DE PREDICCIÓN DEL PARÁMETRO DE HUMEDAD EN LA MIEL	36
6.4.1 Regiones del espectro para humedad	36
7. CONCLUSIONES	39
REFERENCIA BIBLIOGRAFICAS	40
BIBLIOGRAFIA	43
ANEXOS	46

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Parametros Físico Químicos de la miel año 2010.....	18
Tabla 2. Grupos funcionales en el espectro infrarrojo.....	23
Tabla 3. Métodos utilizados en el laboratorio.....	31

LISTA DE GRÁFICAS

	Pág.
Grafica 1. Regiones del espectro para los grupos funcionales	22
Grafica 2. Ejes combinados para las matrices X e Y	29
Grafica 3. Diagrama de flujo de la miel	30
Grafica 4. Scores de los PC.....	32
Grafica 5. Influencia de las muestras en el modelo	33
Grafica 6. Regiones del espectro para la acidez.....	34
Gráfica 7. Predicción vs referencia para la acidez.	34
Gráfica 8. Regiones del espectro para pH	35
Gráfica 9. Predicción vs referencia para pH	36
Grafica 10. Regiones del espectro para humedad en la miel	37
Gráfica 11. Predicción vs referencia para humedad.	37
Grafica 12. Espectro FTIR de la miel	38

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Determinación de acidez libre	46
Anexo B. Determinación de humedad	47
Anexo C. Método para determinar el pH en la miel	48
Anexo D. Obtención de los Espectros	49
Anexo E. Tabla de Resultados de Acidez	50
Anexo F. Tabla de Resultados de pH	51
Anexo G. Tabla de Resultados de Humedad	52
Anexo H. Técnicas de pre-tratamiento de datos espectrales	53
Anexo I. tratamiento de datos	55

RESUMEN

TITULO: METODOLOGÍA PARA DETERMINAR LOS PARÁMETROS FISCOQUÍMICOS DE PH, ACIDEZ Y HUMEDAD EN LA MIEL DE ABEJAS UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA INFRARROJA *

AUTOR: RICARDO ALFREDO SÁNCHEZ SÁNCHEZ**

PALABRAS CLAVES: Espectroscopia infrarroja, Miel de abeja, adulteración, pH, acidez, humedad

DESCRIPCIÓN

La miel es una sustancia dulce elaborada por la abeja *Apis mellífera* a partir del néctar de las flores y secreciones extra florales, las cuales transforman, transportan, concentran y almacenan en panales; además es considerada como fuente de antioxidantes, antiséptico, calmante, laxante, vitaminas, minerales y bactericida.

Uno de los problemas en Colombia es que la producción anual de miel es superada nueve veces por productos adulterados que engañan al consumidor, pues en sus presentaciones y apariencia son muy similares a la miel 100% natural y las técnicas analíticas actuales no permiten minimizar el tiempo de análisis, ni son muy amigables con el medio ambiente, pues utilizan reactivos a base de hierro, plata amonio y azufre por mencionar algunos.

En el presente estudio se plantea una nueva metodología de investigación con técnicas claras, precisas y exactas que no utilizan ningún reactivo, y que está basada en espectroscopia infrarroja media y técnicas quimiométricas, las cuales se compararon con métodos analíticos AOAC a través de modelos matemáticos con los cuales se puede cuantificar la calidad de la miel, minimizando el tiempo de análisis, a través de la medición tres parámetros fisicoquímicos básicos y que encierran en un porcentaje muy alto la información de calidad de la miel como lo son la acidez, pH y humedad.

* Trabajo de Grado

** Escuela de Ingeniería Química, Facultad de fisicoquímicas, Directores: ENRIQUE MEJIA OSPINO, Química, ph. D, DUBAN FABIAN GARCIA NAVAS, Ing. Químico, Magister en Ing. Química.

ABSTRACT

TITLE: METHODOLOGY FOR DETERMINATION OF PHYSICO-CHEMICAL PH, ACIDITY AND HUMIDITY PARAMETERS IN HONEY BEE BY INFRARED SPECTROSCOPY*

AUTHOR: RICARDO SÁNCHEZ ALFREDO SANCHEZ**

KEYWORDS: Infrared spectroscopy, honey, adulteration, pH, acidity, humidity

DESCRIPCIÓN:

Honey is a sweet substance produced by *Apis mellifera* from the nectar of flowers and extra-floral secretions, which process, transport, concentrated and stored in honeycombs; it is also considered as a source of antioxidants, antiseptic, soothing, laxative, vitamins, minerals and bactericide.

One problem in Colombia is that the annual production of honey is surpassed nine times adulterated products mislead consumers, because in their presentations and appearance are very similar to honey 100% natural and current analytical techniques do not allow minimize time analysis, nor are very environmentally friendly because they use reagents based on iron, silver and sulfur ammonium name a few.

In this study a new research methodology arises with clear, precise and accurate techniques that do not use any reagent that is based on mid-infrared spectroscopy and chemometric techniques, which were compared with analytical methods AOAC through mathematical models which you can quantify the quality of honey, minimizing the time of analysis by measuring three basic physicochemical parameters and enclosed in a very high quality information percentage of honey such as acidity, pH and humidity .

Thirty samples of honey bees comunera and Guanentina area of Santander, which were provided by beekeepers in the region for further analysis were taken

* Degree Work

** Escuela de Ingeniería Química, Facultad de fisicoquímicas, Directores: ENRIQUE MEJIA OSPINO, Química, ph. D, DUBAN FABIAN GARCIA NAVAS, Ing. Químico, Magister en Ing. Química.

INTRODUCCION

La miel es la “sustancia dulce elaborada por las abejas *Apis mellifera*, a partir del néctar de las flores y de otras secreciones extra florales, las cuales liban, transportan, transforman, combinan con otras sustancias, deshidratan, concentran y almacenan en panales” (1).

Además, es una fuente de antioxidantes, ácidos naturales, minerales, vitaminas, aminoácidos, enzimas y otras sustancias, responsables de los beneficios para la salud, Y según varios estudios científicos desarrollados por Sato y Miyata², es útil como antiséptico, fortificante, calmante, laxante, diurético y bactericida, entre otras aplicaciones terapéuticas (2).

Sin embargo, en nuestro país la miel es superada nueve veces por productos adulterados que se venden como 100% natural en el mercado nacional; por ejemplo en Colombia para el año 2009 se estimó que la producción nacional de miel fue de dos mil toneladas por año y que los colombianos consumen cerca de veinte mil toneladas anuales, en donde las dieciocho mil toneladas adicionales en el mercado corresponden, principalmente a las mieles adulteradas, y en pequeña proporción a importaciones (3).

Para esta investigación se trabajó con los parámetros de humedad, acidez y pH los cuales fueron cuantificados utilizando espectroscopia infrarroja FTIR combinada con técnicas quimiométricas, las cuales nos permitieron establecer la buena calidad de la miel en el departamento de Santander.

1. PRESENTACION DE LA EMPRESA

El Laboratorio Departamental de Salud Pública de Santander (LDSP) hace parte de la red nacional de laboratorios y es el encargado de apoyar las actividades de vigilancia epidemiológica en términos de enfermedades que sean de interés en salud pública. De igual manera, presta servicios de análisis diagnósticos, control de calidad de muestras que hacen llegar otros laboratorios clínicos así como las que provienen de las Instituciones Prestadoras de Servicios de Salud (IPS).

El laboratorio trabaja en diferentes áreas tales como: virología, parasitología, mico bacterias, toxicología, entomología, aguas y alimentos, entre otras.

Para el caso de Aguas, se trabaja en el análisis y monitoreo en el departamento desde lo microbiológico y sus características físico químicas.

El LDSP, brinda capacitación y asesoría especializada en temas de investigación, como también se encarga de supervisar a los bancos de sangre, laboratorios clínicos y de alimentos. (4)

2. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

La necesidad de implementar un método práctico y de fácil aplicación en el LDSP, obedece al crecimiento indiscriminado de sustancias adulterantes en algunos sectores industriales a nivel regional. Por otra parte, la legislación colombiana hace referencia a este caso, dando a conocer una resolución que obliga a controlar la calidad de la miel y sus características. La espectroscopia infrarroja surge como un método práctico debido a su sencillez y a su bajo costo de inversión, comparado con otros métodos que requieren tratamientos previos de las muestras y que vienen siendo usados por el laboratorio Departamental de salud Pública.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer una metodología para calcular los parámetros fisicoquímicos de pH, acidez y humedad en la miel de abejas mediante el uso de espectroscopia infrarroja FTIR.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Cuantificar los parámetros fisicoquímicos de la miel mediante técnicas analíticas AOAC según la resolución 1057 de ministerio de salud de Colombia.
- Establecer modelos matemáticos para cuantificar los parámetros fisicoquímicos de la miel.
- Implementar una metodología para realizar pruebas de adulteración de miel a partir de espectroscopia infrarroja FTIR.

4. MARCO TEORICO

En la Tabla 1 se muestran los parámetros establecidos por el Ministerio de Salud de Colombia en el año 2010 y sus valores permisibles para establecer la calidad de la miel, a través de la Resolución 1057 (5):

Tabla 1. Parametros Físico Químicos de la miel año 2010

RESQUISITOS	VALORES PERMISIBLES
SOLIDOS INSOLUBLES EN AGUA %	< 0,1
CONTENIDO DE HUMEDAD % m/m	< 21
AZUCAR REDUCTORES	>60
SACAROSA	< 5
CENIZAS	< 0,6
CONDUCTIVIDAD	< 0,8
ACIDEZ	< 40
PH	3,2 < PH < 4,2

4.1 ÁCIDOS EN LA MIEL

El sabor de la miel es el resultado de la interacción de muchas sustancias químicas, pero ninguna de ellas da una nota ácida. El hecho de que la acidez sea casi imperceptible hace su sabor más agradable. La acidez de la miel está, en una escala de pH, entre 3,2 y 4,5 con un promedio de 3,9. Sin embargo, la contribución más significativa del pH es hacia su estabilización contra micro-organismos. El ácido más común en la miel es el ácido glucónico. Este, está producido por la acción de la enzima glucosa oxidasa sobre la dextrosa de la miel (6).

La determinación de ácido titulable nos puede dar información sobre la historia de la miel y es requerido por algunos países, antes de la compra de un lote de miel de abejas. Se considera que una miel con una cantidad de ácido mayor a lo establecido fermentará en un momento dado y el alcohol será convertido a ácido acético por acción bacteriana. El límite máximo tolerado es de 40 mili-equivalentes por cada 1,000 gr. de muestra (7).

4.2 CENIZAS

El contenido de cenizas dependerá de la fuente del néctar. El néctar tiene un contenido de cenizas bajo, mientras que el de mielada es más alto. La mielada es néctar producido por estructuras localizadas fuera de la flor y en algunos casos por néctar colectado de grandes concentraciones de áfidos, que a su vez lo chupan de la corteza de las ramas jóvenes de los arbustos y árboles. El contenido máximo de ceniza es de 0,6% para néctar floral y 1,0% para mieladas (7).

