



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTIMACIÓN DE LA CALIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ETANÓLICOS
DE PROPÓLEOS MEXICANOS POR RMN DE ^1H Y ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO

PRESENTA

ARMANDO ABDEEL MARTÍNEZ DE LA PEÑA



MÉXICO, D.F. 05 de Diciembre 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero

VOCAL: Dr. José Fausto Rivero Cruz

SECRETARIO: Dra. Nuria Esturau Escofet

1er. SUPLENTE: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

2° SUPLENTE: M. en C. Elizabeth Reyes López

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

EDIFICIO D, INSTITUTO DE QUÍMICA

ASESOR DEL TEMA

DRA. NURIA ESTURAU ESCOFET

SUSTENTANTE

ARMANDO ABDEEL MARTÍNEZ DE LA PEÑA



Tabla de contenido

Tabla de contenido.....	1
Lista de acrónimos y simbología.....	3
1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	5
1.1 Objetivos.....	9
1.2 Hipótesis.....	10
1.3 Organización de la tesis.....	10
2 ANTECEDENTES.....	12
2.1 Propóleos.....	12
2.2 Composición química de propóleos.....	13
2.3 Flavonoides.....	13
2.3.1 Actividad antioxidante.....	15
2.3.2 Análisis de flavonoides y contenido fenólico totales.....	16
2.3.3 Capacidad de atrapar radicales.....	16
2.4 Resonancia Magnética Nuclear.....	17
2.4.1 Resonancia Magnética Nuclear para el análisis de mezclas.....	18
2.5 Análisis quimiométrico.....	19
2.5.1 Análisis de Componentes Principales.....	20
2.5.2 Mínimos Cuadrados Parciales.....	21
3 METODOLOGÍA.....	22
3.1 Muestras de propóleo.....	22
3.2 Preparación del extracto.....	23
3.3 Preparación de muestras y equipo de RMN empleado.....	24
3.4 Puesta a punto de los experimentos de protón.....	24
3.4.1 Secuencia de pulsos.....	24
3.4.2 Ángulo de excitación.....	25
3.4.3 Optimización del tiempo de reciclado.....	30



3.4.4	Tiempo de adquisición de la FID	32
3.4.5	Parámetros de procesado.....	33
3.5	Procesado de datos para la aplicación quimiométrica	34
3.5.1	Supresión de la señal	34
3.5.2	Alineación.....	35
3.5.3	“Binning”	36
3.5.4	Normalización.....	38
3.6	Métodos quimiométricos	38
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
4.1	Espectros de los extractos de propóleo.....	39
4.2	Análisis de los espectros ^1H de propóleos.....	41
4.2.1	Perfiles de los espectros de ^1H	45
4.3	Análisis quimiométrico	46
4.3.1	Análisis clasificatorio PCA	46
4.3.2	Análisis de regresión PLS.....	55
5	CONCLUSIONES	59
6	BIBLIOGRAFÍA.....	60
	Apéndices	64
I.	Fundamentos Teóricos de la Resonancia Magnética Nuclear.....	64
II.	Fundamentos de Quimiometría.....	75
III.	Espectros de RMN	84
IV.	Gráficas de PLS	93



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS Y SIMBOLOGÍA

ACRÓNIMO	SIGNIFICADO
^1H	Protón
^1H RMN	Resonancia magnética de protón
ABTS	ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
DMSO- d_6	Hexadeuterodimetil sulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
FCR	Reactivo de Folin-Ciocalteu
FDR	Reactivo de Folin-Denis
FID	Caída Libre de la inducción
FRAP	Poder de reducción antioxidante del ión férrico
FTIR	Infrarrojo con Transformada de Fourier
GC	Cromatografía de gases
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas
Icoshift	Interval Correlation Optimized Shifting
mbar	Milibar
mg	miligramos
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitro
mm	Milímetros
MS	Espectroscopía de masas
-OCH ₃	Grupo metoxilo
-OH	Grupo hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCA	Análisis de Componentes Principales
PLS	Mínimos Cuadrados Parciales
PCs	Componentes Principales
PC1	Componente Principal primario



PC2	Componente Principal secundario
RF	Radiofrecuencia
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
UV	Ultravioleta

SÍMBOLO

SIGNIFICADO

°C	Grados centígrados
μs	Microsegundos
τ	Tiempo de espera variable
τ _{null}	Tiempo en el que la magnetización longitudinal pasa por el plano xy en su recuperación
<i>aq</i>	Tiempo de adquisición
<i>d1</i>	Tiempo de reciclado
dB	Decibeles
M _z	Vector magnetización en el eje z
M ₀	Vector magnetización en equilibrio
<i>nt</i>	Número de escaneos
S/N	Relación señal a ruido
T _r	Tiempo de repetición
ppm	Partes por millón
<i>p1</i>	Pulso de radiofrecuencia
T ₁	Tiempo de relajación longitudinal o espín-red



1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Actualmente el interés por el consumo humano de hierbas medicinales y productos vegetales y naturales ha estimulado de manera considerable la investigación relacionada con el establecimiento de los métodos de análisis para determinar la identidad, la pureza, la calidad y la potencia de las drogas crudas y los productos herbolarios derivados de éstas. El trabajo de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para elaborar las normas modelo en este campo, ha sido útil para fortalecer el reconocimiento de la función de las plantas medicinales en la atención primaria de la salud.¹ No obstante, hay muy poca investigación sobre las plantas enteras y sus extractos dificultando con ello el proceso de aprobación de los medicamentos.

Según la OMS los sectores de la población de bajos recursos de los países en vías de desarrollo dependen aún de la medicina tradicional como alternativa para la atención primaria de la salud. Además, aun en las clases sociales menos necesitadas, el auge en el consumo de productos herbolarios a nivel mundial, se debe a la preocupación del público por los efectos secundarios, cada vez más frecuentes, de los medicamentos ortodoxos. De manera general, los productos elaborados con las plantas medicinales tienen una amplia aceptación en los distintos sectores de la sociedad. No obstante, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, siguen apareciendo reacciones adversas por el consumo de suplementos dietéticos elaborados a base de productos naturales y los informes en la literatura señalan la mala calidad de una gran parte de los productos de origen natural que están disponibles en el mercado. Realizar el control de calidad en productos elaborados a partir de productos naturales no es tarea fácil, por lo complejo de la matriz y por la gran cantidad de componentes que presentan este tipo de muestras. Por ello surge el interés en desarrollar herramientas para el control de calidad de productos elaborados con plantas.¹ La presente tesis aborda



el estudio del propóleo, ya que es uno de los productos naturales que ha incrementado notablemente su consumo en México y en el mundo.

El propóleo es un conjunto de sustancias resinosas, gomosas y balsámicas, de consistencia viscosa, elaborada por las abejas a partir de materiales de origen vegetal que recolectan de la corteza, de la savia y de los brotes de algunos árboles y plantas. Esta resina es procesada en sus mandíbulas por enzimas salivales y mezclada con cera de la colmena. Lo utilizan para sellar agujeros y fisuras en la colmena, mantener la temperatura adecuada dentro de ésta, para defenderse de los depredadores y para embalsamar cadáveres de intrusos. El contenido de cada propóleo depende de la flora local, la época del año, la región donde las abejas hacen sus colectas, e incluso los contaminantes del ambiente.²

Desde tiempos ancestrales el propóleo ya era muy conocido, los egipcios lo utilizaron como agente antiputrefactivo para embalsamar cadáveres, los griegos como antiséptico y desinfectante y los incas como antipirético. Gracias a que los propóleos actúan como agentes antioxidantes, antiinflamatorios, antitrombóticos, antimicrobianos, antialérgicos, antifúngicos, antitumorales, y antivirales,^{3,4} tradicionalmente se han utilizado para tratar resfriados comunes, gripe, sinusitis, laringitis, bronquitis, neumonía y tuberculosis.^{3,5} De entre todas las actividades biológicas es de gran interés sus efectos antioxidantes, que se atribuyen a la presencia de flavonoides y ácidos fenólicos, los cuales han sido blanco de un sin número de estudios de corte clínico y nutricional, así como en su caracterización.⁶

La mayoría de los productos naturales como el propóleo han sido autenticados tradicionalmente por medios morfológicos e histológicos. Sin embargo, este enfoque puede no ser fiable, muchos de ellos son morfológicamente similares y los productos comerciales elaborados a base de productos naturales se preparan de diversas maneras que hacen más difícil su identificación a través de una inspección sensorial.⁷ Actualmente, es una práctica común entre los analistas de productos naturales la selección de uno o más compuestos como marcadores



para la identificación y evaluación de la calidad.⁸ Sin embargo, es reconocido que este tipo de determinaciones no proporciona por sí una idea completa de un producto farmacéutico a base de plantas, ya que son múltiples los constituyentes responsables de sus efectos terapéuticos y a veces la selección de marcadores adecuados es difícil y subjetiva.⁹ Estos constituyentes en el caso del propóleo pueden trabajar sinérgicamente y variar dependiendo no únicamente de la zona de recolección, sino también de las condiciones de recolección, de la época de recolección, de los métodos de proceso y secado y del tiempo de almacenaje, entre otros factores.⁷ Por otra parte, algunos productores sin escrúpulos continuamente están tratando de desarrollar maneras de hacer el perfil químico de sus productos similar al perfil auténtico. En estas circunstancias específicas, el uso de compuestos marcadores es incapaz de confirmar la identidad de un producto natural como el propóleo.

En general, la caracterización completa de productos naturales es un proceso largo que consume tiempo. El procedimiento puede consistir en la extracción de la muestra en un disolvente en particular, la separación de los diferentes compuestos en una columna cromatográfica, y la elucidación de las estructuras aisladas mediante espectrometría de masas (MS) y/o resonancia magnética nuclear (RMN). El establecimiento de “**huellas digitales**” (también llamadas “**huellas dactilares**” o “**huellas metabólicas**”) para los productos naturales es un enfoque relativamente reciente adoptado por los investigadores para hacer frente a la complejidad química y a los problemas relacionados con el uso de pocos compuestos marcadores. La huella digital metabólica de un producto natural como el propóleo podría ser un espectro o un cromatograma obtenido por un procedimiento definido para caracterizar la composición química de una muestra; se supone que es una característica única para la identificación de las plantas, extractos de plantas o preparados en cuestión.⁹⁻¹¹ Así pues, el perfil cromatográfico o el perfil espectroscópico de un producto natural, es una herramienta para llevar a cabo el control de calidad de los productos de uso farmacéutico a base de propóleos o plantas medicinales.¹²⁻¹⁶



Desde hace algunos años la RMN se ha utilizado para el análisis directo de las mezclas, lo que aporta información estructural y de composición en poco tiempo, tiene la ventaja de que es una técnica no destructiva y no requiere un tratamiento complejo previo a la obtención de un espectro.^{17,18} Con lo que respecta al análisis de una mezcla tan compleja como los propóleos, la RMN es una técnica de análisis capaz de detectar ceras, terpenos y compuestos fenólicos simultáneamente,¹⁸ siendo su principal limitación la sensibilidad de la técnica.

Las huellas digitales han de ser capaces de demostrar las semejanzas y diferencias entre varias muestras de una planta medicinal en particular, incluso si el número y/o la concentración de los componentes químicamente característicos no son exactamente iguales entre ellas, de tal manera que, al analizar la huella digital se consideran los múltiples constituyentes y no solamente uno o dos marcadores durante el proceso de evaluación de la calidad de estos productos.¹⁹⁻²² Sin embargo, en cualquier producto natural, ya sea de flora o fauna, existen cientos de componentes desconocidos y muchos de ellos se encuentran en baja concentración. Además, normalmente existen variabilidades entre muestras del mismo producto; en consecuencia, obtener huellas digitales confiables que representen componentes químicamente característicos de un producto fitoterapéutico no es tarea fácil.

Al emplear técnicas espectroscópicas como la RMN para el control de calidad de productos naturales de plantas con gran cantidad de componentes, surge la dificultad del análisis de espectros con una muy alta complejidad. Es en este punto cuando la quimiometría interviene para realizar análisis en los que se involucran múltiples variables y se quiere obtener información que relacione dichas variables con el comportamiento de las muestras. La quimiometría es un campo interdisciplinario que involucra el análisis multivariable mediante modelos matemáticos, la informática y la química analítica para extraer información. Si se usa correctamente la quimiometría puede ayudar a tomar en cuenta las variables



importantes para el análisis de los datos y proveer un modelo matemático que se ajuste lo mejor posible a la variabilidad de los datos experimentales, de lo contrario proporcionará información errónea. La quimiometría se ha utilizado ampliamente en el estudio de muestras complejas donde la cantidad de variables excede la percepción del hombre y por lo cual necesita de una computadora para manejar tantas dimensiones como variables haya en la muestra. El uso de la quimiometría se ha expandido a matrices muy diversas como los alimentos²³ o los aceites en la industria petroquímica.²⁴ Los analistas hoy en día usan diferentes tipos de técnicas quimiométricas para poder correlacionar grandes cantidades de datos químicos con propiedades moleculares relevantes.

En el presente trabajo se mostrará el análisis de 16 muestras de propóleos recolectados en apiarios mexicanos y el uso de métodos quimiométricos para correlacionar la región geográfica y la actividad antioxidante con la huella digital del espectro de protón por RMN (¹H-RMN). Cabe mencionar que los datos de actividad antioxidante (mediante los ensayos de FRAP, ABTS, DPPH, flavonoides totales y fenoles totales) son los reportados en las tesis de Hernández²⁵ y Granados²⁶ quienes trabajaron con los mismos propóleos.

1.1 Objetivos

El objetivo general consiste en realizar la extracción etanólica y obtener la huella digital por ¹H-RMN de propóleos mexicanos para buscar una correlación entre el perfil espectroscópico obtenido con la calidad antioxidante de los mismos.

Los objetivos específicos son:

- Preparar los extractos etanólicos de cada uno de los propóleos.
- Optimizar los experimentos de RMN-¹H para analizar los extractos y obtener “la huella digital metabólica”
- Establecer diferencias en el perfil espectroscópico de los extractos.



- Realizar el análisis quimiométrico de todas las muestras por técnicas de reconocimiento de pautas, con el fin de clasificar las muestras por su origen, y de regresión multivariable, con el fin de establecer relaciones cuantitativas entre regiones espectrales y contenido de compuestos. Así como, hallar correlaciones entre la información obtenida de los espectros de ^1H -RMN de cada propóleo con su respectiva actividad antioxidante.

1.2 Hipótesis

El análisis quimiométrico de la huella digital de ^1H RMN de propóleos proporcionará información sobre la existencia de una correlación intrínseca entre la actividad antioxidante y una región específica de dichos espectros.

1.3 Organización de la tesis

La tesis está dividida en 5 capítulos y 3 apéndices.

En el presente capítulo, *Introducción*, se indica el propósito de la investigación, la importancia del análisis de la huella digital metabólica de los productos naturales, se explica qué es el propóleo, se mencionan sus principales aplicaciones y se plantean los objetivos y la hipótesis de este trabajo.

En el capítulo 2, *Antecedentes*, se presentan los trabajos encontrados en la literatura donde se indica la composición química de los propóleos y su actividad antioxidante, los trabajos que utilizan la RMN como técnica de análisis y los estudios quimiométricos. En este capítulo se da una muy breve descripción de la técnica de RMN y del análisis quimiométrico por lo que se hace referencia al Apéndice I, *Fundamentos Teóricos de la Resonancia Magnética Nuclear*, donde se da un resumen de las bases físicas fundamentales para entender el funcionamiento de esta espectroscopia, y al Apéndice II *Fundamentos de*



Quimiometría, donde se expone un marco teórico de las bases de la quimiometría para conocer su aplicación en muestras complejas.

En el capítulo 3, *Metodología*, se describe el método utilizado para la obtención de los extractos etanólicos de los propóleos, la optimización de los principales parámetros para la adquisición de los espectros de RMN, el procesado tradicional de los espectros y el requerido para el posterior análisis con las técnicas quimiométricas. Es importante mencionar que en este capítulo se muestran algunos de los resultados obtenidos de la optimización de los parámetros de adquisición, del tratamiento de los espectros y su pretratamiento para el análisis quimiométrico.

El capítulo 4, *Resultados*, se discute la elección del tipo de extracción usada; se analiza mediante inspección visual los espectros ^1H RMN, se interpretan las gráficas obtenidas por las técnicas quimiométricas PCA (Análisis de Componentes Principales) y PLS (Mínimos Cuadrados Parciales). En este capítulo se hace referencia al *Apéndice III Espectros de ^1H RMN*, donde se muestran los espectros de ^1H -RMN obtenidos y que se utilizaron en la parte quimiométrica.