4.3 SÓLIDOS INSOLUBLES

Los sólidos insolubles son por lo general partículas de cera, insectos, material vegetal y polen. El contenido de sólidos insolubles se determina diluyendo una cantidad conocida de miel y filtrándola por un papel de filtro, secando y pesando el mismo antes y después de filtrar. El contenido máximo de sólidos insolubles es de 0,1% para mieles normales y de 0,5% para mieles prensadas (7).

4.4 CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA

La conductividad eléctrica de la miel varía entre los 0,868 a los $3,65 \times 10^{-4}$ /ohm cm. Por regla general estos valores aumentan según el contenido de cenizas aumenta (7).

4.5 HUMEDAD

El determinar con precisión el contenido de humedad (agua) de una muestra de miel es sumamente importante desde varios puntos de vista. El contenido de agua es el factor principal en la delineación y determinación de los estándares de calidad de la miel. Una miel con un diecinueve por ciento de agua tiende a fermentarse más rápido que una miel con menor porcentaje de agua (7):

4.6 INFLUENCIAS DE LA COMPOSICIÓN DE AZÚCAR

La proporción de los diferentes azúcares de una miel tiene un efecto decisivo en sus propiedades físicas y químicas. Los azúcares principales de la miel son la levulosa (fructosa) y la dextrosa (glucosa) y en promedio éstas contabilizan el 77% de lo que llamamos miel. Otros azúcares presentes son; disacáridos como la sacarosa, la maltosa, y el trisacárido melezitosa. De estos, sólo la sacarosa es importante con fines de estándares de calidad. Un máximo de 5% es permitido por la mayoría de los países que compran miel del exterior. Un porcentaje de sacarosa mayor al ocho por ciento está asociado a la adulteración, esto haría que el producto no se pueda vender en el mercado y es penalizable por la ley. Por otro lado, la glucosa de la miel puede aumentar la absorción de los minerales calcio, magnesio y zinc (7).

4.7 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (FTIR)

La espectroscopia FTIR es una técnica analítica rápida que proporciona información cualitativa y cuantitativa valiosa de muestras sólidas, líquidas y gaseosas y tiene un elevado potencial para la elucidación de estructuras moleculares. El espectro infrarrojo de una molécula poli atómica está basado en vibraciones moleculares y la energía para producir esas vibraciones depende de la masa relativa de cada parte de la molécula (a mayor masa será necesaria más

energía) y de la longitud del enlace y puede medirse en la modalidad de transmisión o de reflectancia, siendo más popular la primera de ellas. La absorción de radiación es el resultado de los cambios energéticos producidos en las transiciones de las moléculas de unos estados de energía vibraciones a otros. Como consecuencia, el espectro infrarrojo completo de un compuesto orgánico proporciona una huella dactilar única, fácilmente distinguible del patrón de absorción infrarroja de otros compuestos, incluidos los isómeros. Además, la intensidad de la absorción es proporcional a la concentración de la especie absorbente, por lo que es posible el análisis cuantitativo, que ha aumentado en gran medida durante los últimos años. La región del infrarrojo del espectro abarca la radiación con números de onda comprendidos entre 12.800 y 10 cm^{-1} , que corresponden a longitudes de onda de 0,78 a 1000 μm . El espectro infrarrojo se divide en tres regiones denominadas infrarrojo cercano (12.800-4000 cm^{-1}), medio (4000-200 cm^{-1}) y lejano (200-10 cm^{-1}). (8)

Una posible ventaja de la espectroscopia infrarroja sobre otras técnicas espectroscópicas, es que prácticamente todos los compuestos interaccionan con la radiación infrarroja, y pueden por ello ser analizados de manera cualitativa y cuantitativa. Se trata de una técnica rápida, no-destruktiva, que no necesita reactivos químicos y no contamina el medio ambiente y que presenta un alto grado de automatización y bajos costes de funcionamiento y mantenimiento, a la vez que ofrece un perfil general de la composición química de la muestra (huella dactilar) con elevada precisión y una detección fiable de los datos reduciendo el tiempo y la complejidad de la medición (9)

4.7.1 Espectro FTIR de la miel de abejas . En la Gráfica 1 se observan áreas espectrales semejantes e intensas en la región de 3300 cm^{-1} , que corresponde a vibraciones de estiramiento de los enlaces O-H presentes en las moléculas que componen las mieles analizadas, es el grupo funcional característico de los

glúcidos. La región de $750\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ corresponde a la región anomérica y es característica de la configuración del sacárido (glucosa, fructosa y sacarosa). Las bandas características de los principales grupos funcionales de los carbohidratos presentes en la miel son: 774 , 918 , 927 , 991 , 1017 , 1043 , 1110 y 1259 cm^{-1} . La asignación de grupos funcionales correspondientes a los modos de Vibración q está basada en la identificación de las bandas de absorción del espectro y su frecuencia con el correspondiente grupo químico que absorbe en la región MIR. La banda de 918 cm^{-1} es debida al dobléz del C–H del carbohidrato, mientras que los picos observados en 1043 cm^{-1} y 1259 cm^{-1} corresponden a la extensión del enlace C–O en el grupo de C–OH, así como a la extensión del C–C en la estructura del carbohidrato. El pequeño pico en 1110 cm^{-1} se ha asignado al enlace C–O del acoplamiento de C–O–C (10).

Otra banda de absorción representativa es la correspondiente a la región de $950\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$, donde se encuentran las vibraciones de los enlaces C–O–C, muy común en azúcares. Las bandas situadas en la región entre $2850\text{--}2950\text{ cm}^{-1}$ corresponden a vibraciones de extensión de los enlaces –CH, –CH₂ y –CH₃.

Grafica 1. Regiones del espectro para los grupos funcionales

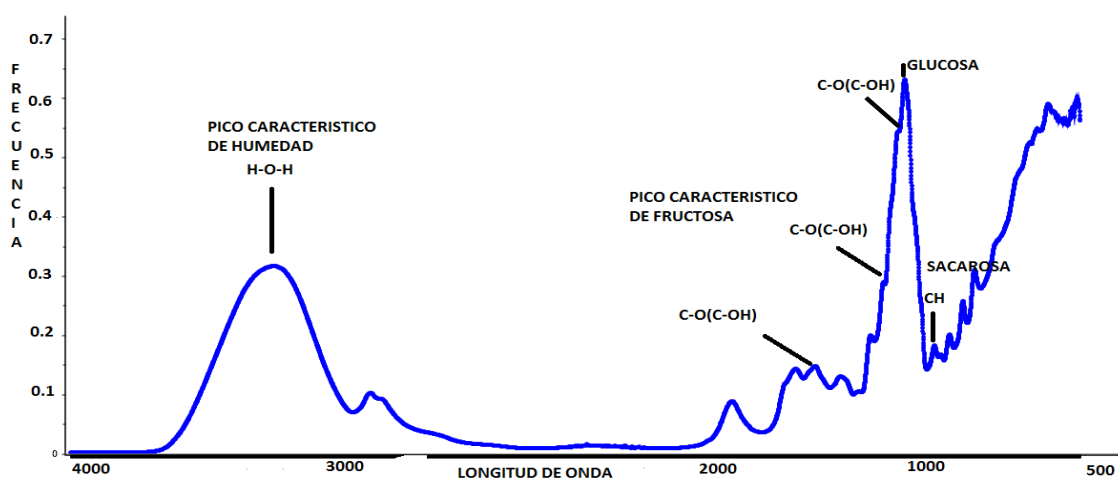


Tabla 2. Grupos funcionales en el espectro infrarrojo

FRECUENCIA	GRUPO FUNCIONAL	MODO DE VIBRACION
927	$C - H$	FLEXION
991	$C - O - H$	EXTENSION
1042	$C - O$	EXTENSION
1110	$C = O$ de cetonas $C - O - C$	EXTENSION- FLEXION EXTENSION- FLEXION
1259	$C - H - O$	EXTENSION
1644	$H - O - H$	FLEXION
3383	$-OH$	EXTENSION
2850-2950	$-CH, -CH_2, CH_3$	EXTENSION

4.8 QUIMIOMETRÍA

Una muestra real puede contener una o más variables de interés (compuestos o sustancias) que requieran determinarse de manera individual, por lo que el incremento en el número de variables conlleva una clara dificultad en la interpretación de resultados obtenidos con instrumentos y técnicas de análisis actuales. Los métodos estadísticos univariados permiten el análisis de conjuntos de datos discretos de una forma rápida y simple pero requieren necesariamente que las variaciones obedezcan a una sola variable. Sin embargo, la habilidad de la mente humana para entender una gran cantidad de información distribuida en n dimensiones es restringida.

Cada espectro puede estar compuesto por varios millares de variables, y si además consideramos la elevada complejidad de las señales MIR, se hace imprescindible el uso de técnicas de análisis multivariable o multivariado, que en

combinación con resultados experimentales derivados de técnicas como la espectroscopia infrarroja, nos permitan interpretar y entender estos grandes conjuntos de datos

El término quimiometría puede ser descrito como una herramienta que permite extraer la información relevante de datos obtenidos durante un experimento químico en este caso usando espectroscopia infrarroja y combinándola con análisis multivariado. Según el objetivo a alcanzar, se utilizan distintas técnicas estadísticas (11).

4.9 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)

El análisis de componentes principales (PCA) es un método estadístico multivariante de simplificación o reducción de variables que permite visualizar en un espacio de dos ó tres dimensiones, cuan similares o diferentes son un grupo de muestras entre sí. El PCA se considera una técnica exploratoria y de pretratamiento de los datos (reducción de dimensiones), como paso previo a la obtención del modelo de calibración. El PCA es una familia de técnicas computacionales relacionadas con el aislamiento de las fuentes de variación en un conjunto de datos. Esta variación debe interpretarse como información, por tanto, esta operación equivaldría a extraer información de ese conjunto de datos, es decir, encontrar lo que hace a una muestra diferente de otra. El PCA también cuantifica la cantidad de información útil contenida en los datos, frente al ruido presente en los mismos.

El propósito de este análisis es reducir el número de dimensiones de tal manera que se puedan visualizar fácilmente las variables, representando un alto porcentaje del conjunto de datos. Todo este procedimiento se realiza a través del análisis de la variancia y distancias entre las muestras, reducir el número de variables de un conjunto mayor, que puedan ser utilizadas en diferentes análisis o

crear un conjunto completamente nuevo con menor número de variables para reemplazar parcial o completamente el conjunto original de variables. (12).

La dificultad en la interpretación de los componentes principales estriba en la necesidad de que tengan sentido y midan algo útil en el contexto del fenómeno estudiado. Por tanto es indispensable considerar el peso que cada variable original tiene dentro del componente elegido, así como las correlaciones existentes entre variables y componentes principales. (8)

4.10 REGRESIÓN EN COMPONENTES PRINCIPALES (PCR)

Aprovecha las propiedades de la descomposición en componentes principales (PCA), realizando una regresión múltiple inversa (ILS) de la propiedad a determinar sobre los scores o cuentas obtenidos en el PCA en lugar de realizarla sobre los datos originales. Casi no existe pérdida de información útil, ya que los scores o cuentas contienen la misma información que los datos originales pero habiendo eliminado el ruido

Un parámetro importante a considerar en el desarrollo de la calibración multivariable es el rango espectral suministrado con el modelo. Cuando el método PCR se emplea para construir modelos de calibración, el rango espectral debe incluir información que describa la variación en la concentración del analito, con el fin de garantizar que las regiones excluidas dominadas por ruido no puedan incorporarse en el modelo. La selección de regiones específicas puede evitar el problema de la detección de rangos espectrales no lineales. Los rangos espectrales adecuados pueden ser identificados mediante el cálculo del coeficiente de determinación para los componentes de interés (jarabes y estándares). Esto se hace mediante el cálculo de la correlación de la absorbancia a cada número de onda en el espectro de cada jarabe y estándar, regiones que muestran una correlación alta son las regiones que se deben seleccionar, mientras

que las regiones que no muestran correlación o baja correlación no se toman en cuenta (13).

4.11 REGRESIÓN PARCIAL POR MÍNIMOS CUADRADOS (PLS)

El método de Regresión Parcial por Mínimos Cuadrados (PLS, *Partial Least-Squares Regression*) es un método de calibración multivariable, fue desarrollado por H. Wold en 1975. La diferencia con el PCR es que se intenta que los primeros componentes contengan la mayor información para la predicción de una matriz. Y Para ello, durante la etapa de calibración, el algoritmo PLS utiliza tanto la información contenida en la matriz de datos (matriz X, p. ej. datos cinético espectrofotométricos) como la información contenida en la matriz de la propiedad a determinar (matriz Y, p. ej. concentraciones), obteniéndose unas variables auxiliares llamadas variables latentes, factores o componentes que tienen gran parecido a los componentes principales que se hallan a partir de un PCR (14)

4.12 TRATAMIENTO DE DATOS ESPECTRALES

Como su nombre lo indica, estos métodos son aplicados antes de analizar y correlacionar los datos espectrales para eliminar los efectos (ruido, baja resolución, desviación línea base, etc.) que distorsionan o desmejoran la información ya sea por el tipo de muestra que se esté analizando o por la herramienta espectroscópica usada. (15)

4.12.1 Corrección de línea Base. La corrección de la línea se utiliza para ajustar el cero espectral y eliminar así efectos no químicos del levantamiento del espectro. Los métodos más usados es el método Offset que consiste en encontrar como punto de referencia cero la señal más baja y a partir de ella realizar el ajuste siguiendo la ecuación 8, y la corrección lineal, que consiste en

tomar dos puntos de referencia como cero, trazándose una recta inclinada, que al aplicarse se vuelve horizontal.

$$f_x = X - \min x \quad (\text{Ecuación 1})$$

4.12.2 Normalización. Los datos se normalizan cuando se quiere analizar un conjunto de espectros de diferentes muestras para lograr que los datos estén aproximadamente a la misma escala. Esta puede realizarse por varios métodos:

- **Normalización con la media:**

$$X = \frac{X_i}{X} \quad (\text{Ecuación 2})$$

4.13 TÉCNICAS DE REDUCCIÓN DE VARIABLES

Estos métodos son ampliamente usados para filtrar y reducir el número de variables que contiene la información relevante presente en un amplio rango de valores como es el caso de los datos espectroscópicos. La técnica más usada es el análisis por componentes principales (PCA).

Análisis por componentes principales (PCA): El PCA es una técnica quimiométrica usada para reducir la cantidad de datos cuando está presente la correlación y adicionalmente permite determinar comportamientos y agrupaciones de las muestras estudiadas. La idea del PCA es encontrar un nuevo sistema coordinado o componentes principales Z_1, Z_2, \dots, Z_n que sean combinaciones lineales de las variables originales X_1, X_2, \dots, X_n , que describen cada muestra, es decir,

$$Z_1 = a_{11} * x_1 + a_{12} * x_2 + a_{13} * x_3 + a_{1n} * x_n \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$Z_2 = a_{21} * x_1 + a_{22} * x_2 + a_{23} * x_3 + a_{2n} * x_n \dots \text{etc.} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde Z1 contiene los datos que explican la mayor variabilidad de las muestras, el componente Z2, que es ortogonal a Z1 recoge los segundos con mayor variabilidad y así sucesivamente; obteniendo como resultado un número menor de ejes o vectores que explican la información contenida en el espectro completo. Matemáticamente, la matriz X (datos espectroscópicos) es descompuesta en un Producto de dos matrices: una matriz de Scores T y una matriz de loadings P, con Un residual condensado en la matriz E.

$$X = t * p^t + E ; \quad a < k \quad \text{(Ecuación 5)}$$

La representación completa de la matriz X implica tantos componentes (tantos vectores de loadings y scores) como dimensiones k tengan los espectros, sin embargo la matriz original será representada por un número menor de vectores.

$$X = t_1 * p_1^t + t_2 * p_2^t + \dots + t_a * p_a^t + E \quad \text{(Ecuación 6)}$$

$$X = t_a * p_a^t + E = x_a + E \quad \text{(Ecuación 7)}$$

4.14 TÉCNICAS DE CALIBRACIÓN

El objetivo principal de las técnicas quimiométricas de calibración es encontrar la relación entre la matriz de datos X, los datos espectroscópicos en este caso con una matriz de datos Y que representan valores de propiedades de la muestra (Ecuación 8), con el fin de construir modelos predictivos.

$$X * B = Y \quad \text{(Ecuación 8)}$$

Como se observa en la ecuación 8, el término desconocido es B que representa la matriz de regresión, que está dada por:

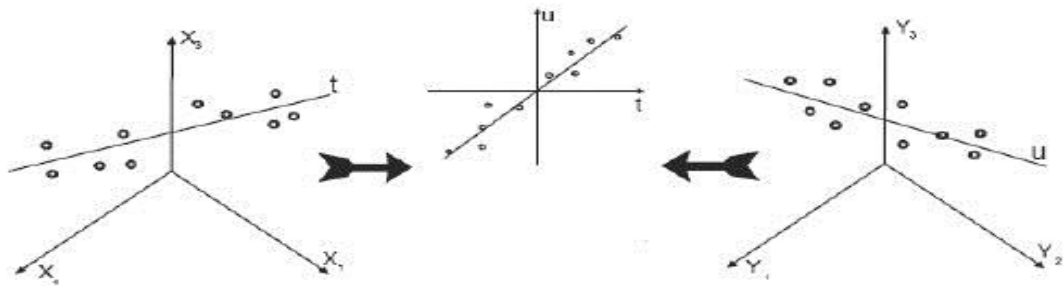
$$B = (X^t * X)^{-1} * X^t * Y \quad \text{(Ecuación 9)}$$

Las técnicas más usadas son la regresión por mínimos cuadrados parciales

(PLS), regresión lineal múltiple (MLR) y regresión por componentes principales (PCR); se diferencian entre sí por la matriz X o variables x que se usa para su aplicación.

Es una técnica de calibración en la cual, se relacionan las matrices X e Y generándose nuevos ejes comunes llamados variables latentes (VL) (Ver Gráfica 1):

Gráfica 2. Ejes combinados para las matrices X e Y



Para que se generen las nuevas VL, las matrices X e Y se descomponen simultáneamente en una suma de A factores calculados: (15)

$$X = T * P^t + E = \sum_{a=1}^A t_a * P_a^t + E \quad \text{(Ecuación 10)} \quad X = X_a + E \quad \text{(Ecuación 11)}$$

$$Y = U * P^t + F = \sum_{a=1}^A U_a * q_a^t + F \quad \text{(Ecuación 12)} \quad Y = Y_a + F \quad \text{(Ecuación 13)}$$

Para realizar los cálculos para predecir una muestra diferente, se aplica el mismo pre-procesamiento a los espectros, que los usados en los espectros de calibración y a partir de las cargas de calibración, se calculan las nuevas puntuaciones o Scores de la muestra:

$$T^* = X_a^* * P \quad \text{(Ecuación 14)}$$

A través de la ecuación 14, se calculan los scores de la matriz propiedad de la muestra desconocida:

$$U = B * T^* \quad \text{(Ecuación 15)}$$

Y usando las cargas o *loadings* de la matriz propiedad, se calcula la matriz Y para la nueva muestra:

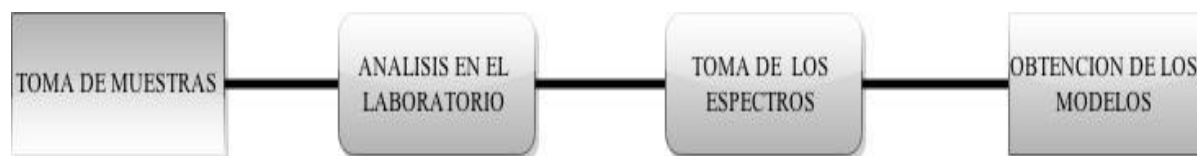
$$Y_a^* = U^* * Q^t \quad \text{(Ecuación 16)}$$

5. METODOLOGIA

Para el análisis, se tomaron 30 muestras de miel para ser cuantificadas, de las cuales 20 de ellas correspondían a apiarios de la zona guanentina y comunera, mientras que las otras 10 correspondían a mieles que se vendían en las plazas de mercado y mieles adulteradas intencionalmente con jarabes de sacarosa, con el fin de establecer un rango de estudio significativo y obtener muestras representativas de la región. El 70 % de las muestras se usó para el ajuste de los modelos, mientras que el 30% restante para su validación.

La toma de muestras se hizo de dos maneras. La primera recolección de mieles fue enviada por parte de los técnicos de Santander ubicados en cada municipio de trabajo. La segunda consistió en la recolección *in situ*, con el fin de conocer más de cerca el proceso. Las muestras recolectadas, se analizaron primero en el laboratorio con técnicas analíticas AOAC y después en el Laboratorio de Espectroscopia de Masas de la Universidad Industrial de Santander con el fin de obtener la información suficiente para introducir al software *The unscrambler* y determinar el mejor modelo de predicción para cada uno de los parámetros fisicoquímicos medidos (pH, acidez y humedad).

Grafica 3. Diagrama de flujo de la miel



5.1 MÉTODOS USADOS EN LABORATORIO

En la Tabla 2 se encuentran enunciadas las metodologías que se utilizaron en el laboratorio departamental de salud pública así como en el laboratorio de

espectroscopia de masa de la universidad industrial de Santander, para determinar cuantitativamente los parámetros con el fin de establecer la metodología que nos permita determinar la calidad de la miel de abejas en el departamento de Santander.