Finalmente, en el capítulo 5, se describen las conclusiones acorde a los resultados obtenidos del análisis espectroscópico y quimiométrico.



2 ANTECEDENTES

El estudio de productos elaborados con productos naturales como el propóleo no es tarea fácil, por lo complejo de la matriz y por la gran cantidad de componentes que presentan este tipo de muestras. El análisis por RMN permite obtener espectros de alta complejidad, por lo que para poder tratarlos es imprescindible aplicar herramientas quimiométricas. En el presente capítulo se exponen los antecedentes encontrados en la literatura sobre estos temas. Es de mencionar que a la fecha no se encontró nada reportado que correlacione la información obtenida de las huellas digitales de los propóleos con la actividad biológica de los mismos utilizando el método de PLS.

2.1 Propóleos

El propóleo es una sustancia resinosa de consistencia viscosa, de color verde pardo, castaño, rojo o incluso casi negro; dependiendo de su origen botánico (**Figura 1**). Se caracteriza por su sabor amargo, olor agradable y dulce en muchos casos, de forma que cuando se quema se produce una fragancia de resina aromática. A temperaturas bajas es duro y quebradizo, mientras que a temperaturas altas es suave y pegajoso.²



Figura 1.- Muestra de propóleo.



2.2 Composición química de propóleos

La composición química del propóleo es altamente variable, ya que ésta depende de los diferentes ecosistemas donde las abejas recolectan, el tipo de flora, de la temporada de recolección y de la especie de abeja.^{27,28} Una composición representativa del propóleo pudiera ser: resinas y bálsamos (50%), ceras (30%), aceites esenciales (10%), polen (5%) y otros componentes (5%).²⁹ También poseen ácidos grasos saturados de origen vegetal.^{27,30} En general los propóleos contienen más de 300 compuestos, de entre los cuales los polifenoles son los más comunes y pueden llegar hasta el 50% del peso total de los propóleos de zonas templadas, como los flavonoides, los ácidos fenólicos y sus esteres, cetonas, aldehídos fenólicos, alcoholes aromáticos, terpenos, sesquiterpenos, estilbenterpenos, quinonas, cumarinas y esteroides³¹.

Existen publicados diversos estudios donde se determina la composición de los propóleos de acuerdo a su origen geográfico. Algunos ejemplos en América son las determinaciones realizadas en Brasil,^{3,32-35} Cuba,^{28,36,37} Chile,³⁸ Honduras,³⁹ Uruguay,⁴⁰ Venezuela,⁴¹ en algunos ambientes áridos^{24,25} y México (Yucatán y Sonora).^{42,43} En Europa, también la diversidad de flora ha contribuido al aumento en el número de investigaciones sobre este producto natural.⁴⁴⁻⁴⁶ Hay que destacar la flora en Nueva Zelanda, única y rara debido a su aislamiento geográfico, por esta razón hubo interés en estudiar la composición de los propóleos de la isla⁴⁷

2.3 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos que se encuentran con mayor frecuencia en las flores, frutas, plantas y árboles. Son compuestos polifenólicos cuya estructura base está dada por dos anillos fenilos (A y B), ligados mediante un anillo pirano (C). Lo cual deja un esqueleto de difenilpiranos: C₆-C₃-C₆ (**Figura 2**), a los cuales se le puede añadir cualquier grupo funcional como un grupo hidroxilo (-OH) o también un grupo metoxilo (-OCH₃).

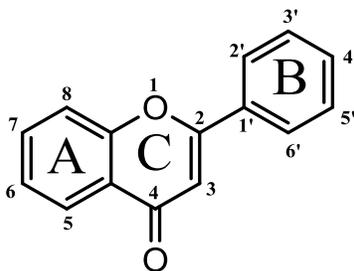


Figura 2. Estructura base de flavonoide con numeración y especificación de cada heterociclo.

Las estructuras de algunos de los flavonoides más comunes encontrados en los propóleos se muestran en la **Figura 3**.

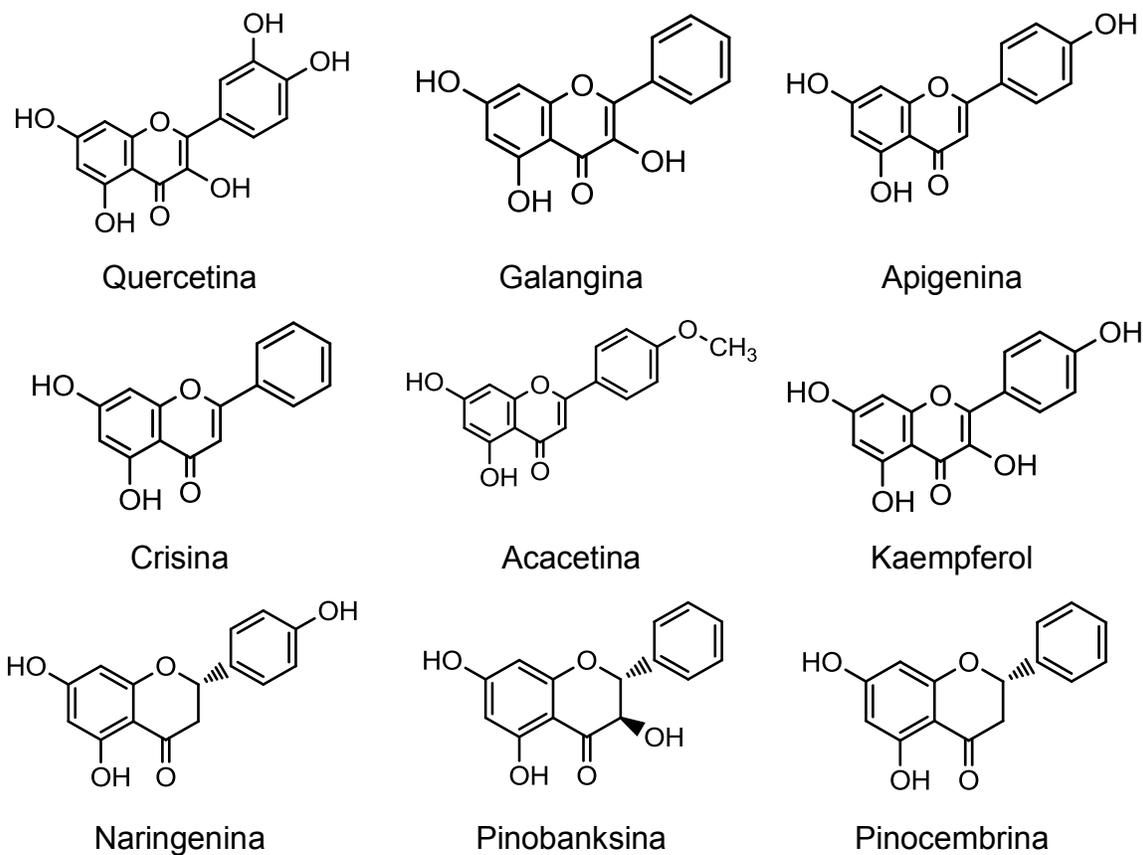
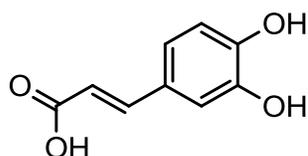


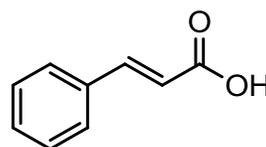
Figura 3. Estructura y nombre común de algunos flavonoides más usuales encontrados en los propóleos.



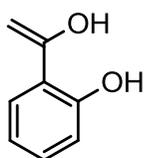
Además de los flavonoides, los compuestos fenólicos y aromáticos también representan un grupo de productos activos farmacológicamente importantes presentes en los propóleos (**Figura 4**).



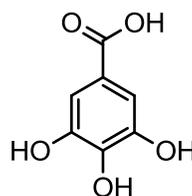
Ácido caféico



Ácido cinámico



Ácido salicílico



Ácido gálico

Figura 4. Estructura y nombre común de algunos compuestos aromáticos y fenólicos más comunes encontrados en propóleos.

2.3.1 Actividad antioxidante

Un antioxidante biológico es definido como cualquier sustancia que cuando está presente en bajas concentraciones reduce o previene significativamente la oxidación de un sustrato.⁴⁸ Es así como los radicales libres y las especies oxigenadas reactivas usualmente son removidos o inactivados *in vivo* por enzimas antioxidantes y por compuestos de bajo peso molecular como el tocoferol, el ácido ascórbico y los polifenoles, reduciendo de esta forma los posibles daños inducidos por el estrés oxidativo. Por ello, el consumo de alimentos antioxidantes tales como vitaminas C y E, carotenoides, flavonoides, taninos y otros compuestos fenólicos está asociado con la disminución de enfermedades crónicas.⁴⁹



2.3.2 Análisis de flavonoides y contenido fenólico totales

El análisis de flavonoides y ácidos fenólicos en propóleos se puede realizar por métodos como la colorimetría,⁵⁰ la cromatografía de capa fina,⁵¹ la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas,⁵² la cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas⁵³ (HPLC-MS), la electroforesis capilar⁵⁴ y la RMN.⁴⁶ Esta última con la ventaja de ser una técnica no destructiva, de simplicidad en la preparación de la muestra y los procedimientos de medida, y capaz de la detección simultánea de una gran cantidad de componentes en mezclas complejas.

La determinación del contenido fenólico total en extractos de plantas se puede realizar gracias al uso de técnicas electroquímicas⁵⁵, espectrométricas⁵⁶ y cromatográficas⁵⁷. Los métodos espectrofotométricos más comunes para la determinación de compuestos fenólicos, son el método de Folin-Ciocalteu (FCR) y de Folin-Denis (FDR), que se basan en una reacción colorimétrica de óxido-reducción que mide la cantidad de sustancia necesaria para inhibir la oxidación del reactivo. Sin embargo, estos reactivos no sólo miden los fenoles totales, sino que reaccionarán con cualquier sustancia reductora como las aminas aromáticas, los ácidos orgánicos y los azúcares. En consecuencia, el reactivo mide la capacidad reductora total de una muestra, no sólo el nivel de compuestos fenólicos.

2.3.3 Capacidad de atrapar radicales

La actividad antioxidante de los propóleos también se puede estimar por métodos ya estandarizados indirectos o directos. En los métodos indirectos se determina la capacidad de un antioxidante de atrapar radicales libres utilizando radicales libres estables, que presenten una fuerte absorción en la región del visible. Los métodos más utilizados son los que cuantifican la capacidad captadora de radicales libres que tiene un compuesto; como por ejemplo el método DPPH emplea el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo en forma de radical, del cual se determina la capacidad antioxidante mediante la cuantificación de la decoloración de la muestra;⁵⁸ el



método ABTS el cual usa el ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico como radical catiónico que es verde-azulado y es oxidado por grupos peroxilo e hidroxilo, este método tiene la ventaja de poder realizarse tanto en muestras hidrosolubles como liposolubles; el método FRAP, evalúa la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo a su capacidad para reducir el Fe^{3+} presente en un complejo con el TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina), hasta la forma ferrosa (Fe^{2+}).⁴⁸ Los métodos directos se basan en el estudio del efecto de las sustancias que contienen antioxidantes en la degradación oxidativa de un sistema de prueba (lípidos, proteínas, ADN, sangre, plasma, membranas biológicas)⁵⁹.

2.4 Resonancia Magnética Nuclear

Desde su descubrimiento, la RMN siempre ha estado ligada a la elucidación de estructuras en disolución, primero únicamente en el estudio de los protones y después ampliándose a más núcleos. Por ello, esta técnica era anteriormente casi exclusiva de los químicos sintéticos; sin embargo, con el desarrollo tanto de imanes y materiales superconductores como de la informática, se consiguió ampliar su campo de aplicación hasta ser una de las técnicas más versátiles que posee un químico. En la actualidad es habitual encontrar en diversas revistas de investigación estudios en los que se utiliza la RMN como herramienta tanto de análisis estructural molecular como para el estudio de las interacciones moleculares, la configuración relativa, la cinética o la dinámica molecular y la composición de mezclas de compuestos sintéticos o biológicos. Dado que esta técnica es ya muy conocida, las bases necesarias para entender el funcionamiento general de esta técnica se encuentran en el Apéndice I, *Fundamentos Teóricos de la Resonancia Magnética Nuclear*, mientras que en el presente capítulo sólo se revisan los antecedentes existentes del uso de la RMN enfocados al análisis de mezclas.



2.4.1 Resonancia Magnética Nuclear para el análisis de mezclas.

En los últimos años, en el campo del análisis de mezclas complejas, como los productos alimenticios, el número de trabajos y publicaciones relacionadas con la RMN no ha parado de crecer. Principalmente porque la RMN es una técnica no destructiva, permite realizar mediciones rápidas sin necesidad de realizar un tratamiento previo a la muestra y sin utilizar reacciones químicas de derivatización, lo que representa un método simple para obtener información global. En el caso concreto del análisis de extractos totales mediante la RMN, no se busca la caracterización exhaustiva de un metabolito en particular sino señales o grupos de señales características de determinados tipos de productos naturales.

El método puede indicar la presencia de metabolitos con estructura alifática o aromática, según sus señales características (entre 0-4 ppm ó 6-9 ppm, respectivamente).

2.4.1.1 Resonancia Magnética Nuclear para el análisis de propóleos.

En el análisis de extractos de propóleos, la RMN ya ha sido empleada para determinar similitudes y/o diferencias químicas entre muestras. En la **Tabla 1** se enlistan las publicaciones encontradas en la literatura, donde se utilizó la RMN para el análisis de propóleos, obteniendo información importante como la clasificación según el origen geográfico o su método de recolección. También se demuestra que es un método con potencial para utilizarla como herramienta de control de calidad. La región estudiada en dichas publicaciones es la región aromática de los espectros ^1H RMN.

**Tabla 1. Aplicaciones del estudio de propóleos que utilizan ^1H -RMN**

Aplicación	Ref.
Desarrollo de un método por HPLC y RMN- ^1H para el control de calidad de propóleos y su composición dependiendo del origen geográfico.	18
Caracterización de propóleos cubanos según área de recolección: propóleo café (primordialmente benzofenonas poliisopreniladas), propóleo rojo (esencialmente isoflavonoides) y propóleo amarillo (principalmente compuestos alifáticos), mediante RMN, HPLC-DAD y HPLC-IES/EM.	28
Estudios químicos en propóleos pardos para la determinación de benzofenonas isopreniladas utilizando técnicas de RMN de alto campo en 2D y NOE.	31
Desarrollo de métodos y modelos adecuados para la clasificación de propóleos de acuerdo a los métodos de cosecha utilizando ^1H -NMR y análisis estadístico multivariable.	60
Estudio de correlaciones entre el contenido de fenoles y actividades antioxidante y antimicrobiana, de propóleos de Brasil. Así como, el estudio la correlación entre la composición de los propóleos y las variables biogeográficas (flora local, clima, efectos estacionales).	61

2.5 Análisis quimiométrico

La quimiometría es una disciplina que trata todos aquellos procesos que transforman señales analíticas y datos más o menos complejos en información. La quimiometría utiliza métodos de origen matemático y estadístico con ciertos objetivos como seleccionar diseños analíticos y experimentos óptimos de medida y proveer información relevante analizando los datos químicos. La única manera de extraer y representar esta información es a través de modelos matemáticos o estadísticos. Las relaciones que se pueden encontrar entre las variables químicas macroscópicas y las variables químicas microscópicas son aproximadas y sólo son válidas con ciertos intervalos de las variables.

La quimiometría es una disciplina que se desarrolló en el primer tercio del siglo XX pero hasta principios de la década de los 1980-1990, gracias a la evolución de la



instrumentación analítica y de las computadoras acopladas a dichos sistemas, se empezó a utilizar ampliamente. Hoy en día existen muchos libros donde se detalla su finalidad, su posición entre las ciencias experimentales, y sus principales áreas de trabajo.⁶² En el Apéndice II, *Fundamentos de Quimiometría*, se da una breve descripción del fundamento de Reconocimiento de Patrones y del Análisis Exploratorio de Datos, por ser el área donde se desarrolla esta tesis, mientras que en el presente capítulo sólo se exponen las 2 técnicas utilizadas en la misma: el modelaje multivariante por PCA y PLS.

2.5.1 Análisis de Componentes Principales

El PCA se concibe como una técnica de reducción de la dimensión de datos en forma de vectores, pues permite pasar de una gran cantidad de variables interrelacionadas a unos pocos componentes principales (PCs). El método consiste en buscar combinaciones lineales entre las variables originales que representen lo mejor posible a la variabilidad existente entre los datos. De este modo, con unas pocas combinaciones lineales, que son los PCs, es suficiente para entender la información contenida en los datos. Al mismo tiempo, la forma en que se construyen los componentes, y su relación con unas u otras variables originales, sirven para entender la correlación inherente de los datos, es decir, es una manera de resaltar las similitudes y las diferencias entre muestras. Uno de los principales objetivos de este método es eliminar los PCs asociados con el ruido, lo que minimiza los efectos en la medición del error. Otro punto importante es que los PCs que forman un vector aleatorio de dimensión menor, pueden ser empleados en análisis estadísticos posteriores como el PLS.

2.5.1.1 Análisis de Componentes Principales a extractos de propóleo

El PCA se ha empleado para determinar, para clasificar entre muestras y clasificar según el origen geográfico o método de recolección. Además de algunas aplicaciones mostradas en la **Tabla 1** que utilizan el análisis por PCA para clasificar propóleos de acuerdo a su origen, en la **Tabla 2** se muestran otras más



que también usan PCA en muestras de propóleo estudiadas con diferentes técnicas instrumentales como GC-MS, FT-IR y UV-visible.

Tabla 2.- Aplicaciones del estudio de PCA en muestras de propóleo

Aplicación	Ref.
Aplicación de PCA a muestras de propóleos obtenidas de diferentes orígenes geográficos. Recolectados de Europa, Asia, África, Islas Salomón y Brasil.	18
Identificación geográfica de los propóleos usando un sistema acoplado GC-MS y PCA mediante los compuestos volátiles que contribuyen a la diferenciación de las regiones.	63
Evaluación rápida y efectiva de la capacidad antioxidante de los extractos de propóleos usando DPPH con FT-IR y UV-visible con un mapeo de PCA.	64

2.5.2 Mínimos Cuadrados Parciales

El método de mínimos cuadrados parciales ha sido el método de calibración multivariante que más se aplica. En este caso, los componentes de la matriz son extraídos a fin de maximizar la covarianza con los datos medidos en el conjunto de muestras de calibración. Las relaciones se desarrollan a partir del conjunto de entrenamiento y después se aplican al conjunto de incógnitas. Para los datos de muestras desconocidas, las concentraciones de los diversos constituyentes en las muestras a menudo se pueden predecir con mayor precisión. El PLS es de particular interés en la Química Analítica porque puede analizar datos fuertemente correlacionados, con exceso de ruido y con numerosas variables X , e incluso modelar simultáneamente distintas variables de respuesta, Y .⁶⁵

Hasta la fecha no se ha reportado en la bibliografía el uso de PLS junto con RMN para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos de propóleo.



3 METODOLOGÍA

Hoy en día la técnica de RMN se ha convertido en una técnica rutinaria donde con poco más que pulsar un botón se obtienen los datos. Sin embargo, se debe tener cuidado cuando se utiliza tal enfoque de “caja negra”. Los parámetros estándar utilizados por default en los experimentos pueden ser adecuados para una muestra, pero no para todas y el ajuste incorrecto de un parámetro puede significar la diferencia entre conseguir un buen espectro o no. Un espectro tan sencillo como el de un protón puede servir o no para obtener información cuantitativa si los parámetros están bien definidos. En el presente capítulo se explica a detalle la metodología utilizada para la extracción de las muestras, la obtención de los espectros de RMN, su procesamiento junto con sus resultados y por último el análisis quimiométrico.

3.1 Muestras de propóleo.

En la **Tabla 3** se enlistan las muestras de propóleo estudiadas en esta tesis, mismas que fueron proporcionadas por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional Autónoma de México y que fueron recolectadas en distintas localidades del Distrito Federal, Zacatecas Puebla y Durango a lo largo del año, conservadas a -80°C en bolsas de celofán y en recipientes herméticos individuales para evitar su contaminación.

**Tabla 3. Apiarios donde se recolectaron las muestras de propóleos**

Apiario	Ubicación
Acuexcómatl	Delegación Xochimilco, D.F. Poblado de San Luis Tlaxialtemalco.
Bonilla	Delegación Milpa Alta, D.F. Poblado de San Pablo Oztotepec.
Búho	Delegación Milpa Alta, D.F. Poblado de San Pablo Oztotepec.
Don Nico	Delegación Tlalpan, D.F. Poblado de Topilejo
Panteón	Delegación Milpa Alta, D.F. Poblado de San Oztotepec
Trojes	Delegación Tlalpan, D.F. Poblado de San Antonio Tecomiltl.
Tepenáhuatl	Delegación Milpa Alta, D.F. Poblado de San Pablo Oztotepec.
Valentín	Delegación Milpa Alta, D.F. Poblado de San Pablo Oztotepec.
Álamo Blanco	Puebla
Durango	Durango
Zacatecas	Zacatecas

3.2 Preparación del extracto

Las muestras de propóleo fueron congeladas. Para cada extracción se tomaron 3 gramos de cada propóleo congelado y se molieron en un mortero.

El disolvente seleccionado para la extracción de los propóleos fue el etanol. Se realizó un estudio comparativo preliminar entre el método continuo de Soxhlet y la extracción por maceración. Las condiciones de las 2 formas de extracción realizadas fueron las siguientes:

- Soxhlet con 120 mL de etanol durante 2 horas con un total de 7 sifones.
- Extracción simple con 120 mL de etanol durante 24 horas en refrigeración a 4°C.

Posteriormente, para eliminar el disolvente de extracción se utilizó un rotaevaporador acoplado a un sistema de alto vacío. La temperatura utilizada fue de 45°C con una presión de 30 mbar por 2 horas.



3.3 Preparación de muestras y equipo de RMN empleado

Se pesaron 20 mg de cada extracto y se disolvieron en 0.8 mL de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) con 99.9% de deuteración. Se utilizó DMSO- d_6 por su alta capacidad disolvente y porque es una molécula aprótica lo que permite la observación de los protones hidroxilo. Esta disolución se transfirió a un tubo de RMN de 5 mm de diámetro.

Se utilizó un espectrómetro Bruker Avance III 400 MHz (campo magnético de 9.4 Teslas) con el software Topspin v. 2.1, equipado con una sonda de detección indirecta BBI H-BB Z-GRD preparada para tubos de RMN de 5 mm.

3.4 Puesta a punto de los experimentos de protón

Se optimizaron los parámetros de adquisición y procesado para la obtención de los espectros de protón. Los pasos realizados se detallan a continuación:

3.4.1 Secuencia de pulsos

El conjunto de pulsos de radiofrecuencia y tiempos de espera, que se aplican a una muestra para producir una forma específica de señal de RMN, se denomina secuencia de pulsos.

La secuencia utilizada en el presente trabajo es la secuencia de pulsos más simple utilizada para la rutina de ^1H (**Figura 5**), consiste en la aplicación de un pulso de radiofrecuencia, $p1$, que produce la excitación rotando la magnetización al *plano xy*, seguido de un tiempo de adquisición, aq , durante el que se registra la FID (Caída Libre de la Inducción) y, finalmente, un tiempo denominado tiempo de reciclado o de retardo, $d1$, previo a la siguiente acumulación, necesario para que la magnetización regrese a su posición de equilibrio térmico. Esta secuencia de pulso se puede repetir muchas veces con el fin de mejorar la relación señal a ruido (S/N), la cual aumenta como la raíz cuadrada del número de exploraciones, nt .

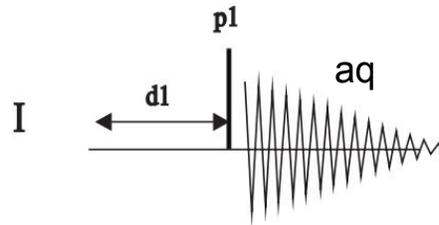


Figura 5. Representación esquemática de la secuencia de RMN de un pulso de radiofrecuencia simple, $p1$, con tiempo de reciclado, $d1$, y un tiempo de adquisición, aq .

3.4.2 Ángulo de excitación

Antes de aplicar un pulso de radiofrecuencia, una ligera mayoría de los espines nucleares están alineados en el eje z paralelos al campo magnético estático. La aplicación de un pulso de radiofrecuencia a la frecuencia apropiada rotará la magnetización un ángulo específico. Los pulsos son descritos según este ángulo de rotación. La cantidad de rotación depende de la potencia (en dB) y tiempo del pulso (en μs). La señal máxima se obtendrá con un pulso de 90° . Por lo tanto, un pulso de 90° es la cantidad de tiempo que se aplica el pulso a una potencia dada para voltear la magnetización al *plano* xy . El método para medir el pulso 90° se explica en la sección 3.4.2.1 Calibración del pulso de 90° . A manera de ejemplo, la **Figura 6** muestra el vector de magnetización en un campo magnético antes y después de haberle aplicado un pulso de 30° con un tiempo determinado.

En el presente trabajo se utilizó un ángulo de excitación de 30° , las razones de esto se discuten en la sección 3.4.3 Optimización del tiempo de reciclado.

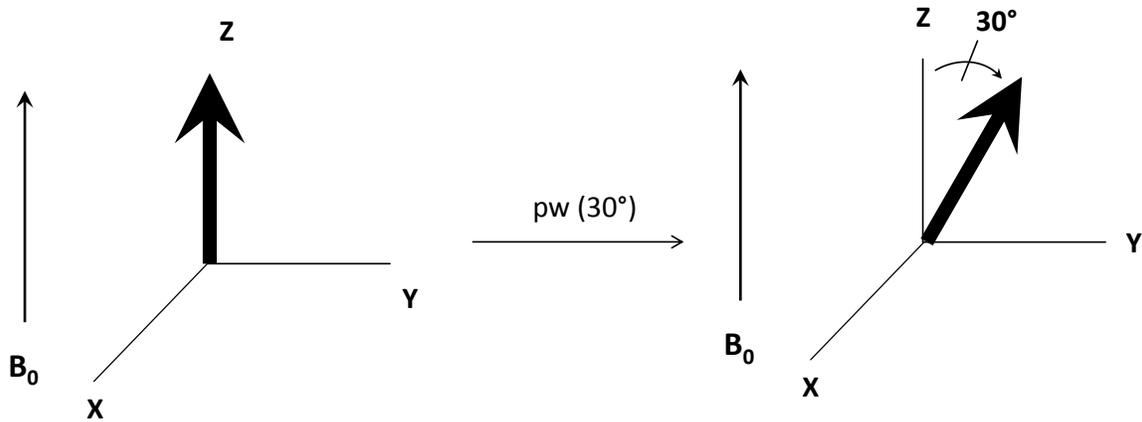


Figura 6.- El vector de la magnetización nuclear de espín expuesto a un campo magnético B_0 antes y después de aplicar un pulso de 30° .

3.4.2.1 Calibración del pulso de 90°

La calibración del pulso para conocer la duración que produce un ángulo de 90° se realizó con la secuencia de la **Figura 5**. Variando la duración del pulso p_1 , en distintos experimentos para obtener un barrido de ángulos de inclinación (de $2 \mu\text{s}$ a $32 \mu\text{s}$ en incrementos de $2 \mu\text{s}$). En la **Figura 7** se observa la intensidad de uno de los dobletes en función del tiempo de duración del pulso p_1 . La intensidad de señal detectada es máxima cuando el pulso ha provocado una inclinación de 90° , ya que la proyección sobre el *plano xy* es máxima [$\text{SEN}(90) = 1$]. En la práctica, resulta más fácil de implementar, y da mayor resolución, detectar el paso por 0, que detectar el máximo. Por lo que, como el seno de un ángulo de 180° o de 360° es 0 (y por tanto también la proyección sobre el *plano xy*), lo que se hace es obtener el tiempo de pulso de un ángulo de 180° , y dividirlo entre 2, o el de 360° y dividirlo entre 4. En nuestro caso la duración del pulso 90° es de $7 \mu\text{s}$.

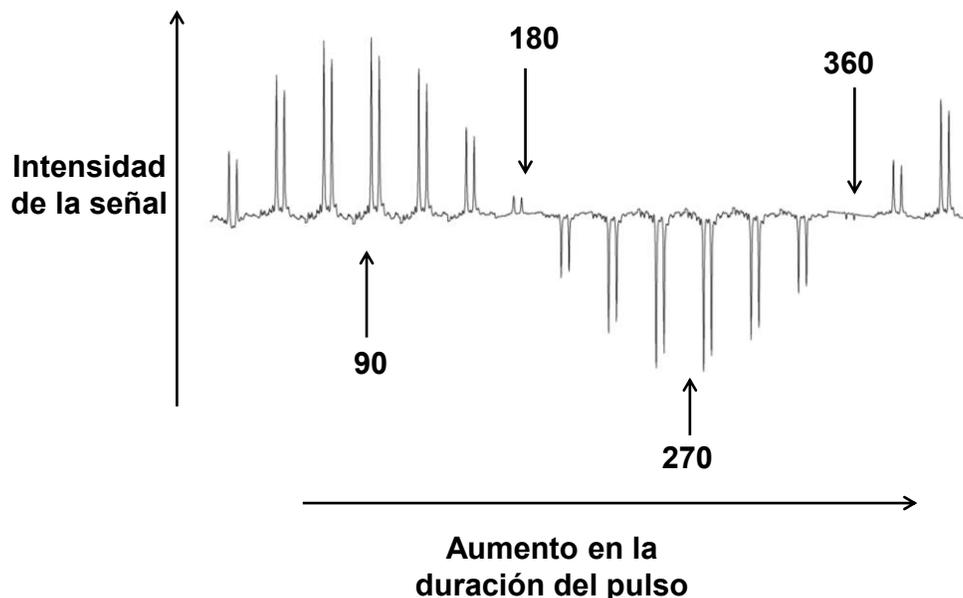


Figura 7. Intensidad de la señal del doblete a 6.75 ppm de la muestra de propóleo en función del tiempo de duración del pulso p_1 en los distintos experimentos (de 2 μ s a 32 μ s en incrementos de 2 μ s.). El d_1 entre los experimentos es de 5 s y con un único transiente para cada espectro.

3.4.2.2 Tiempo de relajación longitudinal o espín-red (T_1)

Una vez que se ha aplicado un pulso, el vector magnetización pasa al plano transversal (M_z) y posteriormente regresa al equilibrio (M_0). Es muy importante no volver a aplicar otro pulso hasta que la magnetización ha vuelto al equilibrio. Para optimizar el d_1 antes de aplicar otro pulso es muy importante hacerlo en función del tiempo de vuelta al equilibrio, llamado tiempo de relajación longitudinal T_1 , que es el tiempo de relajación espín-red (**Ecuación 1**).

$$M_z = M_0 \left[1 - e^{-t/T_1} \right] \quad \text{Ecuación 1}$$

El T_1 depende de muchos factores, incluyendo el medio ambiente nuclear, la temperatura, y el disolvente. Como los diferentes núcleos de una molécula están rodeados de un ambiente magnético diferente, cada núcleo posee un tiempo T_1 diferente. Considerando la **Ecuación 1** el tiempo que tarda el espín nuclear en regresar a su estado de equilibrio es de $1/T_1$.



La secuencia de pulso más utilizada para medir el tiempo de relajación longitudinal es la secuencia de Inversión-Recuperación (**Figura 8**), en la cual para diferentes intervalos de τ se obtienen diferentes amplitudes de las señales. Esta secuencia funciona de la siguiente manera: empieza con un tiempo $d1$, posteriormente se aplica un pulso de inversión de 180° que envía la magnetización al eje $-z$, seguido de un tiempo de espera variable, τ , donde empieza la relajación y la magnetización vuelve al eje z a una velocidad determinada, a continuación se aplica un pulso de 90° para que la magnetización sea observable en el plano xy y finalmente el tiempo de adquisición, aq . Si el valor de τ es cero, la señal será detectada de forma negativa (hacia atrás, eje $-y$) ya que no se permitió su vuelta al equilibrio y el espectro resultante será similar al que se obtiene después de la aplicación de un único pulso de 270° , mientras que si se utiliza un tiempo τ muy grande, la señal se detecta como positiva ya que se permitió su vuelta al equilibrio y el espectro será igual al de un único pulso de 90° . Mediante la aplicación de una serie de distintos tiempos τ , la variación de la magnetización en función del tiempo puede ser estudiada con detalle.