Tabla 3. Métodos utilizados en el laboratorio

PARAMETRO	METODO
ACIDEZ	AOAC 969.388 (Anexo A)
PH	AOAC 945.27 (Anexo B)
HUMEDAD	AOAC 978.18C (Anexo C)
ESPECTROS	FTIR (Anexo D)

Dichos parámetros enunciados en la Tabla 2 fueron cuantificados en el laboratorio con las técnicas analíticas AOAC descritas en los anexos.

5.2 PROCESAMIENTO DE DATOS

Los datos espectroscópicos obtenidos fueron analizados en el software The Unscrambler versión 10.3X proporcionado por la Universidad Industrial de Santander donde inicialmente se les realizó un proceso para disminuir la fuente de variabilidad de los espectros por efectos del ruido, movimiento de la línea base, diferencias de escala entre otros.

Para determinar el tratamiento óptimo de los espectros se realizó un análisis exploratorio de los datos espectrales determinando el valor de la desviación estándar relativa (RSD) a tres números de onda sobresalientes de los espectros después de aplicar los procesos opcionales que presenta el software The Unscrambler, (Anexo I)

6. RESULTADOS Y ANALISIS

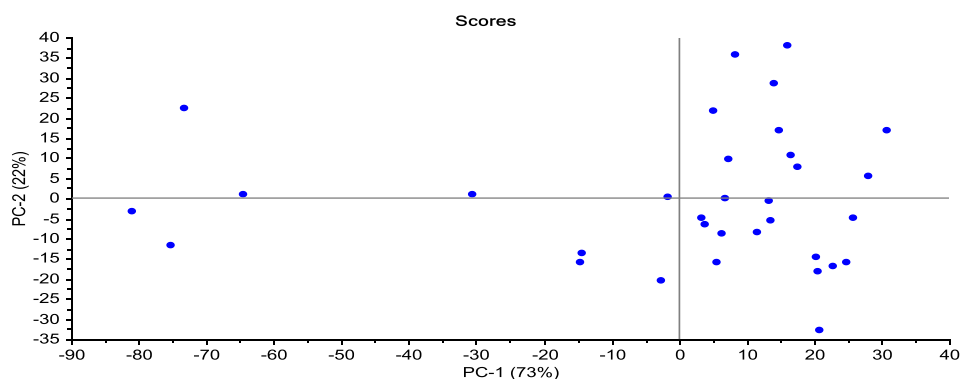
Los parámetros fisicoquímicos de pH, acidez y humedad en la miel de abejas se analizaron primero por técnicas AOAC con el fin de obtener un valor de referencia con el cual poder comparar luego de correr las muestras utilizando espectroscopia Infrarroja media y así definir el mejor modelo para determinar la calidad de la miel midiendo estos tres parámetros.

6.1 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES APLICADOS A LOS ESPECTROS DE LA MIEL DE ABEJAS

Se realizó un PCA al espectro completo (4000-400cm⁻¹) de todo el conjunto de muestras como análisis preliminar, para identificar agrupaciones naturales y las variables significantes para la determinación de los parámetros estructurales.

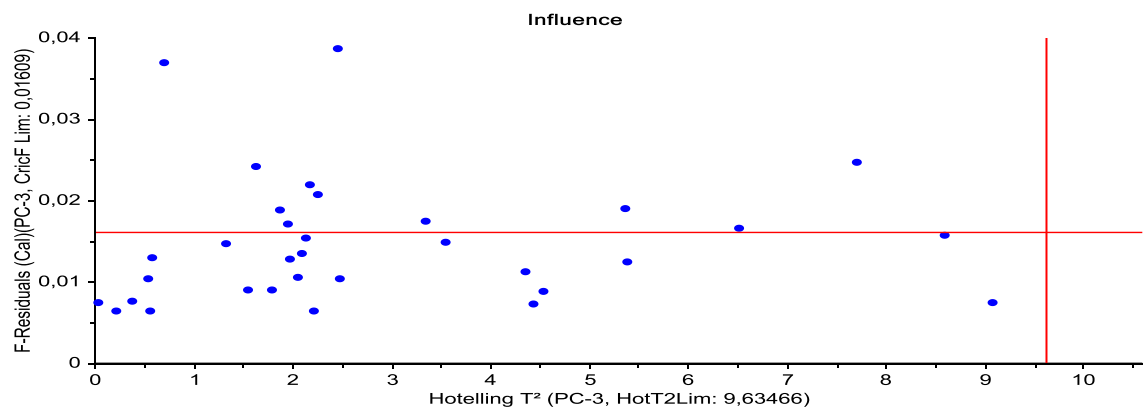
En los resultados obtenidos, se encontró que los tres primeros PCs explican más del 95% de la varianza de los datos. El gráfico de Scores permitió en primer lugar evidenciar las diferencias estructurales que presentan cargas y productos de la miel

Grafica 4. Scores de los PC



En el gráfico 4 de influencia podemos observar que las muestras que están por encima de la línea roja y al lado izquierdo de la línea vertical son variables que muy posiblemente puede afectar negativamente al modelo; pero esto no quiere decir que se pueda eliminar sin que previamente se analice su influencia en el resultado final.

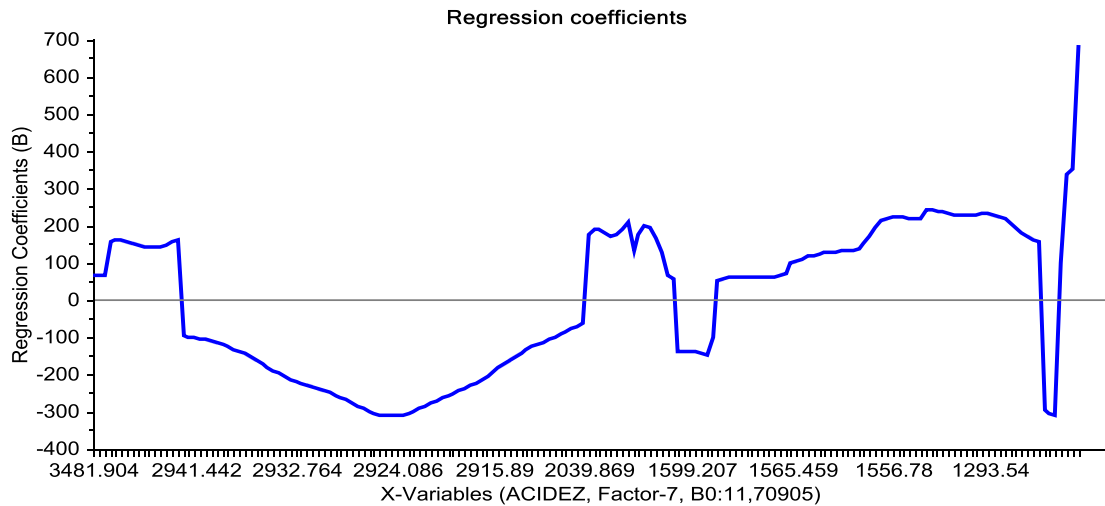
Gráfica 5. Influencia de las muestras en el modelo



6.2 MODELO DE PREDICCIÓN DEL PARÁMETRO DE ACIDEZ EN LA MIEL

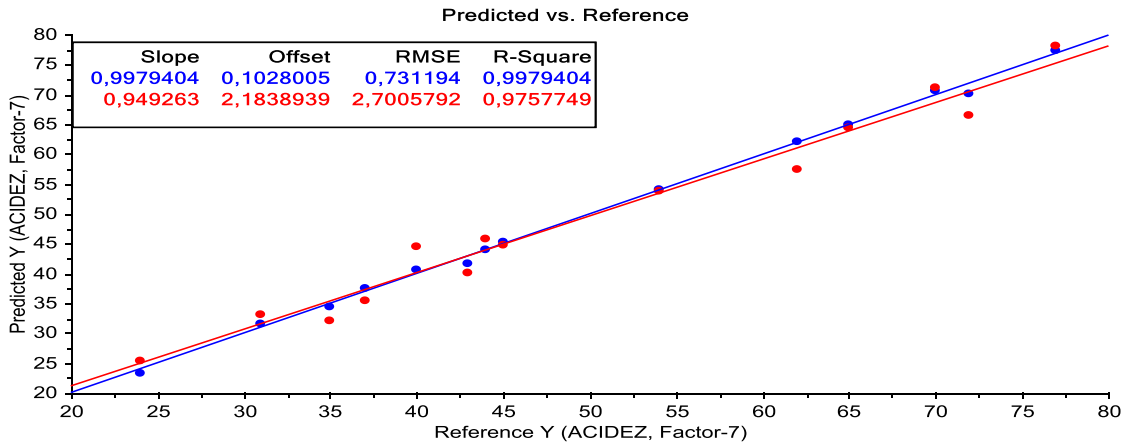
6.2.1. Regiones del espectro para la acidez. La Gráfica 5 muestra los coeficientes de regresión obtenidos para un rango de longitudes de onda comprendido entre $3500 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ y $3000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$

Grafica 6. Regiones del espectro para la acidez



En la **gráfica 5** observamos que los valores calculados por el modelo son muy similares a los valores calculados en el laboratorio con técnicas analíticas AOAC.

Gráfica 7. Predicción vs referencia para la acidez.



Para la curva de calibración de acidez (Gráfica 6) se obtuvo un R^2 de 0,99, con un error del 0,73 menor al 4%, y para la curva de validación se obtuvo un R^2 de 0,97 con un error de 2,7 menor al 4% (Anexo E).

Ecuación de calibración de acidez: $Y = 0,997X + 0,10$ (Ecuación 17)

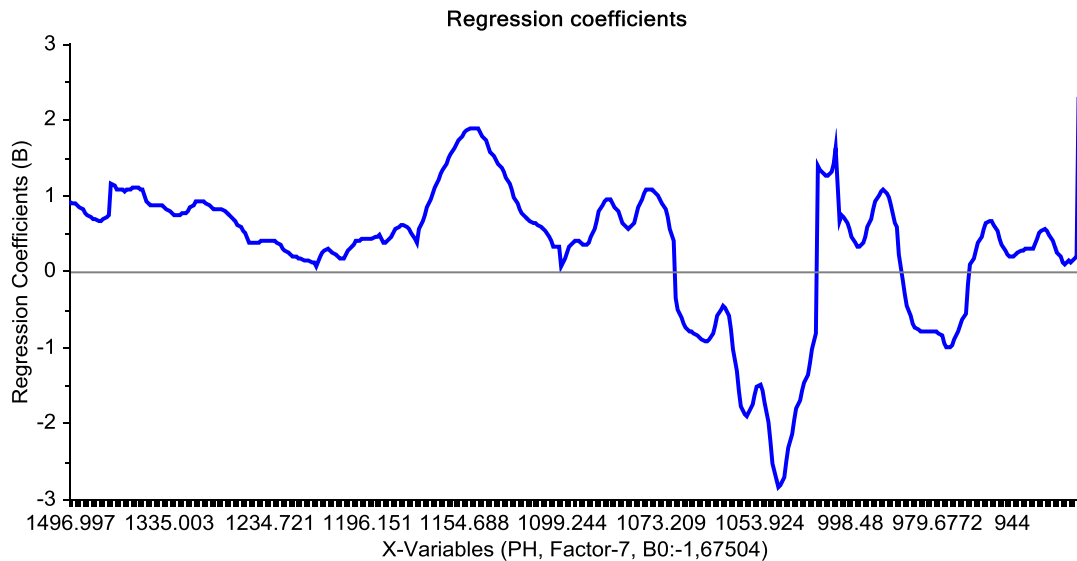
Ecuación de validación de acidez: $Y = 0,94X + 2,18$ (Ecuación 18)

Para la acidez podemos considerar que tanto para el modelo de calibración como para el modelo de predicción el R^2 es mayor del 0,90, y que los errores estándar están por debajo del 3%, por lo tanto se considera que este modelo es aceptable a la hora de predecir la propiedad de acidez en la miel.