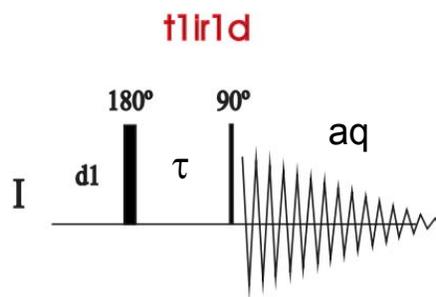


Figura 8.- Representación esquemática de la secuencia de pulsos del experimento de la Inversión-Recuperación con tiempo de reciclado, $d1$, y un tiempo de espera, τ .

En la **Figura 9** se muestra la gráfica con los resultados de la determinación de T_1 , utilizando 16 tiempos τ entre 1 ms y 5 s, con un $d1=50$ s. El tiempo de retardo usado es suficientemente largo para asegurar que todos los espines nucleares de



interés hayan regresado a su equilibrio térmico; sin embargo es importante mencionar que estas condiciones no son óptimas para medir el valor de T_1 ni del disolvente ni del agua ya que el proceso de relajación de ambos es muy largo.

Para la gráfica mostrada en la **Figura 9**, obtener el valor de τ_{null} se encontró en el punto de cruce (entre 500 ms y 800 ms) para cuando el vector de magnetización $M_z=0$. Al sustituir el valor de τ_{null} en la **Ecuación 2** se puede obtener el valor de T_1 que en este caso es de 0.455 s.

$$\tau_{null} = T_1 \ln 2$$

Ecuación 2

Para los extractos de propóleo los valores de T_1 de las diferentes señales están entre 0.4 y 0.8s.

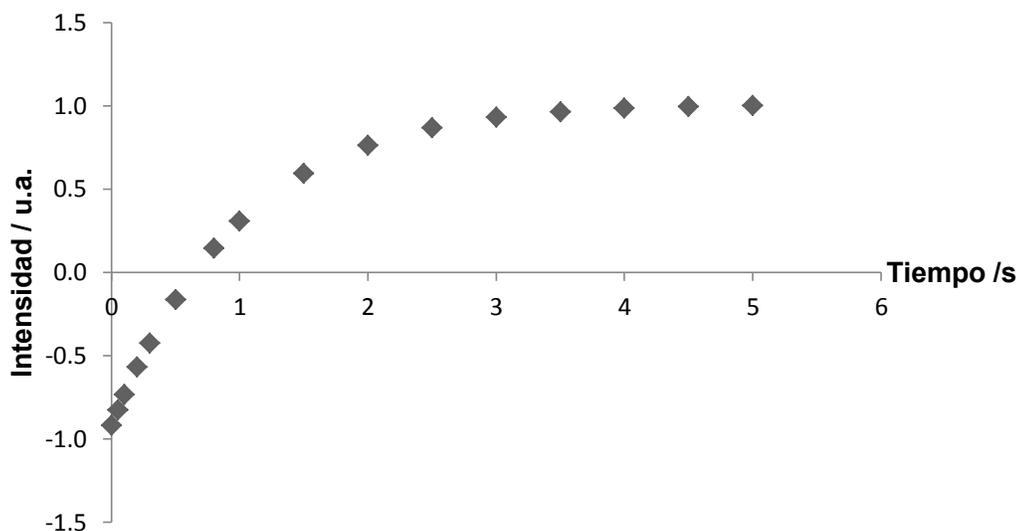


Figura 9. Curva para la determinación del tiempo de relajación longitudinal (T_1) con el experimento de la recuperación de la inversión de la magnetización.



3.4.3 Optimización del tiempo de reciclado

Escoger el tiempo de reciclado (o tiempo de retardo) adecuado para una muestra determinada es un paso que hay que tomar en cuenta ya que desempeña un papel vital para asegurar que se ha restablecido el equilibrio y toda la magnetización se encuentre orientada en el eje z antes de cada medición. Como ya se mencionó el valor de este parámetro se escoge en función de T_1 . Para una correcta cuantificación de todos los núcleos de uno o varios compuestos se recomienda conocer el valor de T_1 de la señal que más tarda en relajarse.

La **Ecuación 3** muestra que el vector magnetización regresa al equilibrio con una velocidad de valor $1/T_1$, lo que junto con el ángulo de excitación aplicado define el porcentaje del vector que regresa al equilibrio.

$$M_z = \frac{\left(1 - e^{-\frac{T_r}{T_1}}\right)}{1 - \left(e^{-\frac{T_r}{T_1}}\right) * \cos \alpha} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde M_z es el porcentaje del vector magnetización que regresó al equilibrio, α es el ángulo de excitación utilizado y T_r es el tiempo de repetición, que es el tiempo adquisición más el tiempo de reciclado ($aq + d1$).

La **Figura 10** muestra la vuelta al equilibrio de la magnetización después de haber aplicado un pulso de 90° o uno de 30° cuando la relación de T_r/T_1 varía de 0 a 5. Se puede observar que cuando se usa un ángulo de 90° se obtiene que el 99.3% de la magnetización regresa a su estado de equilibrio cuando se cumple $T_r = 5 * T_1$.

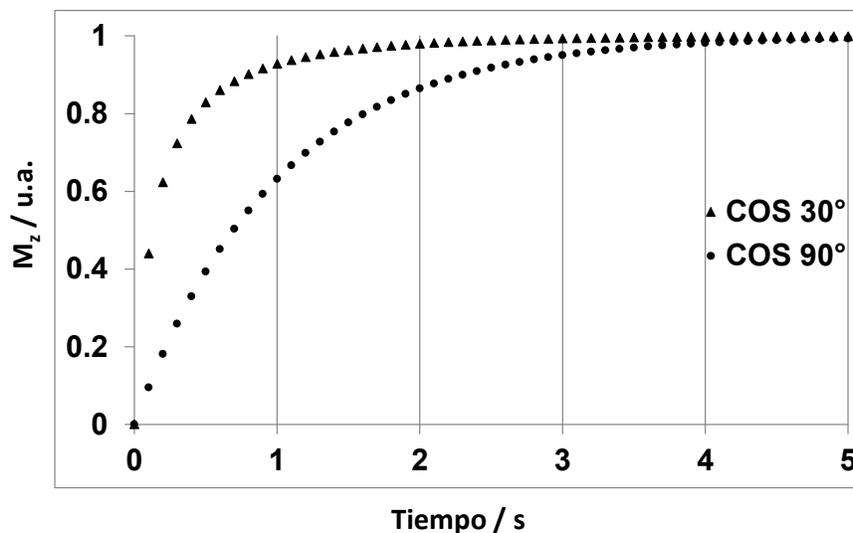


Figura 10.- Recuperación al equilibrio del vector magnetización después de aplicar un pulso de 90° o 30° con diferentes relaciones de T_r/T_1

Mientras que $T_r = 3 \cdot T_1$ el porcentaje de la magnetización obtenido es también de 99.3% para cuando se usa el ángulo de 30° . Esto infiere que si se utiliza el ángulo de 30° se puede obtener el mismo el mismo porcentaje de recuperación del vector magnetización en el eje z que cuando se utiliza el ángulo de 90° , con la ventaja de que se adquieren los espectros en menor tiempo y por tanto se pueden adquirir más repeticiones.

En el presente trabajo se utilizó un ángulo de excitación de 30° , ya que la magnetización regresa a su equilibrio térmico más rápidamente y permite adquirir más acumulaciones en el mismo tiempo con un tiempo de reciclado de 1s. Como ejemplo, si en la **Ecuación 3** se sustituyen los parámetros utilizados para la adquisición de los espectros de las muestras de propóleo ($T_1 = 800$ ms que es el de mayor duración en la regiones de interés, pulso con ángulo de 30° y $T_r = 3$ s) se obtiene que el 92.38% de la magnetización regresó al equilibrio antes de la siguiente acumulación.



3.4.4 Tiempo de adquisición de la FID .

Cuando se aplica un pulso de radiofrecuencia a través de la muestra y se voltea la magnetización por un ángulo específico. Los espines nucleares ya no están en equilibrio, pero volverán al equilibrio a lo largo del *eje z*, este proceso de la FID, tiene una forma de una onda sinusoidal decadente. El tiempo de adquisición es el lapso en el que esta FID es registrada. Se deben tomar ciertas consideraciones en cuanto a la duración del tiempo aq , para maximizar la cantidad de señal que se adquiere. La **Figura 11** muestra la FID y el espectro que se obtiene con diferentes tiempos de adquisición.

En la **Figura 11a** se observa que el tiempo de adquisición es demasiado corto y provoca distorsión en algunas señales (la FID está truncada y en la base de los picos del espectro se observan “sinc wiggles”). El aumento del tiempo de adquisición corrige este problema (**Figura 11b**), pero si se extiende demasiado se acumulará ruido de fondo innecesariamente (**Figura 11c**).

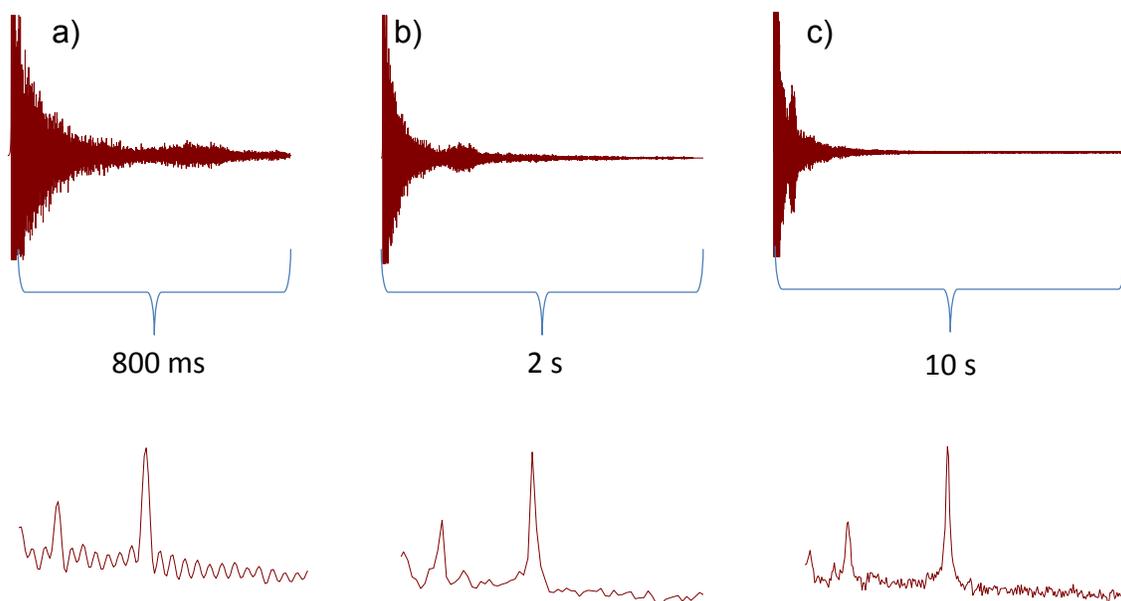


Figura 11. FID (arriba) y una región del espectro (abajo) de una muestra de propóleo a diferentes tiempos de adquisición a) 800 ms, b) 2 s y c) 10 s. En (a) hay presencia de wiggles, en (b) $SR=348.3$, y en (c) $SR=170.5$.



3.4.5 Parámetros de procesado

Para el procesado y presentación en este documento la FID fue exportada al programa MestReNova v. 8.1. La elección del ensanchamiento de línea es importante para no perder información sobre la multiplicidad de las señales o para no observar exceso de ruido. En primer lugar, se realizó la transformada de Fourier ajustándola con una multiplicación exponencial empleando un factor de ensanchamiento de línea de 0.3 Hz, para mejorar la S/R. En la **Figura 12** se pueden observar las diferencias entre ensanchamientos de línea distintos y los efectos que tienen éstos sobre la multiplicidad de las señales.

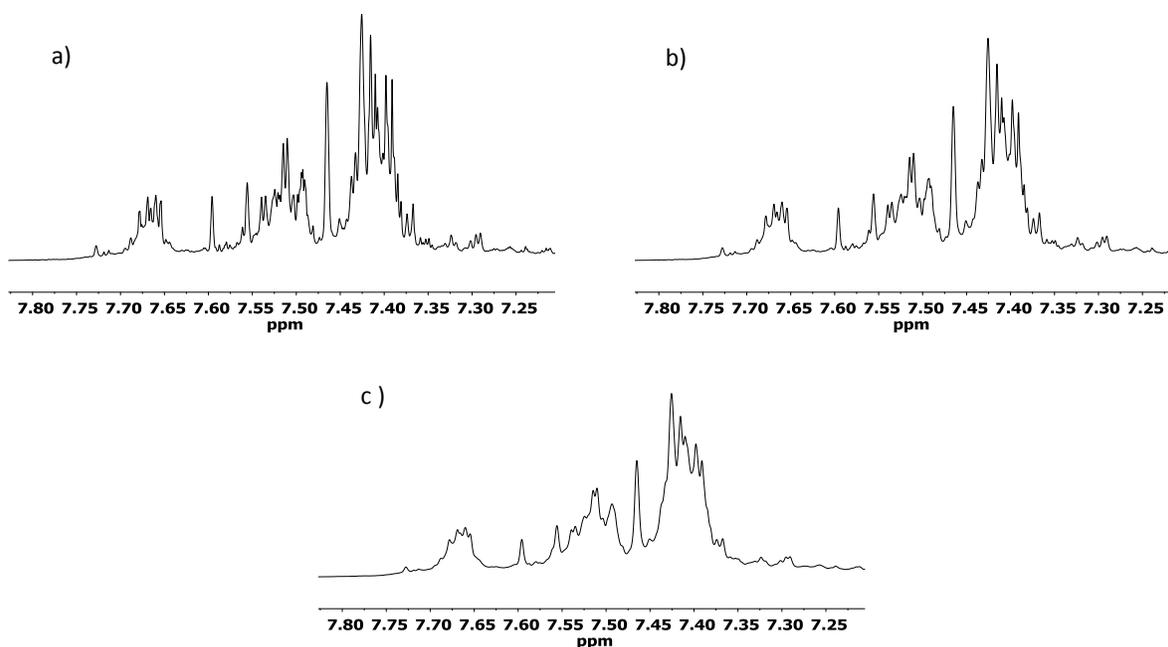


Figura 12.- Espectros con diferentes apodizaciones.

Ensanchamiento de línea de a) 0, b) 0.3 y c) 1.0 Hz.

Posteriormente la fase del espectro se ajustó manualmente mientras que la línea base se ajustó mediante el método de Mínimos Cuadrados con una función polinomial no mayor de orden 3.⁶⁶ Se referenció el quintuplete que corresponde al solvente residual no deuterado del DMSO-d₆ a 2.50 ppm.



3.5 Procesado de datos para la aplicación quimiométrica

El procesamiento de datos es un paso intermedio entre los espectros “en crudo” y el análisis de datos. El principal objetivo es transformar los datos de tal manera que los conjuntos de datos de las muestras sean más comparables entre sí a fin de facilitar y mejorar su análisis. En el caso de procesamiento de espectros de RMN generalmente se incluyen la alineación de los picos, el “binning” y la normalización.⁶⁷

3.5.1 Supresión de la señal

En este trabajo se suprimieron ciertas señales para que no interfirieran en los cálculos estadísticos de la quimiometría. La supresión de las señales se realizó selectivamente después de realizar la deconvolución de las señales. La deconvolución es un método que se utiliza para “desenredar” regiones espectrales que tienen resonancias solapadas o superpuestas y calcular los componentes individuales tomando en cuenta las diferentes intensidades, los diferentes anchos de línea y las diferentes formas de línea. Los algoritmos de la deconvolución no afectan ningún otro aspecto del espectro debido a que los cambios realizados se realizan en la 2ª derivada de la FID.

En este trabajo se suprimieron ciertas señales con el programa MestReNova, primero se realizó la deconvolución y se suprimió selectivamente la señal en 3.34 ppm que corresponden al agua y la señal en 2.50 ppm que corresponde a la señal residual del DMSO-d₆ no deuterado. Como al momento de trasvasar las muestras se usó metanol, y en algunos casos no se evaporó del todo, también fue necesario suprimir la señal en 3.16 ppm. A continuación se detalla cómo se realizó el proceso utilizando dicho software:

- Referenciar el espectro con respecto a la señal residual del disolvente deuterado.



- Seleccionar el icono *Nueva región para ajustar* y seleccionar la región del espectro deseada.
- Seleccionar la opción *Editar región ajustada*, del menú *Seleccionar regiones de ajuste*. Aparecerá una tabla con los picos de las señales de la región.
- En la tabla seleccionar el desplazamiento químico de las señales a eliminar.
- Hacer click en el ícono *Borrar pico*, después de haber eliminado los picos de los disolventes hacer click en el ícono *Crear nuevo espectro*.

3.5.2 Alineación

Una de las preocupaciones más comunes en el análisis de datos multivariantes es la presencia de cambios en los desplazamientos químicos de los picos entre espectros; estos cambios se pueden deber a factores de los instrumentos, a pequeñas variaciones en el pH, en la temperatura, la concentración de sales y concentración relativa de iones específicos.

El algoritmo *Icoshift* (*Interval Correlation Optimized Shifting* por sus siglas en inglés) fue propuesto por Savorani y colaboradores⁶⁸ en el cual los espectros se dividen en segmentos de diferentes intervalos y se alinean con respecto a los segmentos correspondientes de un espectro de referencia, el cual puede ser un espectro real, el promedio o la mediana de todos los espectros.

En este trabajo, después de haber suprimido las señales deseadas, los espectros se exportaron como archivo .txt al programa MatLab (2013^a, The Mathworks Inc.). En dicho programa se realizó un ajuste de alineación de la matriz de datos en intervalos diferentes usando el algoritmo *Icoshift*. En la **Figura 13a** se muestra la región de 6.05 a 6.14 ppm con los 16 espectros antes de ser alineados y con el espectro promedio (línea roja). El promedio de los espectros se obtiene mediante la maximización de la correlación cruzada de cada intervalo por una transformada de Fourier rápida la cual permite una alineación simultánea de todos los espectros. En la **Figura 13b** se puede observar la serie de espectros alineados con respecto



al promedio obtenido después de haber aplicado la herramienta de alineación de Icoshift.

Figura 13. (a) Región desalineada de los espectros de propóleo. (b) Resultado de la herramienta Icoshift aplicada a la misma región de los espectros desalineados.

3.5.3 “Binning”

Una vez realizada la alineación de los espectros se lleva a cabo la reducción de variables en la matriz para disminuir la cantidad de puntos y que los cálculos quimiométricos se lleven a cabo en un tiempo razonable. La técnica “binning” consiste en subdividir regiones o anchos de caja (“bins” o “buckets”) de un espectro e integrar cada una de estas regiones con respecto a un único valor que se utilizará como representación del espectro original.

El uso del “binning” debe ser exclusivo para el desarrollo de modelos en quimiometría y es necesario analizar la resolución total de los espectros para la identificación de biomarcadores. Típicamente se utilizan segmentos de 0.04 ppm de ancho debido a que hay un buen compromiso entre la resolución y las



dificultades relacionadas a la variación de la posición de los picos de algunos metabolitos.^{68,69}

En esta tesis los espectros fueron preprocesados usando la herramienta “binning” del programa MestReNova v. 8.1 con un ancho de caja de 0.04 ppm para le región espectral de 0.0-13.5 dando un total de 338 puntos para cada espectro. En la **Figura 14** se observa la comparación entre el espectro ^1H RMN de una muestra de propóleo antes y después de procesarlo con “binning”.

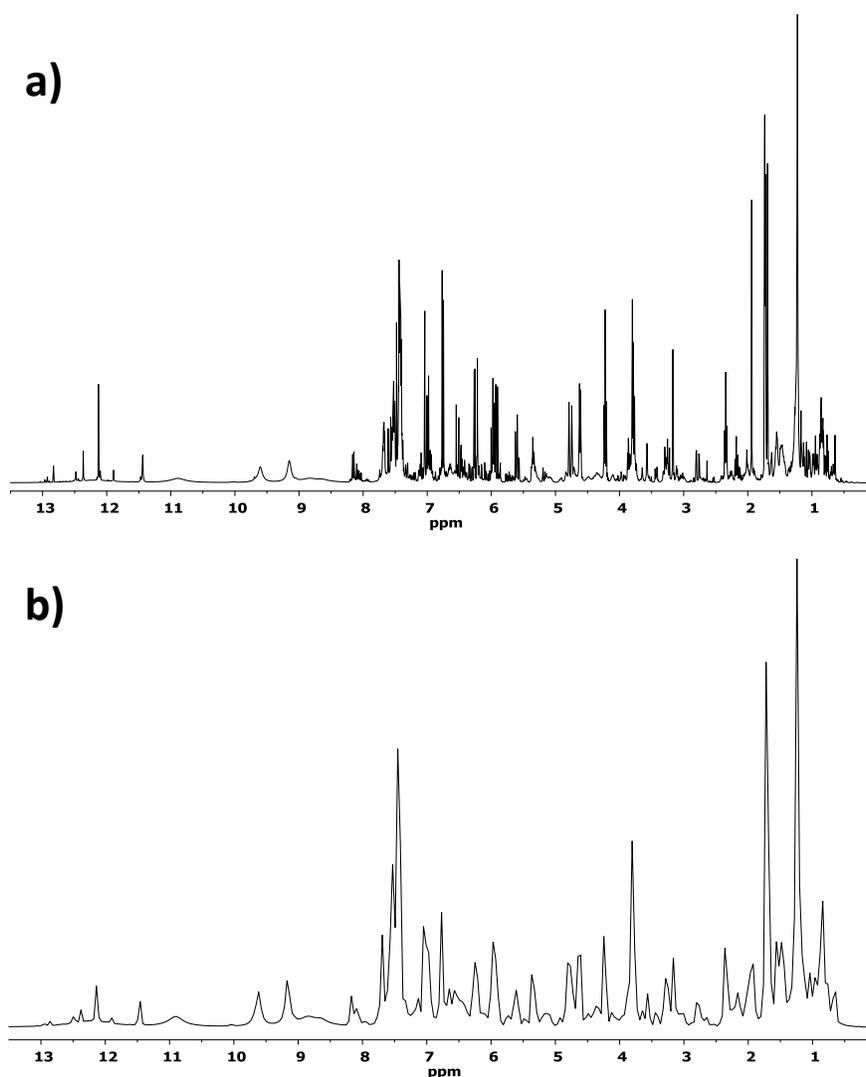


Figura 14.- a) Espectro ^1H RMN normal de una muestra de propóleo. b) Espectro ^1H RMN de una muestra de propóleo después de aplicar la herramienta “binning” con ancho de caja de 0.04 ppm.



3.5.4 Normalización

La normalización de los espectros se realiza para corregir los posibles errores en la variación de la concentración o incluso para corregir errores debido a diferente número de adquisiciones. Típicamente la normalización es una multiplicación de cada espectro de RMN por una constante. El objetivo principal de la normalización es hacer que todas las muestras sean comparables entre sí mediante la eliminación o minimización de la cantidad total de material por muestras. El método más común para la normalización de espectros es la normalización por área espectral⁶⁹ que generalmente se le conoce como “normalización integral”⁷⁰ y se utiliza cuando las muestras tienen aproximadamente el mismo número de metabolitos; sin embargo no hay investigaciones que confirmen el tipo de normalización más adecuado para la evaluación de espectros de protón⁷¹.

En este trabajo se utilizó la normalización integral con un valor arbitrario de 100 unidades.

3.6 Métodos quimiométricos

Después del pretratamiento de datos los espectros fueron exportados en código ASCII al programa The Unscrambler X v. 1.1 (CAMO Oslo, Noruega) para la construcción de los modelos de PCA y PLS. Se obtuvieron diferentes gráficas de PCA para clasificar las muestras de acuerdo a su origen a partir de los desplazamientos químicos de importancia de diferentes regiones espectrales. Para el método PLS se realizó la calibración y validación inversa “Dejando uno fuera” (esto se explica en el Apéndice II *Fundamentos de Quimiometría*) para posteriormente obtener las gráficas de PLS con diferentes regiones espectrales de las muestras para encontrar una correlación con las actividades antioxidantes medidas por los diferentes ensayos. El programa sigue una serie de algoritmos en los cuales a partir de modelos matemáticos obtiene regresiones lineales inversas, para tomar en consideración tanto el error generado en el eje x como en el eje y, y en la cual no se necesita saber la concentración de todos los componentes.



4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Espectros de los extractos de propóleo

Los extractos obtenidos a partir de las muestra de propóleo mediante el tratamiento con etanol al 95% presentaron una consistencia cerosa y color ámbar. La **Figura 15** muestra la fotografía de dos de los extractos después de eliminar el disolvente de extracción. Los rendimientos obtenidos estuvieron en el rango de los 100 mg extracto etanólico por cada 3 gr de material crudo.



Figura 15.- Extractos después de la evaporación de 2 de las muestras de propóleos.

La **Figura 16** se muestran los espectros de una muestra de propóleo extraído por dos métodos de extracción diferentes: a) maceración simple y b) extracción mediante Soxhlet. Al realizar una comparación de los espectros adquiridos para los dos extractos obtenidos se puede observar que, el espectro de la maceración simple presenta más señales en la región de los hidroxilos y las señales en la región de las ceras tienen menor intensidad. Por esta razón, se seleccionó el método de maceración simple para este trabajo. Este método de extracción tiene como ventajas el que no se calientan las muestras, lo cual podría ocasionar la aparición de artefactos y la descomposición de algunos compuestos presentes en



el propóleo, y además es un método mucho más simple de realizar que el método Soxhlet.

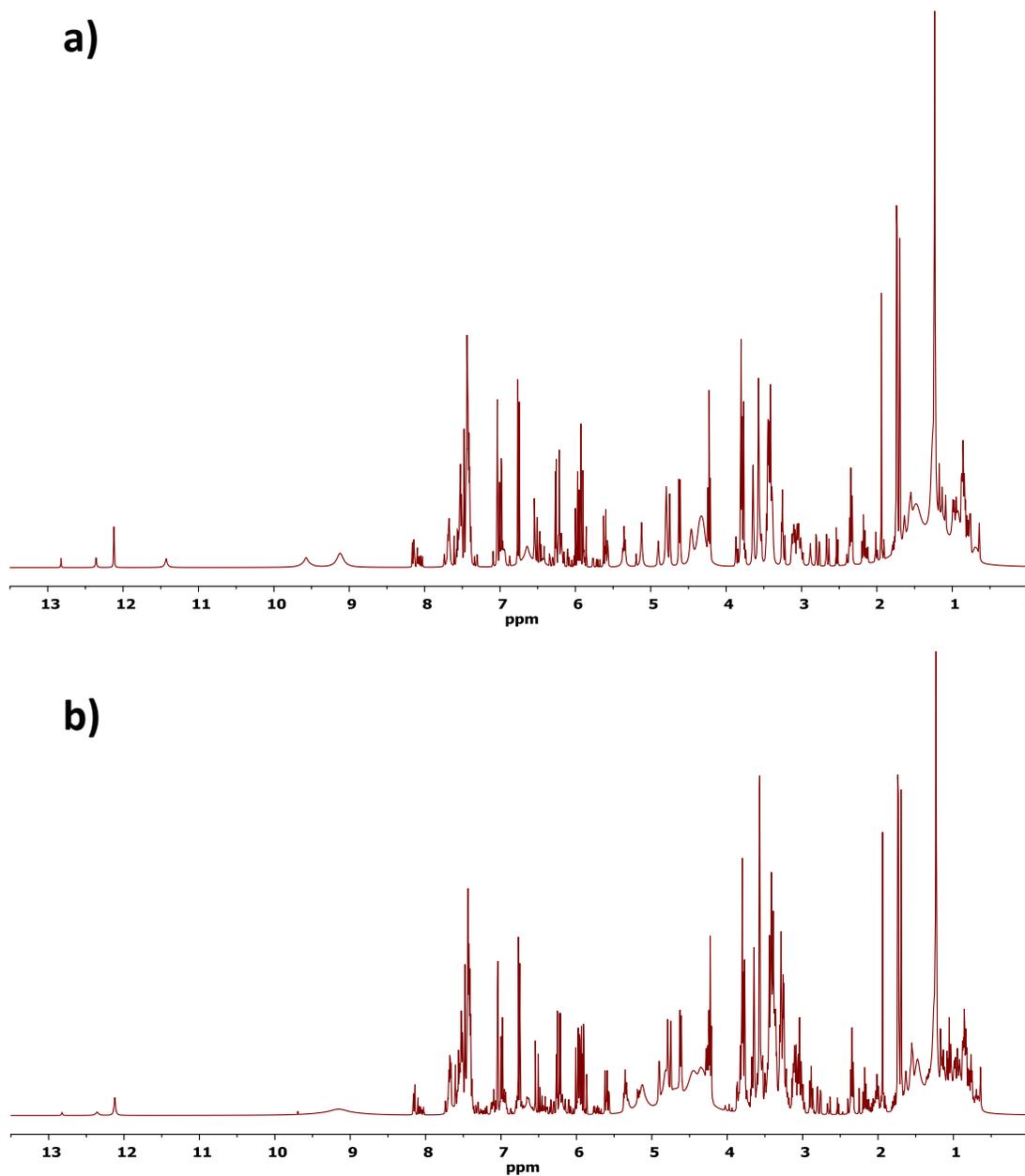


Figura 16.- a) Espectros de ^1H RMN (400MHz, 25°C, DMSO-d_6) de una muestra de propóleo, a) con el método de maceración simple en etanol y b) utilizando un equipo de Soxhlet en etanol.



4.2 Análisis de los espectros ^1H de propóleos

En la **Figura 17** se presenta el espectro ^1H -RMN de una de las muestras de propóleo, donde se observa que en la región alifática (0 a 4.5 ppm) hay numerosas señales que corresponden principalmente a las ceras; en la región de los compuestos de aromáticos (4.5 a 8.5 ppm) se encuentran las señales de los compuestos de interés y en la región de 8.5 a 13.5 ppm los protones hidroxilo.

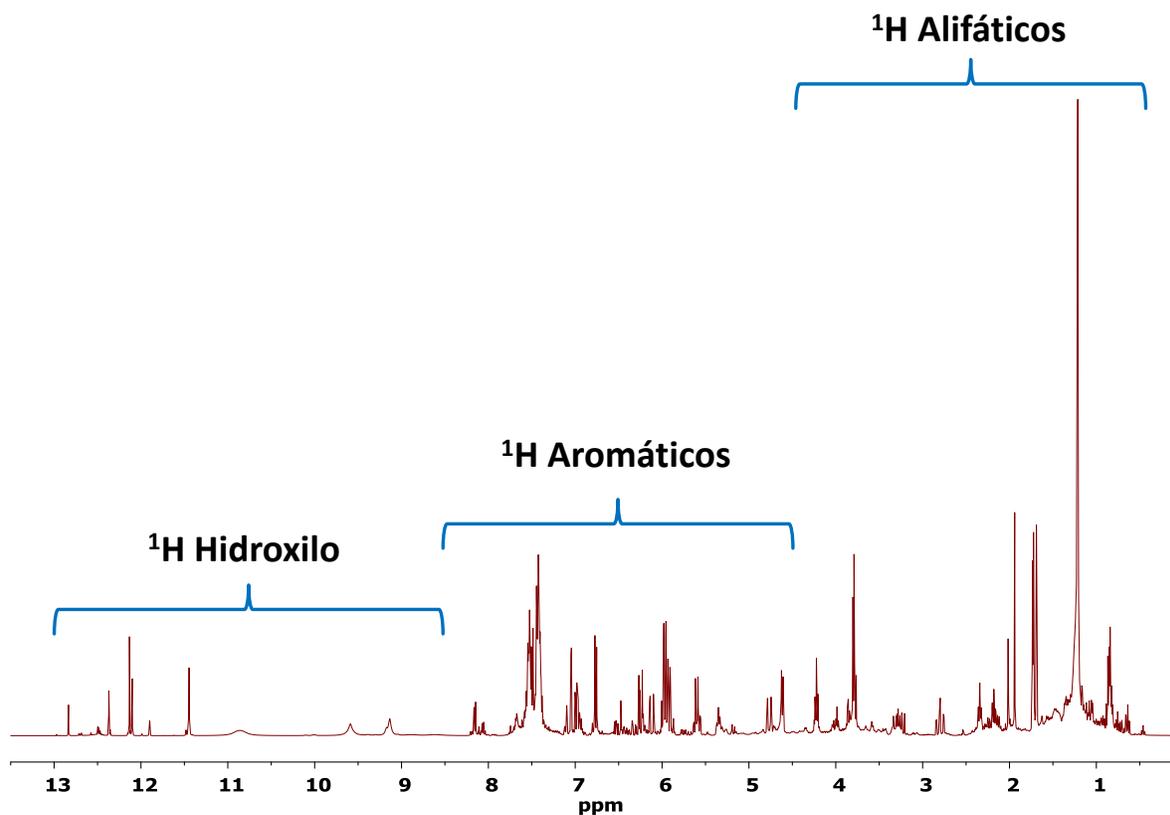


Figura 17.- Espectro ^1H (400MHz, 25°C, DMSO- d_6) del extracto etanólico de propóleo recolectado en Puebla.