6.3 MODELO DE PREDICCIÓN DE PARÁMETRO DE PH EN LA MIEL

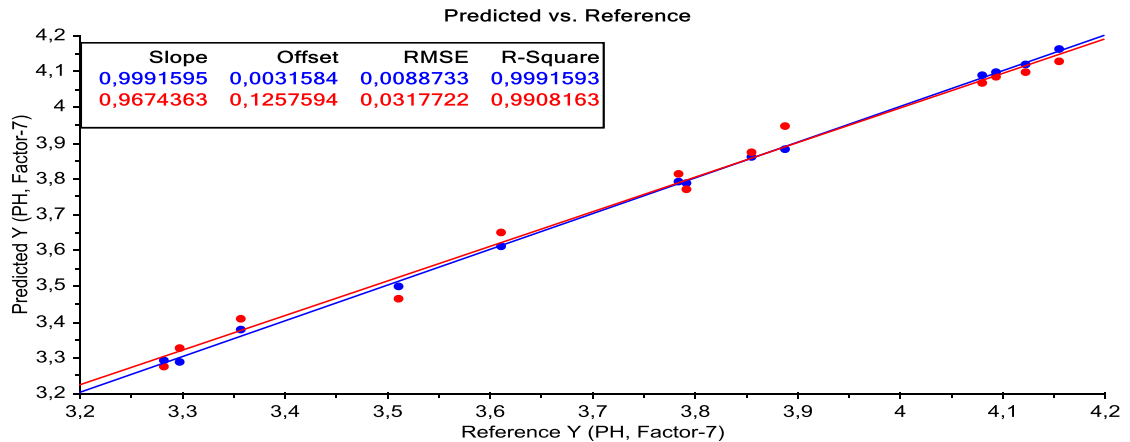
6.3.1 Regiones del espectro para pH. En la Gráfica 7 podemos observar los coeficientes de regresión obtenidos para un rango de longitudes de onda comprendidos entre $1500 - 900 \text{ cm}^{-1}$

Gráfica 8. Regiones del espectro para pH



En la Gráfica 8 los resultados de pH se observó que la desviación estándar promedio fue igual a 0,4 entre los valores calculados en el programa y los valores calculados en el laboratorio.

Gráfica 9. Predicción vs referencia para pH



Para la curva de la calibración de pH (Gráfica 8) se obtuvo un R^2 de 0,99 y un error de 0,008 menor al 6% y para la curva de validación un R^2 de 0,99 con un R^2 de 0,03 menor al 6% (Anexo F).

Ecuación de calibración de pH: $Y = 0,999X + 0,03$ (Ecuación 19)

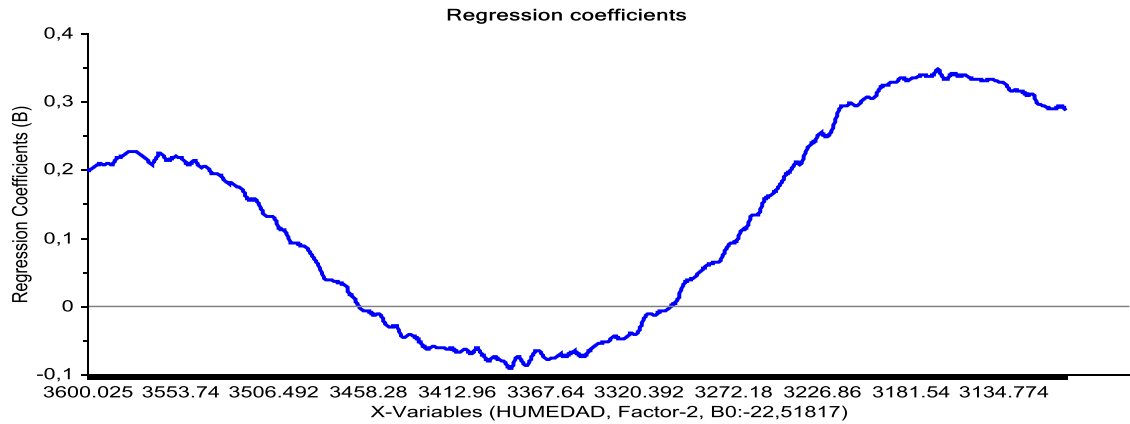
Ecuación de predicción de pH $Y = 0,97X + 0,12$ (Ecuación 20)

Para el parámetro de pH podemos considerar que tanto para el modelo de calibración como para el modelo de predicción el R^2 es mayor del 0,90 y que los errores estándar están por debajo del 5%, por lo tanto se considera que este modelo es aceptable a la hora de predecir la propiedad de acidez en la miel.

6.4 MODELOS DE PREDICCIÓN DEL PARÁMETRO DE HUMEDAD EN LA MIEL

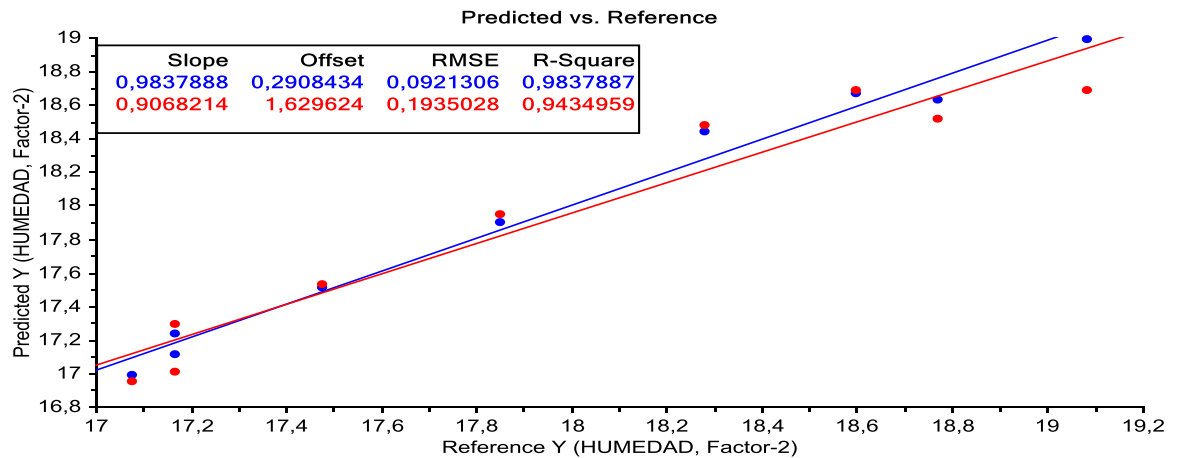
6.4.1 Regiones del espectro para humedad. En la Gráfica 9 podemos observar los coeficientes de regresión obtenidos para un rango de longitudes de onda comprendidos entre 3600 y 3100 cm^{-1}

Gráfica 10. Regiones del espectro para humedad en la miel



En la tabla de resultados correspondiente a humedad (Anexo G) se pudo observar que la desviación estándar fue del 0,2 comparando los resultados obtenidos por la nueva metodología y las técnicas tradicionales de laboratorio.

Gráfica 11. Predicción vs referencia para humedad.



Para la humedad (Ver Gráfica 10) se obtuvo un R^2 de 0,98 para la curva de calibración con error del 0,09 menor al 1% y para la curva de validación un R^2 de 0,94 y un error de 0,19 menor al 1% (Anexo G).

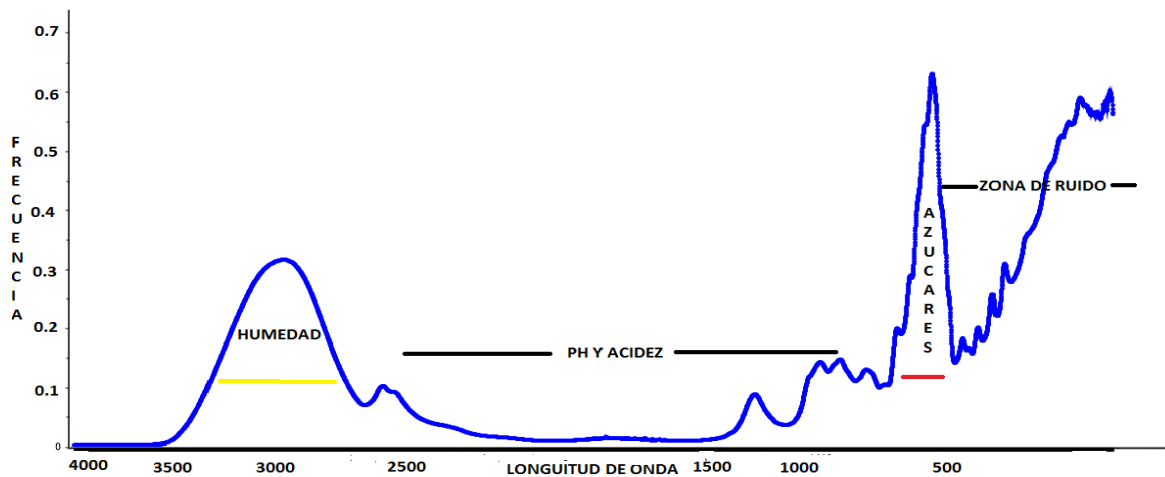
Ecuación de calibración de humedad: $Y = 0,98X + 0,29$ (Ecuación 21)

Ecuación de predicción de humedad: $Y = 0,90X + 1,63$ (Ecuación 22)

Para el parámetro de humedad podemos considerar que tanto para el modelo de calibración como para el modelo de predicción el R^2 es mayor del 0,90 y que los errores estándar están por debajo del 5% por lo tanto se considera que este modelo es aceptable a la hora de predecir la propiedad de acidez en la miel.

Los Rangos del espectro de infrarojo obtenidos para los 6 modelos son mostrados en la gráfica 11.

Grafica 12. Espectro FTIR de la miel



Los parámetros fisicoquímicos de la miel asociados en este estudio fueron ajustados dentro de los valores permisibles establecidos por las autoridades sanitarias Colombianas y cualquier muestra que no cumpla con al menos uno de estos parámetros puede ser considerada como miel adulterada.

7. CONCLUSIONES

Los tres modelos matemáticos desarrollados en el Software *The Unscrambler* para cuantificar los parámetros de acidez, humedad y pH, ajustados a diferentes muestras representativas del departamento de Santander, presentan un R^2 superior al 0,90 con errores menores al 10%, lo que los hace adecuados a la hora de identificar la adulteración de la miel.

La acidez presenta la mayor desviación estándar, debido a que la miel tiende a acidificarse con el tiempo y en este caso la diferencia de medición entre el infrarrojo y las técnicas tradicionales fue de una semana, por lo tanto al comparar los valores medidos con técnicas analíticas y los obtenidos con el modelo de acidez, sus resultados difieren entre sí.

Con el parámetro de humedad se tiene una medida verás a la hora de determinar la calidad de la miel, porque entre menor sea su valor mayor será su frescura e inhibirá la reproducción de microorganismos.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICAS

1. CODEX ALIMENTARIUS. International Food Standards. [Disponible en: www.codexalimentarius.org. [Citado el: 15 de Marzo de 2015.]
2. MIYATA, G, SATO T. The nutraceutical benefit: honey nutritional pharmaceuticals. [Disponible en: <https://www.deepdyve.com/lp/elsevier/the-nutraceutical-benefit-part-iii-honey-WeDjjYbfex>. [Citado el: 25 de febrero de 2015.]
3. NACIONES UNIDAS. Documento de diagnóstico productivo y comercial de la cadena apícola de los programas para la sustitución de los cultivos ilícitos y desarrollo alternativo de acción social. [Disponible en: <http://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/diagnostigo.pdf>. [Citado el: 10 de Marzo de 2015.]
4. OBSERVATORIO SALUD SANTANDER. [Disponible en: www.observatorio.saludsantander.gov.co [Citado el: 2 de Mayo de 2015.].
5. COLOMBIA. Ministerio de Salud Pública de Colombia. Resolucion 1057 de 2010. Bogota : s.n., 2010.
6. LESLEY SUESCUEN, Patricia, vit. Departamento Ciencia de los Alimentos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela Control de calidad de la miel de abejas producida como propuesta para un proyecto de servicio comunitario obligatorio. [En línea] junio de 2006. [Citado el: 3 de marzo de 2015.]
7. PESANTE ARMSTRONG, Daniel G. Agroecología - Apicultura Tropical Sostenible. Recinto Universitario de Mayagüez. [Disponible en:

<http://academic.uprm.edu/dpesante/5355/lamieldeabejas.PDF>] [Citado el: 20 de Marzo de 2014.].

8. CORRIPIO RIOS, Maria Antonieta. Quimiometria en la miel de abeja para determinación de azúcares y detección de adulteración utilizando espectroscopia Infrarroja. 21 de Diciembre de 2010. [Disponible en: <http://hdl.handle.net/123456789/10298>. [Citado el: 21 de Febrero de 2005.]

9. EDELMAN, David. Flow-through sensing of tannin- protein interactions based on FTIR.: journal of american chemical society, 2001, Vol. 124.

10. TEWARI, J. AND IRUDAYARAJ, J. Quantification of saccharides in multiple floral honeys using Fourier Transformed Infrared Microattenuated Total Reflectance Spectroscopy. s.l. : journal agriculture and food chemestrical, 2004.

11. LOPEZ, Pedro. Quimiometria aplicada al control. Nuevo León, Mexico : ciencia UNAL, 1996, Vol. 6.

12. MASSART, DI. the objects belonging to class i at the j-th wavenumbe. amsterdam : elsevier, 1998.

13. SIVAKESAVA, J IRUDAYARAJ, A DEMIRCI. Monitoring a bioprocess for ethanol production using FT-MIR and FT-Raman spectroscopy. [En línea] 12 de enero de 2001. [Citado el: 15 de febrero de 2015.]

14. RODRIGUEZ, E. Método de minimos cuadrados. febrero de 2007 [Disponible en: http://www.geocities.ws/datos_universidad/MNumericos/AjusteDeCurvas.pdf.. [Citado el: 20 de enero de 2015.]

15. MENDOZA, lesly Viviana. , Predicción de propiedades fisicoquímicas de productos destilados del delayed coking de fondos de vacío a partir de parámetros estructurales determinados por espectroscopia infrarroja FTIR-ATR y métodos quimiométricos. Universidad industrial de Santander. Bucaramanga : s.n., 2014.

16. KELLY JD. Detection of sugar adulterants in apple juice using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. s.l. : journal agriculture and food chemistry, 2005.

17. WAHDAN, H. A. Causes of the antimicrobial activity of honey infection. [En línea] enero- febrero de 1998. [Citado el: 26 de enero de 2015.]

18. ——. Causes of the antimicrobial activity of honey infection. 1998.

BIBLIOGRAFIA

CODEX ALIMENTARIUS. International Food Standards. [Disponible en: www.codexalimentarius.org. [Citado el: 15 de Marzo de 2015.]

COLOMBIA. Ministerio de Salud Pública de Colombia. Resolucion 1057 de 2010. Bogota : s.n., 2010.

CORRIPIO RIOS, Maria Antonieta. Quimiometria en la miel de abeja para determinación de azúcares y detección de adulteración utilizando espectroscopia Infrarroja. 21 de Diciembre de 2010. [Disponible en: <http://hdl.handle.net/123456789/10298>. [Citado el: 21 de Febrero de 2005.]

EDELMAN, David. Flow-through sensing of tannin- protein interactions based on FTIR.: journal of american chemical society, 2001, Vol. 124.

LESLEY SUESCUEN, Patricia, vit. Departamento Ciencia de los Alimentos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela Control de calidad de la miel de abejas producida como propuesta para un proyecto de servicio comunitario obligatorio. [En línea] junio de 2006. [Citado el: 3 de marzo de 2015.]

LOPEZ, Pedro. Quimiometria aplicada al control. Nuevo León, Mexico : ciencia UNAL, 1996, Vol. 6.

KELLY JD. Detection of sugar adulterants in apple juice using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. s.l. : journal agriculture and food chemistry, 2005.

MASSART, DI. the objects belonging to class i at the j-th wavenumbe. amsterdam :
elselvier, 1998.

MENDOZA, lesly Viviana. , Predicción de propiedades fisicoquímicas de productos
destilados del delayed coking de fondos de vacío a partir de parámetros
estructurales determinados por espectroscopia infrarroja FTIR-ATR y métodos
quimiométricos. Universidad industrial de Santander. Bucaramanga : s.n., 2014.

MIYATA, G, SATO T. The nutraceutical benefit: honey nutritional pharmaceuticals.
[Disponible en: <https://www.deepdyve.com/lp/elsevier/the-nutraceutical-benefit-part-iii-honey-WeDjjYbfex>. [Citado el: 25 de febrero de 2015.]

NACIONES UNIDAS. Documento de diagnóstico productivo y comercial de la
cadena apícola de los programas para la sustitución de los cultivos ilícitos y
desarrollo alternativo de acción social. [Disponible en:
<http://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/diagnostigo.pdf>. [Citado
el: 10 de Marzo de 2015.]

OBSERVATORIO SALUD SANTANDER. [Disponible en:
www.observatorio.saludsantander.gov.co [Citado el: 2 de Mayo de 2015].

PESANTE ARMSTRONG, Daniel G. Agroecología - Apicultura Tropical Sostenible.
Recinto Universitario de Mayagüez. [Disponible en:
<http://academic.uprm.edu/dpesante/5355/lamieldeabejas.PDF>] [Citado el: 20 de
Marzo de 2014.].

SIVAKESAVA, J IRUDAYARAJ, A DEMIRCI. Monitoring a bioprocess for ethanol
production using FT-MIR and FT-Raman spectroscopy. [En línea] 12 de enero de
2001. [Citado el: 15 de febrero de 2015.]

RODRIGUEZ, E. Método de mínimos cuadrados. febrero de 2007 [Disponible en: http://www.geocities.ws/datos_universidad/MNumericos/AjusteDeCurvas.pdf..]
[Citado el: 20 de enero de 2015.]

TEWARI, J. AND IRUDAYARAJ, J. Quantification of saccharides in multiple floral honeys using Fourier Transformed Infrared Microattenuated Total Reflectance Spectroscopy. s.l. : journal agriculture and food chemestrical, 2004.

WAHDAN, H. A. Causes of the antimicrobial activity of honey infection.
[En línea] enero- febrero de 1998. [Citado el: 26 de enero de 2015.]

Anexo A. Determinación de acidez libre

Reactivos

Solución de Hidróxido de Sodio (NaOH 0.1%)

Material

Vaso precipitado de 250ml

Bureta

Pipetas volumétricas de 10ml

Agitador magnético

Procedimiento

Pesar aproximadamente 5g de la muestra en un vaso precipitado de 250ml y agregarle 75ml de agua destilada libre de dióxido de carbono, la cual se desgasificó llevando a ebullición. Dejar reposar cubriendo con papel aluminio a temperatura ambiente. Agitar y disolver completamente.

Agregar 4 gotas de fenolftaleína y titular con NaOH 0.1N con flujo constante, hasta alcanzar un color rosado en la muestra

Los resultados se expresan en gramos de ácido fórmico

$$\text{acido formico} = \frac{(0,23 * V)}{M}$$

Donde:

V: volumen gastado en ml de NaOH

M: peso de la muestra

Para calcular la acidez en la miel en forma de acidez libre se multiplica el resultado de ácido fórmico con un factor de conversión igual 0,0046703

Los resultados se expresan en mili equivalentes de ácido por kilogramo de miel

Anexo B. Determinación de humedad

Principio del método

Este método se basa en el cambio de dirección que sufren los rayos luminosos en el límite de la separación de dos medios, en los cuales es distinta la velocidad de Propagación.

Aparatos

- Refractómetro.

Toma de muestras

Si la muestra está libre de gránulos, mezclar perfectamente removiendo o agitando; si se tienen gránulos, meter el envase cerrado al baño María, sin sumergirlo y calentar durante treinta minutos a 50°C hasta que la miel se licúe. Es esencial agitar de vez en Cuando.

Cuando lo que se desea determinar es el hidroximetilfurfural o la diastasa, no se debe calentar la miel. Si hay alguna sustancia extraña, calentar la muestra al baño María hasta 40°C y filtrarla

Procedimiento:

Determinar el índice de refracción de la muestra de ensayo utilizando un refractómetro a temperatura constante, próxima a los 20°C. Convertir la lectura en contenido de humedad (por ciento m/m) utilizando la tabla que se indica a continuación.

Si la determinación se hace a una temperatura que no sea 20°C, convertir la lectura en temperatura patrón de 20°C, utilizando las correcciones que se indican más abajo en la Tabla siguiente.