La **Figura 18a** muestra los espectros ^1H RMN de los 3 propóleos donde se observa mayor intensidad y número de señales en la región de 4.5 a 8.5 ppm, la integral de todas las señales en dicha región después de normalizar a los espectros es entre 29% y 39%. Por otro lado, en la **Figura 18b** se muestran los espectros ^1H RMN de los 3 propóleos donde se observa menor intensidad y número de señales cuya integral de la misma región es entre 7% y 10%. Si se utiliza una región más



estrecha (5.5 a 8.5 ppm), como lo sugieren algunos autores,⁷² se restringe más la región a las señales de los aromáticos, y las diferencias son más significativas, los propóleos de la **Figura 18a** dan una integral entre 28% y 38% mientras que los de la **Figura 18b** entre 2% y 4%. Con esta información se puede determinar de forma sencilla la proporción de los compuestos con grupos aromáticos respecto a las ceras. Dado que la actividad antioxidante se atribuye a la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos es de esperar que cuanto mayor sea la cantidad de señales en dicha región, mayor será la actividad antioxidante del propóleo.

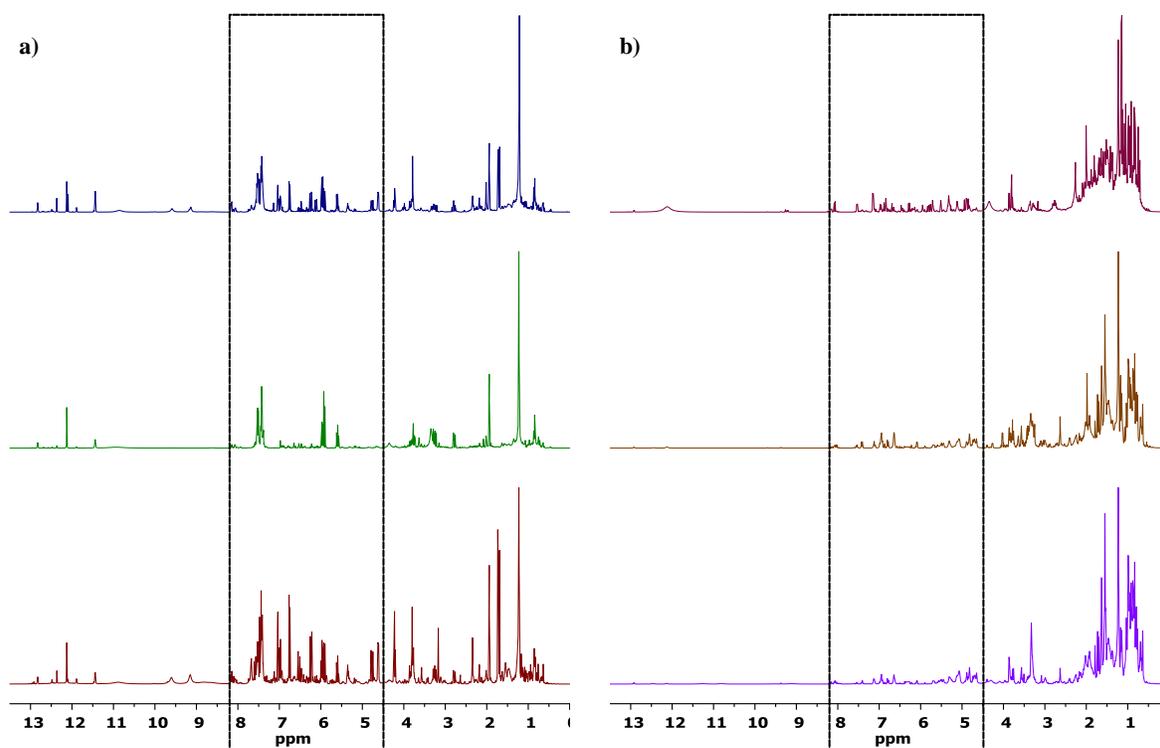


Figura 18.- Espectros ^1H (400MHz, 25°C, DMSO-d_6) de 6 diferentes extractos de propóleos. Se señala la región de 4.5 a 8.5 ppm donde se observa que la intensidad de las señales en los espectros a) es mayor que en los b).

Con el objeto de visualizar mejor la información mostrada anteriormente, en la



Tabla 4 se da los valores de las integrales de las diferentes regiones, junto con los datos de contenido de actividades antioxidantes adquiridas por diferentes técnicas. Se puede ver que existe una tendencia entre la cantidad de flavonoides totales y el valor de la integral entre 4.5 y 8.5 ppm. De forma similar, sería de esperar que la cantidad de fenoles totales correlacionara con la región de 8.5 a 13.5 ppm, pero esto no sucede y se puede explicar porque es la región de los grupos hidroxilo y su integral depende mucho de la composición de la muestra, la acidez del medio y la presencia de agua. En cuanto a los ensayos FRAP, DPPH y ABTS no es fácil sacar conclusiones y por ello es necesario realizar análisis quimiométrico.



Tabla 4.- Tabla de valores de integrales para diferentes regiones de los espectros ^1H RMN y actividad antioxidante medida por diferentes ensayos.

# de muestra	Apiario	Integral	Integral	Integral	Flavonoides totales*	Fenoles totales**	FRAP*	DPPH*	ABTS*
		0-4.5 ppm	4.5-8.25 ppm	8.25-13.5 ppm					
m8	Don Nico (3era)	51.07	38.67	10.26	68.14 ± 4.58	458.00 ± 16.41	98.32 ± 7.50	178.36 ± 2.67	648.11 ± 70.17
m15	Álamo Blanco (1era)	58.4	35.62	5.98	44.17 ± 0.21	391.16 ± 14.84	89.66 ± 1.17	162.80 ± 2.96	467.13 ± 6.79
m14	Durango (1era)	65.37	29.22	5.4	27.11 ± 1.91	127.27 ± 7.24	37.93 ± 1.72	158.03 ± 19.31	456.01 ± 7.59
m16	Zacatecas (1era)	78.38	18.57	3.05	35.14 ± 0.95	101.20 ± 2.70	21.56 ± 2.67	67.21 ± 2.34	185.88 ± 3.87
m6	Búho (3era)	82.51	15.79	1.71	34.63 ± 2.54	274.65 ± 6.17	26.32 ± 0.40	173.47 ± 11.99	500.14 ± 28.86
m2	Acuexcómatl (3era)	82.52	14.83	2.65	34.32 ± 3.54	198.87 ± 14.80	31.22 ± 1.87	186.98 ± 8.18	526.16 ± 102.3
m7	Don Nico (1era)	84.05	14.66	1.29	14.89 ± 0.82	391.16 ± 14.84	89.66 ± 1.17	182.80 ± 2.96	702.47 ± 4.56
m11	Trojes (2da)	86.63	12.96	0.41	25.31 ± 2.91	141.67 ± 12.43	37.93 ± 1.72	168.13 ± 19.31	668.08 ± 17.3
m10	Tepenáhuatl (2da)	88.31	11.41	0.29	16.83 ± 1.76	131.25 ± 5.44	23.32 ± 0.08	175.87 ± 18.94	332.47 ± 47.22
m4	Bonilla (3era)	86.42	10.95	2.63	6.71 ± 0.86	72.72 ± 6.17	25.22 ± 2.78	76.00 ± 1.25	210.14 ± 1.64
m1	Acuexcómatl (1era)	87.91	10.83	1.26	14.20 ± 1.06	145.59 ± 25.65	65.26 ± 2.12	130.67 ± 7.59	473.01 ± 6.21
m3	Bonilla (1era)	85.97	10.81	3.22	5.24 ± 0.72	71.70 ± 5.40	21.38 ± 1.28	60.31 ± 0.45	122.88 ± 5.20
m9	Panteón (2da)	90.31	9.37	0.32	24.07 ± 1.89	178.03 ± 6.23	23.38 ± 0.61	132.13 ± 10.56	338.90 ± 5.82
m5	Búho (2da)	90.16	9.17	0.67	25.83 ± 1.90	170.98 ± 6.23	26.32 ± 0.53	183.87 ± 10.61	390.96 ± 10.82
m13	Acuexcómatl (4ta)	89.88	7.82	2.3	18.13 ± 0.76	168.23 ± 5.34	78.01 ± 3.13	145.67 ± 3.28	571.42 ± 12.34

* Datos tomados de las tesis de Hernández¹¹ y Granados¹² determinados como equivalentes de quercetina por gramo de muestra, en un ensayo colorimétrico en el rango del visible a 415 nm^{25,26}.

** Datos tomados de las tesis de Hernández¹¹ y Granados¹² determinados como equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra, en un ensayo colorimétrico en el rango del visible a 700 nm^{25,26}.



4.2.1 Perfiles de los espectros de ^1H

Al analizar los espectros ^1H RMN se observó que hay tres grupos de muestras que presentan diferente perfil. La mayoría de las muestras recolectadas en el DF presentan numerosos singuletes y dobletes entre 6 y 8 ppm, que son señales típicas de los flavonoides con sustituciones en todos los anillos.

En dos de las muestras se observan señales de un grupo vinilo terminal (5.75, 5.24, 5.22 ppm) que con ayuda de experimentos en 2D se pudo elucidar parte de su estructura (**Figura 19a**)

En otro grupo de muestras, provenientes de Durango, Zacatecas, Puebla y una del D.F., se observa un grupo de señales de aromáticos alrededor de 7.5 ppm (lo que indica la ausencia sustituciones de grupos hidroxilo en el anillo B como en la pinocembrina donde los $\delta_{\text{H}2' \text{ y } \text{H}6'} \approx 7.46\text{-}7.48$ ppm y $\delta_{\text{H}3', \text{H}4' \text{ y } \text{H}5'} \approx 7.34 - 7.41$ ppm) y señales por debajo de 6 ppm. (**Figura 19b**).

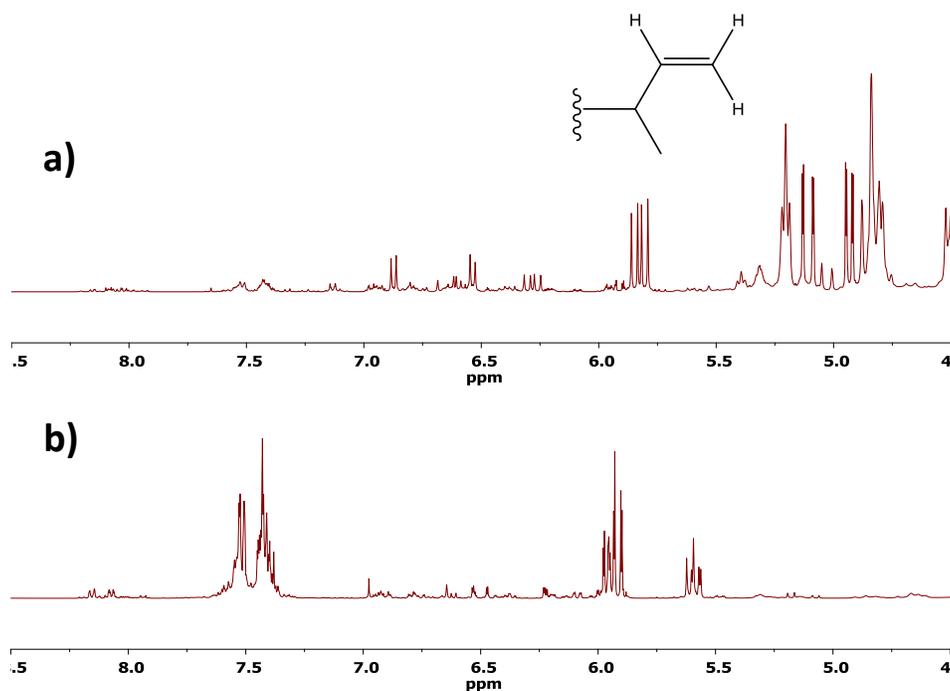


Figura 19.- Región de 4.5 a 8.5 ppm del espectro ^1H RMN de las muestras a) Bonilla 1era colecta y b) Durango



4.3 Análisis quimiométrico

En esta sección se realizará la estadística necesaria a los espectros de RMN de las muestras de propóleo para simplificar las variables y obtener sus combinaciones lineales para describir el conjunto de datos de manera más simple (PCA), y correlacionar dichas combinaciones lineales con las propiedades antioxidantes de los propóleos (PLS).

4.3.1 Análisis clasificatorio PCA

Para tener una idea general que ayuda a explicar las pautas observadas en las muestras se aplicó un método no supervisado de clasificación, PCA. Primeramente, se buscó en las matrices de datos de los espectros agrupamientos de relación natural entre los propóleos y su lugar de origen o colección. Las gráficas de PCA de los *scores* se obtuvieron utilizando diferentes regiones espectrales, de 4.5 a 8.5 ppm (**Figura 20**), de 4.5 a 13.5 (**Figura 21**) y de 6 a 8 ppm (**Figura 22**). Estas diferentes regiones se probaron para encontrar aquella que separe más significativamente unas muestras de otras. Estas gráficas expresan que las muestras son similares y comparables entre sí, es decir son muestras representativas, ya que todas se encuentran dentro de la elipse de confianza al 95%. Sin embargo, se puede observar que la **Figura 20** y la **Figura 21** no muestran diferencia alguna en la distribución espacial de las muestras como el caso de la **Figura 22** que muestra mayor dispersión. Al comparar en la **Figura 20** y **Figura 21** como varía el porcentaje de modelación de la varianza al usar los PCs 1 y 2 en las muestras se observa que son muy similares (90% y 88% respectivamente) y se revela que las región de 8.5 a 13.5 ppm no es relevante para evaluar la variabilidad de las muestras de acuerdo a su origen. En tanto que la gráfica de la región de 6 a 8 ppm presenta mayor explicación de la variabilidad (97%); no se seleccionó como primordial porque se tienen conocimientos previos de que las señales de mayor importancia de los compuestos de interés aparecen en la región de 4.5 a 8.5 ppm.¹⁷

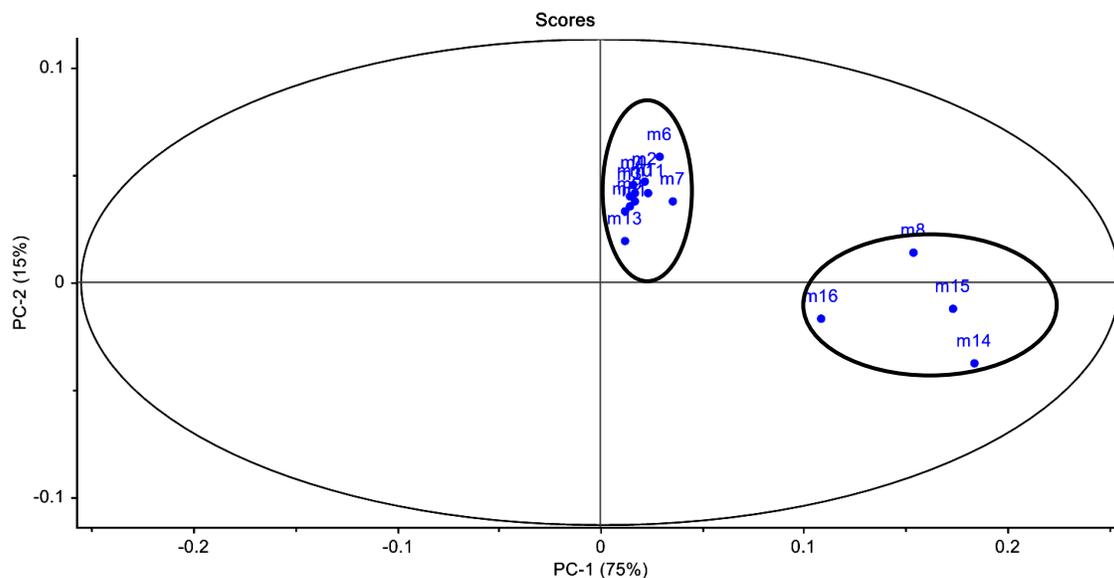


Figura 20.- Representación de los "scores" procedentes de la región 4.5 a 8.5 ppm de los espectros ^1H de RMN de los extractos de propóleo con la elipse de confianza al 95%.