Anexo C. Método para determinar el pH en la miel

Principio

La concentración de iones hidrogeno en una solución acuosa es la medida en la escala de pH, para saber lo ácido o base que es un alimento.

Materiales

- Vaso precipitado de 100 ml
- Varilla de vidrio
- Potenciómetro
- Soluciones búfer de pH de 4,00 y 7,00

Procedimiento

Calibrar el pH – metro con las soluciones buffer de 4,00 y 7,00, anotar sus valores. Pesar 5 gramos de miel en el vaso de precipitado y disolver en 75 ml de agua destilada hasta homogenizar la solución. Pasar al pH- metro y hacer la medición, registrar el valor dado.

Anexo D. Obtención de los Espectros

Equipo utilizado

Los espectros infrarrojos fueron adquiridos en un equipo de nicolet 1550 FTIR-ATR de thermo scientific, en el rango de 400- 4000 cm^{-1} que corresponden al rango espectral de infrarrojo medio (MIR), el cual tiene acoplada una celda ATR equipada con un cristal de reflexión de diamante de un solo paso, con ángulo de incidencia fijo de 45°



Adquisición de Espectros

Los espectros infrarrojos adquiridos usando el software OMNIC en formato txt y analizados con el programa THE UNSCRAMBER. Para determinar los parámetros de adquisición como resolución, número de scans y velocidad de interferómetro se determinó la relación señal/ruido de fondo espectral 400- 900 cm^{-1} (32), de los espectros tomados a diferentes condiciones.

Fuente: Lesly Viviana Mendoza, predicción de propiedades fisicoquímicas de productos destilados del delayed coking de fondos de vacío a partir de parámetros estructurales determinados por espectroscopia infrarroja FTIR-ATR y métodos quimiométricos. Universidad industrial de Santander

Anexo E. Tabla de Resultados de Acidez

MUESTRA	VALOR 1 software	VALOR 2 laboratorio
1	84	80
2	59	58
3	52	50
4	77	76
5	47	46
6	41	40
7	57	55
8	32	31
9	49	48
10	61	59
11	30	29
12	48	47
13	54	53
14	58	56
15	47	45
16	71	69
17	48	46
18	44	40
19	68	65
20	59	55

Anexo F. Tabla de Resultados de pH

MUESTRA	VALOR 1 software	VALOR 2 laboratorio
1	3,845	3,626
2	3,956	3,888
3	4,210	4,149
4	4,146	4,081
5	4,159	4,003
6	4,245	4,153
7	4,343	4,124
8	3,967	3,850
9	3,981	3,756
10	3,921	3,777
11	4,314	4,095
12	3,876	3,698
13	3,732	3,353
14	3,711	3,350
15	3,693	3,421
16	3,864	3,512
17	3,970	3,612
18	4,098	3,785
19	4,231	3,965
20	4,321	4,156

Anexo G. Tabla de Resultados de Humedad

MUESTRA	VALOR 1	VALOR 2
1	18,607	19,084
2	16,859	17,167
3	16,740	17,166
4	18,062	18,280
5	17,989	19,488
6	16,211	18,684
7	18,239	16,007
8	16,654	17,880
9	17,359	19,887
10	18,239	18,368
1-1	16,780	18,768
12	17,072	18,368
13	17,128	18,528
14	17,091	17,968
15	17,513	18,365
16	16,616	17,850
17	16,827	17,480
18	17,516	19,086
19	18,891	19,100
20	18,000	19,085

Anexo H. Técnicas de pre-tratamiento de datos espectrales

Como su nombre lo indica, estos métodos son aplicados antes de analizar y Correlacionar los datos espectrales para eliminar los efectos (ruido, baja Resolución, desviación línea base etc.) Que distorsionan o desmejoran la Información ya sea por el tipo de muestra que se esté analizando o por la herramienta espectroscópica usada. Los pre-tratamientos más usados en espectroscopia son (Hopke & Philip, 2003):

Promediado de espectros: Se realiza para eliminar ruido debido a que este es de naturaleza aleatoria. Consiste en realizar un promedio de las señales adquiridas bajo las mismas condiciones y de la misma muestra aumentando así la relación señal/ruido.

Suavizado: Es usado para eliminar el ruido espectral, cuando el promediado no es suficiente. Este es realizado a través de algoritmos matemáticos o filtros que evalúan y discrimina las señales del ruido. Los algoritmos más usados son el de Savitsky-Golay (Savitsky & Golay, 1964), transformada de Fourier (Oppenheim, 2007) y transformada Wavelet (Chau & Liang, 2004).

Derivación: Se usa para resolver bandas y corregir la línea base, pero presenta como desventaja el aumento del ruido. Las más comúnmente usadas son la primera y segunda derivada. La primera mide la pendiente de la curva espectral en cada punto, con lo cual se hace cero aquellos puntos donde se encuentra el máximo de una señal (resuelve señales) y la segunda mide el cambio de la pendiente de la curva, con lo cual se realiza corrección de línea base y se resuelve picos cercanos. El algoritmo más usado es el de Savitsky-Golay.

Corrección de línea Base: La corrección de la línea se utiliza para ajustar el cero espectral y eliminar así efectos no químicos del levantamiento del espectro. Los métodos más usados es el método *Offset* que consiste en encontrar como punto de referencia cero la señal más baja y a partir de ella realizar el ajuste siguiendo la ecuación 8, y la corrección *lineal*, que consiste en tomar dos puntos de referencia como cero, trazándose una recta inclinada, que al aplicarse se vuelve horizontal.

$$f_x = X - \min x$$

Normalización: Los datos se normalizan cuando se quiere analizar un conjunto de espectros de diferentes muestras para lograr que los datos estén aproximadamente a la misma escala. Esta puede realizarse por varios métodos:

Normalización por área:

$$X_i = x_i / \sum_j x_{ij}$$

Normalización por vector unitario:

$$X_i = x_i / \sqrt{\sum_j x_i^2}$$

Normalización con la media:

$$X = \frac{x_i}{\bar{x}}$$

Normalización con máximo:

$$X_i = x_i / x_{max}$$

Normalización por rangos:

$$X_i = x_i / (x_{max} - x_{min})$$

Normalización por pico:

$$X_i = \frac{x_i}{x_{ik}}$$

Anexo I. tratamiento de datos

	324	100	508,	399,	324	100	508,	399,	324	100	508,	399,	324	100	508,	399,
	6,14	9,56	159	681	6,14	9,56	159	681	6,14	9,56	159	681	6,14	9,56	159	681
	5	9	3	3	5	9	3	3	5	9	3	3	5	9	3	3
muest	cm-	cm-	cm-	cm-	cm-	cm-	cm-	cm-	cm-	cm-	cm-	cm-	cm-	cm-	cm-	cm-
ras	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10%M		0,53	0,59						0,50	0,84	0,93		0,50	0,84	0,93	
A-	0,31	8491	3680		2,29	3,88	4,28		0666	8525	5489		0666	8525	5489	
1.CSV	7733	1	2	0	3495	6995	5367	0	5	2	2	0	5	2	2	0
		0,50		0,58					0,51	0,82	0,95	0,95	0,51	0,82	0,95	0,96
1777-	0,31	1972	0,58	3911	2,29	3,68	4,26	4,28	2737	4634	4518	9243	4893	8102	8532	3276
1.CSV	2114	7	1036	8	2679	7314	8085	9209	1	6	9	2	2	2	6	8
		0,55	0,58	0,59					0,49	0,89	0,94	0,96	0,49		0,94	0,96
1778-	0,30	8424	8370	9166	2,25	4,08	4,30	4,38	4923	6497	4573	1904	6924	0,90	8391	5792
1.CSV	8286	3	7	2	4298	34	2378	1319	9	1	2	5	5	0121	4	7
	0,30	0,56	0,58	0,61					0,49	0,90	0,94	0,98		0,90	0,94	0,98
1813-	6875	3780	7002	2311	2,25	4,14	4,31	4,50	3055	5824	3134	3798	0,49	9220	6670	7486
1.CSV	2	7	2	1	7521	7441	8269	4454	3	5	4	1	4904	9	7	8
		0,55	0,59	0,60						0,89	0,96	0,98	0,51	0,90	0,96	0,99
1814-	0,31	2159	0116	8371	2,28	4,02	4,29	4,42	0,50	8263	0013	9710	1610	2087	4099	3923
1.CSV	3152	3	5	4	0159	0446	6824	9744	9442	9	4	8	4	4	8	5
	0,31	0,55	0,58	0,57					0,50	0,90	0,95	0,92	0,51	0,90	0,95	0,93
1815-	4422	5604	6206	2089	2,28	4,03	4,26	4,15	9695	0664	0272	7388	1777	4343	4153	1176
1.CSV	1	5	4	9	551	8647	1089	8478	1	8	1	5	1	7	6	6
	0,21	0,40		0,51					0,41	0,78	0,91	0,98	0,41	0,78	0,91	0,98
1816-	7474	8243	0,47	3404	2,19	4,11	4,78	5,17	6521	1894	0287	3305	7284	3326	1954	5107
1.CSV	6	4	528	5	0783	2539	7849	1905	5	3	2	6	6	8	9	2
	0,31	0,55	0,59	0,59					0,51	0,89	0,96	0,96	0,51	0,90	0,96	0,97
1834-	4629	1161	0134	4808	2,28	4,00	4,28	4,32	2492	7773	1256	8869	4691	1625	5380	3026
1.CSV	4	6	7	6	6014	4595	7763	1723	3	9	2	4	2	9	6	5
	0,30	0,55	0,58	0,60					0,49	0,88	0,93	0,96	0,49	0,88	0,93	0,97
1835-	9408	6914	8730	9132	2,26	4,07	4,31	4,46	1946	5468	6055	8492	3682	8594	9359	1911
1.CSV	8	2	7	1	6721	994	3026	2487	1	6	4	7	6	2	5	4
	0,30	0,55	0,58	0,59					0,50	0,89	0,95	0,97		0,89	0,95	0,97
1836-	8560	0151	7644	8717	2,26	4,03	4,31	4,39	0572	2501	3325	1288	0,50	5771	6818	4847
1.CSV	7	2	4	3	5583	9442	4733	6034	8	1	6	9	2407	2	6	8