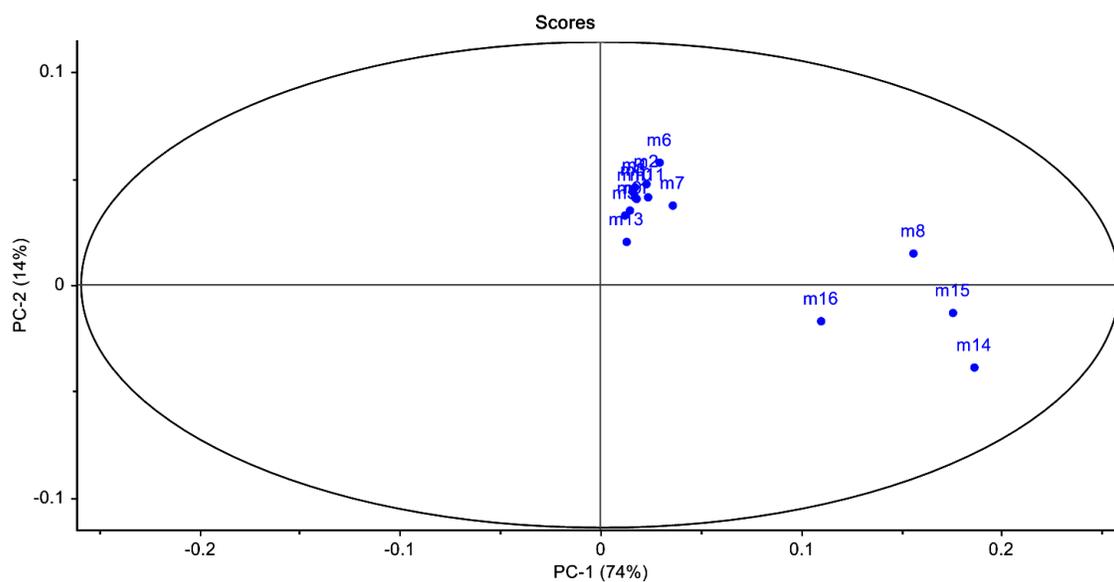


Figura 21.- Representación de los "scores" procedentes de la región 4.5 a 13.5 ppm de los espectros ^1H de RMN de los extractos de propóleo con la elipse de confianza al 95%.

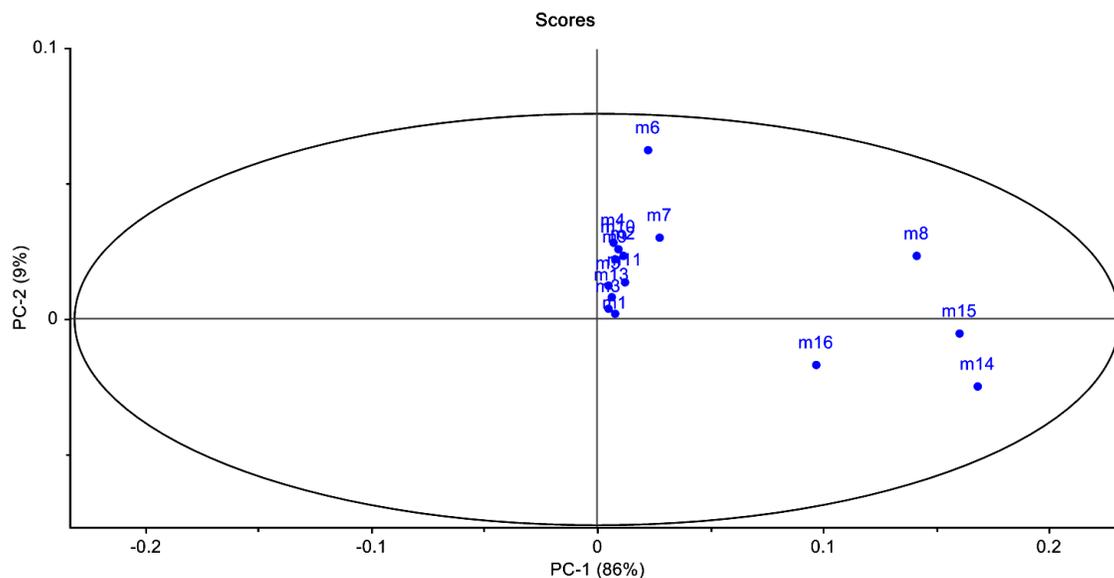


Figura 22.- Representación de los “scores” procedentes de la región 6 a 8 ppm de los espectros ^1H de RMN de los extractos de propóleo con la elipse de confianza al 95%.

Para la región de 4.5 a 8.5 ppm (**Figura 20**), en la que para describir el 96% de la variabilidad de la muestra se necesitaron 6 PCs, se pueden discernir 2 grupos de muestras (encerrados en 2 círculos) los cuales se diferencian claramente de acuerdo con la variabilidad descrita por el PC1. El PC1 describe el 75% de la variabilidad entre las muestras y el PC2, el 15%, siendo el resto lo correspondiente a los otros 4 PCs.

La **Figura 23** muestra la gráfica de los *loadings* de los espectros con los resultados de la región de 4.5 a 8 ppm. Se puede observar en esta gráfica que el PC1 está dado principalmente por los desplazamientos químicos de 7.41, 7.49 y 7.37 ppm. De la misma manera los desplazamientos químicos de 6.6, 4.8 y 4.76 definen mayoritariamente al PC2. En conjunto se puede decir que cualquier información que se encuentre en estos seis puntos es de suma importancia para poder diferenciar muestras de acuerdo a su origen.

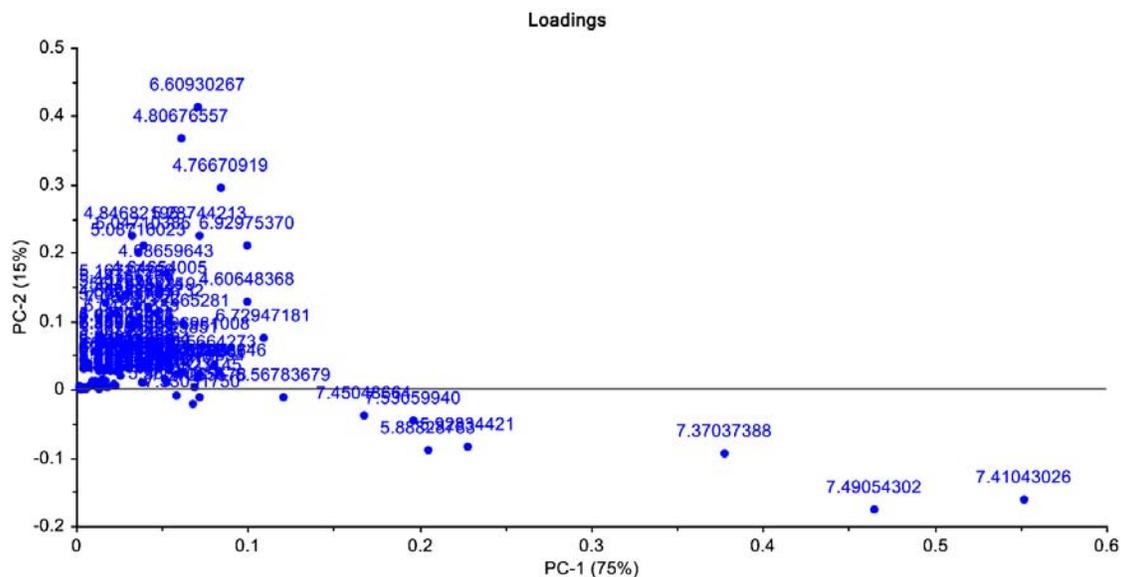


Figura 23.- Gráfica de los “loadings” para de la región 4.5 a 8.5 ppm

Con base a lo anteriormente expuesto, en la **Figura 24** se muestra una ampliación de los *scores* del PCA junto con los espectros asociados a cada muestra, donde se marca con recuadros los *loadings* que definen mayoritariamente a PC1 y PC2. Se puede observar claramente que la señal alrededor de 7.5 ppm, que los “loadings” donde más se diferencian las muestras, se encuentran las señales de los flavonoides que no tienen sustituido el anillo B.

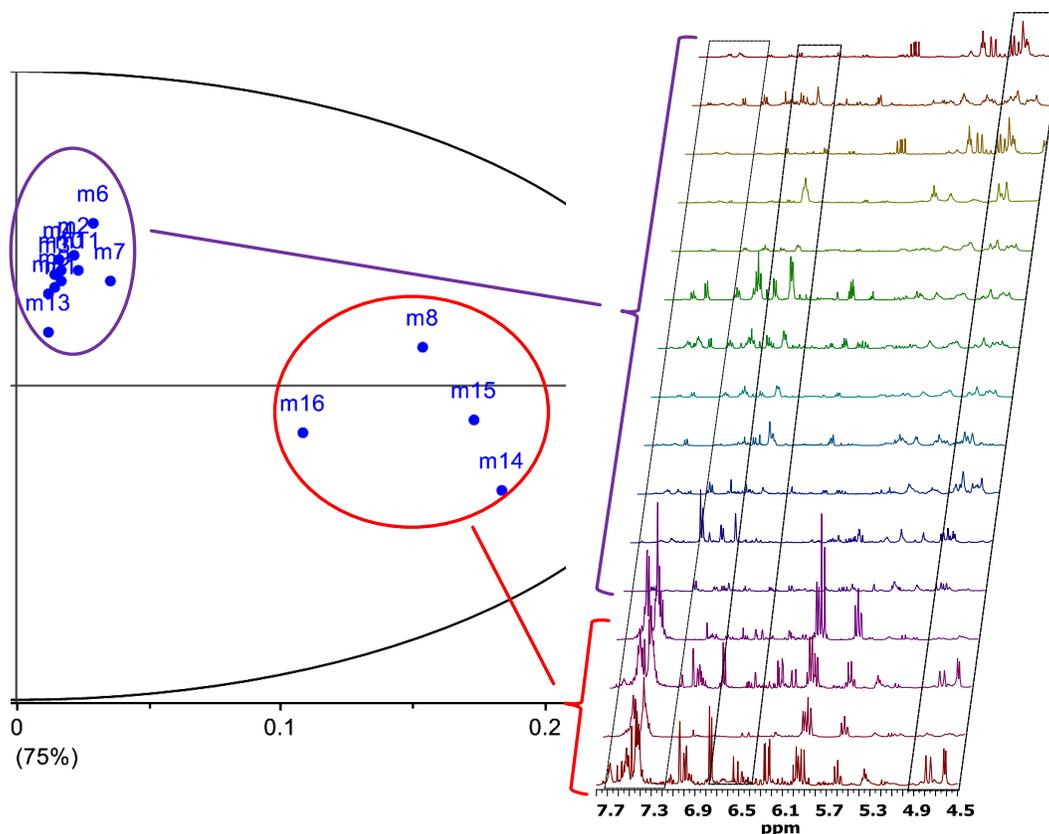


Figura 24.- Representación de los “scores” y región de 7.2 a 7.8 ppm de los espectros ^1H RMN, en los que se enmarcan las regiones de loadings de PC1 y PC2.

Un método estadístico común para monitorear simultáneamente múltiples características de normalidad es el Hotelling T^2 . El objetivo principal de este estimador estadístico es el de detectar las causas especiales de variación. El gráfico de control de Hotelling T^2 detecta desviaciones anómalas y de distribución con respecto a la distribución normal. En la **Figura 25** se presenta la gráfica de Hotelling T^2 con 6 PCs para todos los extractos de propóleo y en la cual no se halla ninguno como muestra atípica o anómala ya que todas caen dentro de los límites considerados como normales. Esta gráfica se obtuvo para confirmar y asegurar que todas las muestras son comparables entre sí a pesar de la lejanía que exista entre sus orígenes y el resultado se confirma por la elipse de confiabilidad de la **Figura 20**.

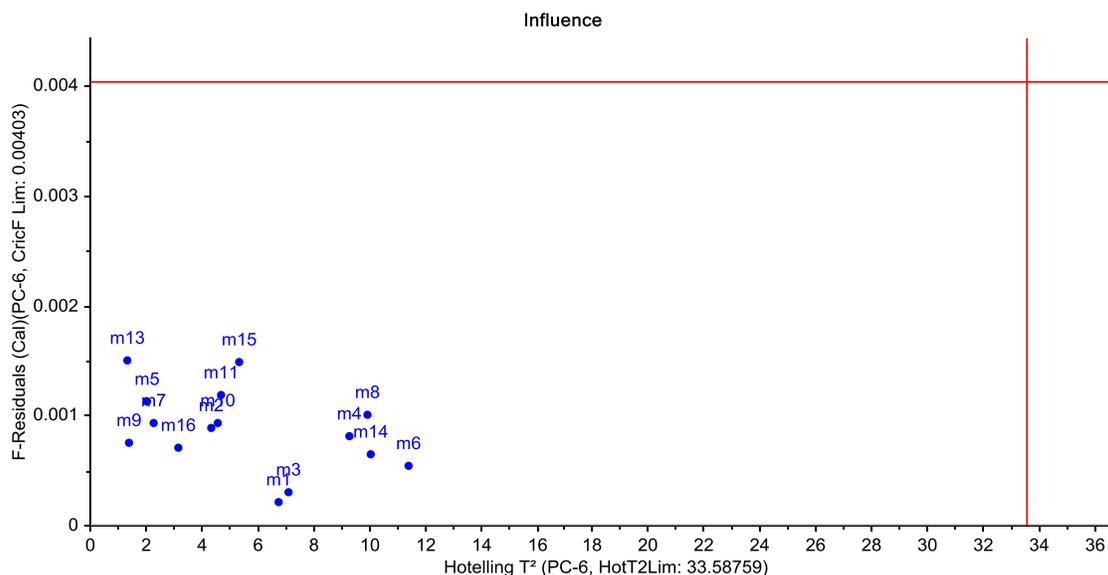


Figura 25.- Gráfica de Hotelling T^2 de las muestras de propóleo con límites al 95% de confianza.

La **Figura 26** muestra la gráfica de variabilidad de las actividades antioxidantes medidas por los diferentes ensayos para las muestras de propóleo. En la **Tabla 5** se muestran los valores normalizados de actividad antioxidante para usarse en este análisis quimiométrico. En la gráfica de la **Figura 26** no se distinguen agrupamientos definidos y se observa que el PC1, tiene una contribución del 94% de la varianza, mientras que el PC2 contribuye con el 3%. Esto indica que hay patrones definitivos en los conjuntos de datos que se explican mayoritariamente por el PC1 y patrones que se definen minoritariamente por el PC2.



Tabla 5.- Tabla de valores normalizados de la actividad antioxidante medida por diferentes ensayos (ver tabla xxxx para los valores originales).

# de muestra	Apiario	Flavonoides totales*	Fenoles totales**	FRAP	DPPH	ABTS
m8	Don Nico (3era)	1	1	1	0.9539	0.9226
m15	Álamo Blanco (1era)	0.6482	0.8541	0.9119	0.8707	0.6650
m14	Durango (1era)	0.3979	0.2779	0.3858	0.8452	0.6492
m16	Zacatecas (1era)	0.5157	0.2210	0.2193	0.3595	0.2646
m6	Búho (3era)	0.5082	0.5997	0.2677	0.9277	0.7120
m2	Acuexcómatl (3era)	0.5037	0.4342	0.3175	1	0.7490
m7	Don Nico (1era)	0.2185	0.8541	0.9119	0.9776	1
m11	Trojes (2da)	0.3714	0.3093	0.3858	0.8992	0.9510
m10	Tepenáhuatl (2da)	0.2470	0.2866	0.2372	0.9406	0.4733
m4	Bonilla (3era)	0.0985	0.1588	0.2565	0.4065	0.2991
m1	Acuexcómatl (1era)	0.2084	0.3179	0.6638	0.6988	0.6734
m3	Bonilla (1era)	0.0769	0.1566	0.2175	0.3225	0.1749
m9	Panteón (2da)	0.3523	0.3887	0.2378	0.7067	0.4824
m5	Búho (2da)	0.3791	0.3733	0.2677	0.9834	0.5566
m13	Acuexcómatl (4ta)	0.2661	0.3673	0.7934	0.7791	0.8134

* Datos tomados de las tesis de Hernández¹¹ y Granados¹² determinados como equivalentes de quercetina por gramo de muestra, en un ensayo colorimétrico en el rango del visible a 415 nm^{25,26}.

** Datos tomados de las tesis de Hernández¹¹ y Granados¹² determinados como equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra, en un ensayo colorimétrico en el rango del visible a 700 nm^{25,26}.