	0,31	0,57	0,59	0,58					0,50	0,90	0,93	0,92	0,50	0,90	0,93	0,92
1854-	8073	2331	0242	4604	2,28	4,12	4,24	4,20	3331	5679	4022	5101	5543	9660	8127	9167
1.CSV	1	1	1	5	9968	0499	945	8862	7	7	8	6	8	2	9	5
	0,31	0,55	0,58	0,58					0,51	0,90	0,95	0,95	0,51	0,90	0,95	0,95
1855-	5586	3823	3457	4479	2,28	4,00	4,22	4,23	4544	2976	1291	2959	6877	7070	5605	7280
CSV	2	7	1	7	4719	9464	3998	1401	4	4	9	1	6	9	5	3
	0,31	0,55	0,58	0,61					0,49	0,87	0,93	0,97	0,49	0,87	0,93	0,98
1856-	2786	1015	9142	7082	2,27	4,00	4,27	4,48	4844	1733	2053	6255	6929	5406	5980	0368
1.CSV	9	2	8	7	2242	2853	9831	2801	5	5	3	6	3	2	1	6
	0,31	0,56	0,59	0,60					0,49	0,88	0,92	0,95		0,88	0,93	0,95
1857-	5953	2548	1341	8201	2,28	4,07	4,27	4,40	5563	2340	7501	3945	0,49	5863	1204	7754
1.CSV	1	3	1	1	6224	0577	8921	0919	3	7	4	8	7542	8	9	8
	0,31	0,54	0,58	0,59					0,49	0,87	0,94	0,95	0,50	0,88	0,94	0,96
1858-	0318	5839	8429	5870	2,26	3,97	4,28	4,34	8467	6786	5198	7152	0547	0444	9142	1145
1.CSV	6	5	3	9	0407	5976	6207	0413	2	3	6	1	1	6	4	9
	0,31	0,56	0,58	0,57					0,49	0,90		0,90	0,50	0,91	0,93	0,91
1859-	3350	9060	6099	0182	2,27	4,13	4,25	4,14	9623	7340	0,93	9129	1707	1124	8406	2921
1.CSV	7	1	7	4	5885	3118	6877	1269	3	2	4509	6	1	5	7	4
	0,27	0,47	0,56	0,56					0,47	0,81	0,96	0,96	0,48	0,81		0,96
2217-	9215	2205	4644	0458	2,19	3,70	4,43	4,40	9615	1119	9904	2713	0294	2268	0,97	4076
1.CSV	4	8	9	4	2272	7544	3333	0463	2	6	5	4	4	2	1278	6
	0,29	0,50	0,57						0,48	0,84	0,95		0,48	0,84	0,95	
2218-	0076	7634	3552	0,57	2,20	3,85	4,35	4,37	1580	2766	2203	0,95	3141	5498	5290	0,95
1.CSV	3	3	6	5242	3765	6594	7388	0223	2	7	3	5008	5	9	3	8104
25%M	0,32		0,59	0,62					0,50	0,81	0,92		0,50	0,81	0,93	0,97
A-	0805	0,52	4986	0158	2,31	3,75	4,28	4,46	0286	3907	7864	0,96	2689	7816	2320	1764
1.CSV	1	1912	1	4	042	878	5056	6345	8	4	6	712	4	1	5	5
	0,31	0,52	0,59						0,48	0,79	0,90		0,48	0,79	0,90	
5%MA	8185	4559	4516		2,29	3,78	4,28		2025	4666	0645		2025	4666	0645	
-1.CSV	3	4	6	0	5865	4957	9733	0	6	1	7	0	6	1	7	0
50%M	0,31	0,51	0,59	0,62						0,80	0,93	0,98	0,50	0,81	0,93	0,98
A-	7423	4671	3419	5027	2,30	3,73	4,30	4,53	0,49	7260	0777	0354	0237	1085	5188	4999
1.CSV	3	1	7	4	1243	1242	215	1299	7878	8	8	5	1	9	2	9
75%M	0,31	0,54	0,59	0,63					0,50	0,85	0,93		0,50	0,85	0,93	
A-	9574	4117	3782	7742	2,30	3,91	4,27	4,59	1102	3192	1069		3170	6713	4912	1,00
1.CSV	4	2	7	8	2272	992	7719	4416	3	2	1	1	6	8	2	4128

	0,31	0,56	0,58	0,57					0,50	0,90		0,92	0,50	0,90	0,94	0,92
AP1-	2216	0718	6133	4488	2,26	4,06	4,24	4,16	1497	0652	0,94	2770	3653	4524	5523	6737
1.CSV	9	5	8	5	1864	214	6263	1898	6	6	1476	7	4	3	1	4
		0,56	0,59	0,62					0,50	0,88	0,93	0,98		0,88	0,93	0,98
AP10-	0,31	2349	4346	6766	2,29	4,04	4,27	4,50	1161	1010	1138	1928	0,50	4778	5121	6128
1.CSV	9892	9	9	3	8674	0924	0847	3806	4	1	5	6	3305	5	2	6
	0,31	0,59	0,59	0,60					0,49	0,91	0,91	0,93	0,49	0,91	0,91	0,93
AP11-	8971	2637	3605	7944	2,28	4,24	4,25	4,35	0372	1094	2582	4626	2354	4776	6270	8404
1.CSV	2	3	3	4	6665	8545	5484	828	2	4	5	9	1	7	9	4
	0,29	0,54	0,58	0,62					0,46	0,84	0,91	0,97	0,46	0,84	0,91	0,98
AP12-	8128	0532	6808	8075	2,23	4,04	4,38	4,69	4629	2412	4534	8847	6052	4993	7335	1846
1.CSV	4	4	9	6	0293	3712	9906	8621	2	8	1	7	7	5	8	4
		0,55	0,59	0,61					0,49	0,87	0,93	0,97	0,49	0,88	0,93	0,97
AP13-	0,31	4416	0087	6485	2,27	4,03	4,29	4,48	4772	6394	2782	4510	6900	0164	6794	8702
1.CSV	2998	3	8	7	8799	6458	6166	8358	1	6	3	9	5	5	8	9
	0,31	0,55		0,62					0,50	0,86	0,93	0,98	0,50	0,86		
AP14-	9910	1375	0,59	3847	2,30	3,97	4,27	4,50	4027	8706	3331	2888	3794	8304	0,93	0,98
1.CSV	6	2	2393	2	9174	9928	6002	3045	9	8	4	3	4	3	2899	2433
	0,31	0,54	0,58	0,58					0,51	0,89	0,95	0,94	0,51		0,96	0,95
AP2-	4160	9522	5879	1750	2,28	4,00	4,26	4,23	2810	6996	6342	9603	4988	0,90	0405	3637
1.CSV	4	5	4	8	9535	4805	9766	9678	5	8	9	7	7	0807	2	4
	0,29	0,55	0,58						0,47	0,88	0,93	0,94		0,88	0,93	0,94
AP3-	4876	1076	3729	0,59	2,21	4,13	4,38	4,43	1231	0656	2838	2953	0,47	3554	5907	6055
1.CSV	2	6	6	0059	4571	868	391	1444	6	8	4	2	2782	2	5	6
	0,17	0,45	0,52	0,51					0,31	0,79	0,92	0,90	0,31	0,79	0,92	0,90
AP4-	8521	5907	7390	7699	1,78	4,55	5,27	5,17	3095	9583	4950	7954	2656	8462	3654	6682
1.CSV	5	9	1	5	4902	828	2977	6088	6	1	4	8	8	5	1	3
	0,31	0,55	0,58	0,59					0,50	0,89	0,95	0,96	0,51	0,89	0,95	0,96
AP5-	5332	2074	9223	7964	2,28	3,99	4,26	4,32	9281	1633	1631	5748	1337	5232	5473	9646
1.CSV	8	4	7	2	054	2695	1364	4578	4	3	6	1	3	6	2	7
		0,57	0,58	0,56					0,49	0,90	0,92	0,89	0,49	0,90	0,93	
AP6-	0,31	1040	6564	2339	2,25	4,13	4,24	4,06	4282	4547	9138	0764	6099	7872	2553	0,89
1.CSV	204	3	4	1	7195	0717	3014	7776	2	6	4	7	1	6	8	4039
	0,31	0,55	0,58	0,59					0,50	0,89	0,94		0,50	0,90	0,94	0,96
AP7-	5473	9386	9131	9312	2,28	4,05	4,27	4,34	5939	7114	4817	0,96	7614	0085	7946	4327
1.CSV	4	7	6	4	8767	8363	4163	8025	3	3	6	1145	7	2	4	9
AP8-	0,30	0,55	0,58	0,59	2,24	4,16	4,34	4,46	0,48	0,90	0,94	0,96	0,48	0,90	0,94	0,97

1.CSV	0442	8053	2911	8534	1036	2595	801	4548	6858	4311	4592	9909	8262	6918	7315	2705
		6	1	6					5	4	2	7		3	3	8
	0,31	0,56	0,59	0,61					0,50	0,88		0,97		0,88	0,93	0,97
AP9-	7905	0609	0506	6680	2,29	4,04	4,26	4,45	1057	3589	0,93	1964	0,50	7016	4320	5734
1.CSV	2	4	5	5	6623	9975	5959	5046	7	4	0711	4	3001	4	6	1
GLUC	0,18	0,56	0,44	-				-	0,33	0,99	0,79	-	0,33	0,99	0,79	-
OSA-	7894	0653	9300	2,91	1,93	5,78	4,63	3,00	2377	1771	4791	5,15	2377	1771	4791	5,15
1.CSV	8	9	3	E-11	8457	4106	5303	E-10	3	2	7	E-11	3	2	7	E-11
JARRI	0,31	0,56								0,87	0,91			0,87	0,91	
S-	4375	0171	0,58		2,29	4,08	4,28		0,49	3901	6557		0,49	3901	6557	
1.CSV	7	7	7514	0	4553	8559	8125	0	0445	6	3	0	0445	6	3	0
		0,51	0,57						0,50	0,85	0,96	0,92	0,50	0,85	0,96	0,92
MA1-	0,30	4340	9867	0,55	2,22	3,76	4,24	4,08	2429	1977	0519	2290	4576	5618	4623	6231
1.CSV	3318	7	5	6789	2963	951	9744	0606	9	6	2	9	8	2	6	9
	0,30	0,62		0,55					0,46	0,94	0,88	0,85	0,46	0,94	0,88	0,85
MA2-	6503	0759	0,58	8977	2,25	4,56	4,27	4,11	6432	4662	3588	0644	8054	7949	6662	3603
1.CSV	2	5	0626	7	5532	8119	2779	3472	2	9	4	4	7	1	1	4
			0,57	0,57					0,52	0,82	0,96	0,95	0,52		0,96	0,96
MA3-	0,31	0,49	8982	3523	2,29	3,61	4,22	4,18	5046	6655	5099	5999	7327	0,83	9291	0152
1.CSV	4986	5927	5	2	8303	8544	4561	4727	8	4	8	7	4	0246	7	1
	0,31	0,52	0,58	0,60					0,51			0,97	0,51	0,84	0,95	0,98
MA4-	4834	0193	5962	3655	2,26	3,74	4,22	4,35	0453	0,84	0,95	8731	2783	7260	4381	3198
1.CSV	3	3	3	2	896	895	2937	0447	9	3411	0045	3	9	7	5	7
Desvia																
cion	0,03	0,03	0,02	0,17	0,09	0,33	0,18	1,32	0,04	0,04	0,02	0,28		0,04	0,02	0,28
Están	1885	6275	8891	7973	4759	4741	0763	6552	1306	2123	8247	5254	0,04	2518	8987	6298
dar	728	049	498	73	519	549	13	058	79	27	22	83	1821	2	42	64