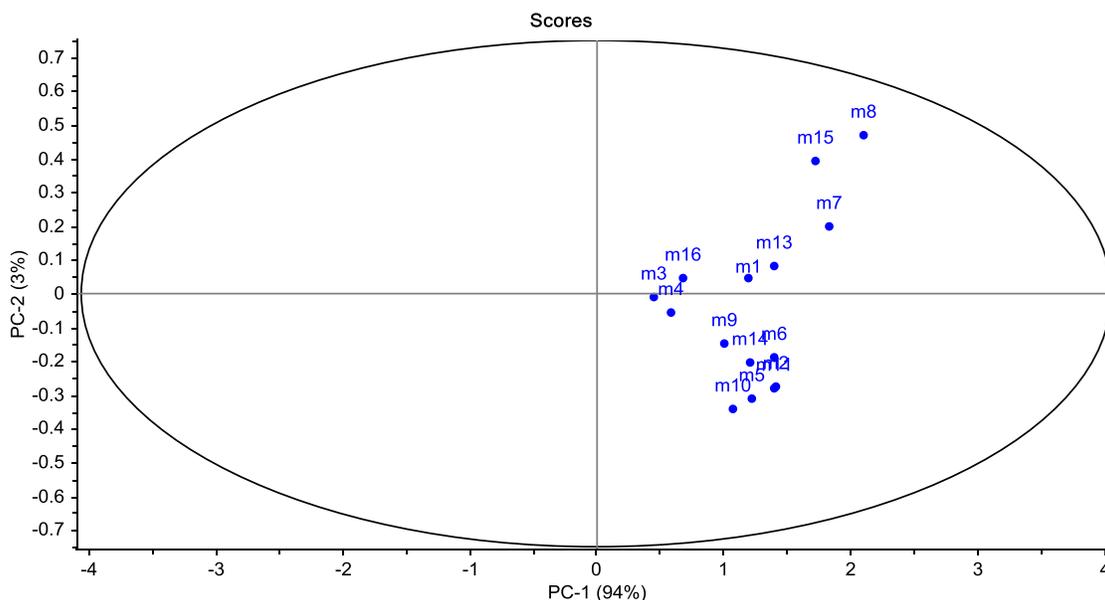


Figura 26.- Gráfica de PCA de los “scores” separados por PC1 y PC2 procedente de la actividad antioxidante de los extractos de propóleo.

La gráfica de *loadings* de actividades antioxidantes (**Figura 27**) muestra que los compuestos antioxidantes medidos por DPPH son los que predominan en PC1, mientras que los medidos por FRAP predominan en el PC2. En pocas palabras esto quiere decir que los compuestos medidos por DPPH y FRAP definirán la variabilidad de la actividad antioxidante de las muestras. Es sabido que los compuestos antioxidantes pueden actuar por múltiples mecanismos dependiendo del sistema de reacción, la fuente radicalaria o antioxidante; por tanto los ensayos evaluarán diferentes características de las muestras haciendo que éstos no sean comparables entre ellos. En la literatura hay un estudio sobre las correlaciones entre ensayos que miden la actividad antioxidante para determinar si son comparables entre sí, con resultados que indican que dichas correlaciones son solo de carácter medio,⁷³ lo que sugiere que los datos de actividad antioxidante medidos con diferentes ensayos no serán totalmente comparables unos con otros.

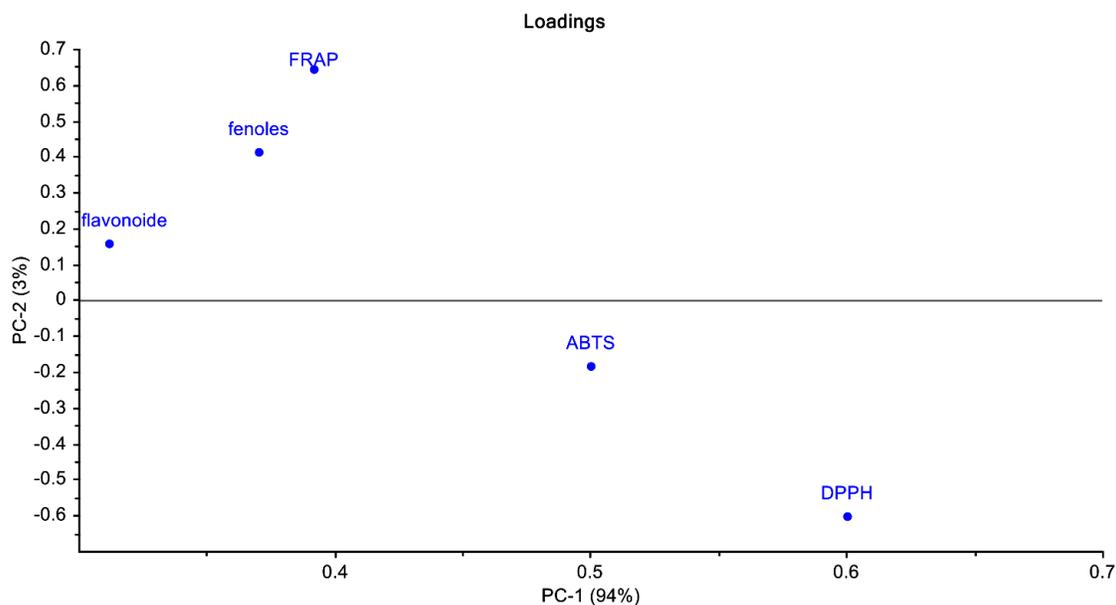


Figura 27.- Gráfico de PCA de los loadings procedente de la actividad antioxidante medida por cada ensayo

También se realizó una prueba de normalidad Hotelling T^2 de los datos de actividad antioxidante de las muestras para corroborar que no existieran muestras anómalas. La **Figura 28** muestra el gráfico de Hotelling T^2 para la prueba de normalidad de los datos de actividad antioxidante de cada muestra, y la cual muestra que todos los datos de actividad antioxidante de las muestras caen dentro de los límites normales.

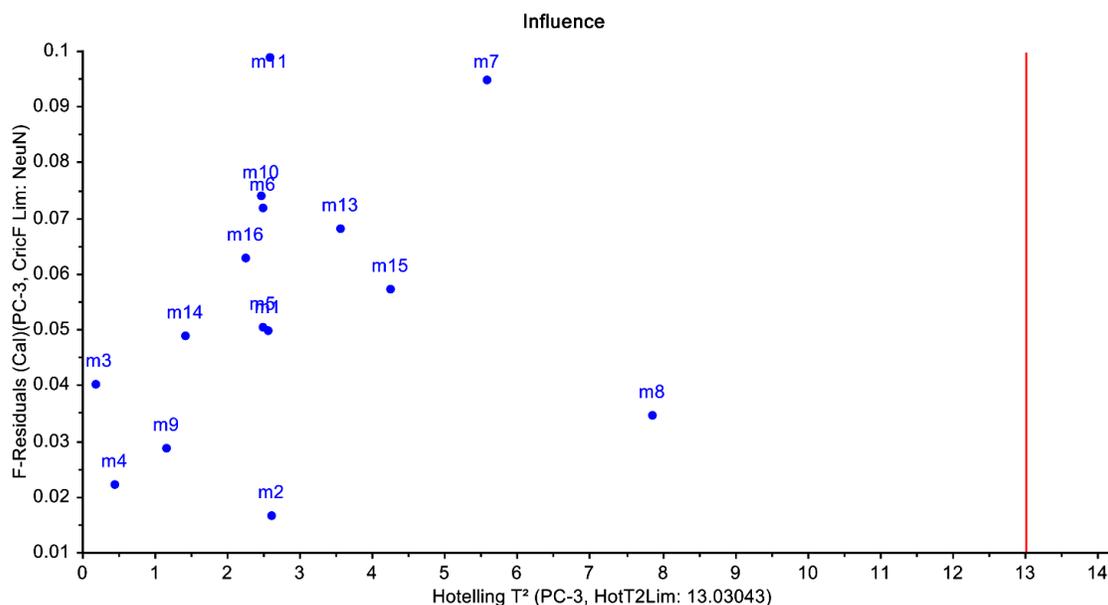


Figura 28.- Gráfica de Hotelling T^2 de los datos de actividad antioxidante con límite al 95% de confianza

4.3.2 Análisis de regresión PLS

Para poder predecir un conjunto de variables dependientes a partir de un gran conjunto de variables independientes se utilizó el método de PLS. Este método es de utilidad para crear un modelo que pueda predecir las actividades antioxidantes de futuras muestras a partir de los espectros.

Como ya se ha explicado, la actividad antioxidante de los propóleos depende de los compuestos presentes en cada muestra. Sin embargo, dependiendo del ensayo que se utilice los resultados dependerán de los compuestos específicos que dan respuesta a dicho ensayo. Por tanto, en función del ensayo que se utilice para medir la actividad antioxidante se evalúan diferentes regiones en el espectro de ^1H RMN.

La **Figura 29** muestra la gráfica de la varianza de las matrices de datos para la región del espectro ^1H RMN de 4.5 a 8.5 ppm para el ensayo de flavonoides



totales explicada en un 98% por el PC1 y PC2 con 7 factores, sin embargo se considera que 4 es el número de factores óptimo para este ensayo.

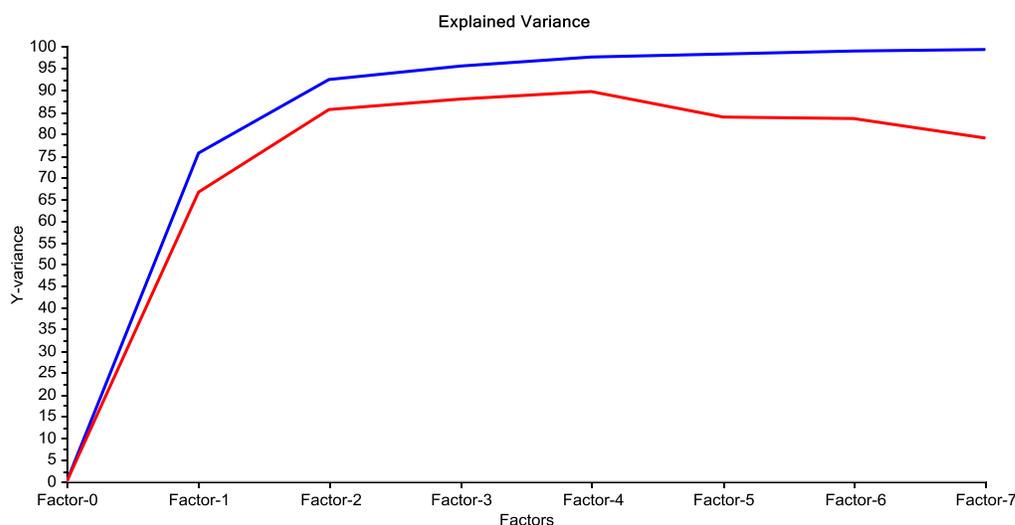


Figura 29.- Gráfica de la variabilidad de los modelos de PLS para la región del espectro ^1H RMN de 4.5 a 8.5 ppm del ensayo de flavonoides totales

En la **Figura 30** se muestra la gráfica de la curva de calibración (azul) y la curva de validación (rojo) con 4 factores para el ensayo de flavonoides totales correlacionado con la región espectral de 4.5 a 8.5 ppm (las gráficas de correlación de los demás ensayos se encuentran en el *Apéndice IV Gráficas de correlación de PLS*); se observa que el valor de la r^2 es muy cercana a 1 por tanto dicha correlación es muy fuerte. Sin embargo la línea de tendencia necesita un ajuste para que el valor de correlación se acerque más al valor real.

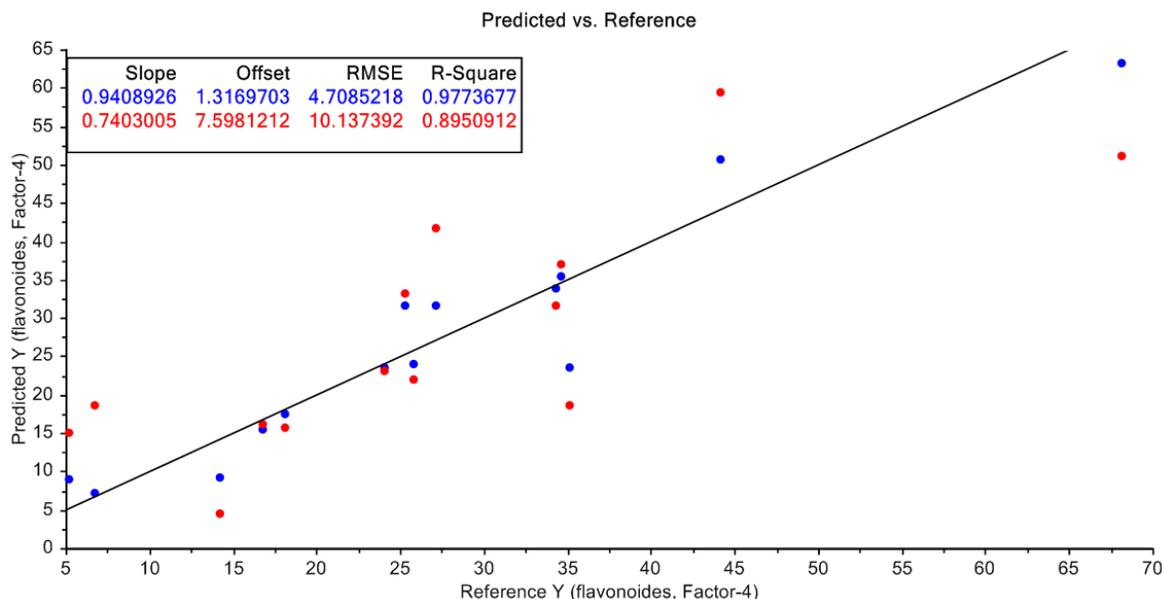


Figura 30.- Correlación del espectro ^1H RMN (4.5 a 8.5 ppm) con el ensayo de flavonoides totales. Gráfica de la curva de calibración (azul) y la curva de validación (rojo) con su línea de tendencia.

Para determinar el valor de la R^2 ajustado se utilizó en todos los casos la **Ecuación 4** que corresponde al coeficiente de concordancia, que es una versión “mejorada” del coeficiente de correlación,⁷⁴

$$r_c = \frac{(2S_{TR})}{S_T^2 + S_R^2 + (T - R)^2} \quad \text{Ecuación 4}$$

donde T es el promedio de los valores predichos y R es el promedio de los valores de referencia. Se utilizó dicha ecuación porque se trata de encontrar una correlación cuya recta tenga pendiente 1 ($m=1$) y ordenada al origen 0 ($b=0$), lo que indica que los resultados obtenidos son equivalentes a los predichos por el modelo. La región del espectro ^1H RMN de los extractos que mejor se correlaciona con el ensayo de flavonoides totales es la de 4.5 a 8.5 ppm con una $r^2= 0.885$ para la calibración y una $r^2= 0.722$ para la validación.



En la **Tabla 6** se muestran los coeficientes de correlación obtenidos al relacionar los resultados de los diferentes ensayos de actividad antioxidante con la región del espectro que presentó mejor correlación de entre las que se probaron (4.5 a 8.5 ppm, 6 a 8 ppm y 8.5 a 13.5 ppm). Al comparar los resultados entre los diferentes ensayos, se puede observar que el ensayo de fenoles totales presenta una mayor correlación, tanto para la calibración como para la validación. Esta correlación relativamente mayor se debe a que el modelo creado predice mejor los valores de las variables de respuesta.

Tabla 6.- Coeficientes de correlación para la curva de calibración y validación de cada uno de los ensayos de actividad antioxidante utilizados junto con su respectiva región del espectro.

Ensayo	Región del espectro (ppm)	r ² (calibración)	r ² (validación)
Flavonoides totales	4.5 – 8.5	0.8857	0.7226
Fenoles totales	4.5 – 8.5	0.8791	0.8225
FRAP	6 – 8	0.8550	0.6102
ABTS	6 – 8	0.8018	0.5416
DPPH	8.5 - 13.5	0.5244	0.2547

El modelo construido fue descrito para identificar las regiones espectrales que mayoritariamente contribuyen con los valores de actividad antioxidante. En la literatura hay un estudio semejante al que aquí se presenta, en el cual por medio de espectroscopía infrarroja y análisis de PLS ortogonal determinan una $r^2=0.88^{75}$ a partir de las correlaciones de los espectros IR con la actividad antioxidante de la planta *Pereskia bleo*. La similitud entre los resultados obtenidos en la literatura y en el presente trabajo puede probar la utilidad de usar la RMN y el método PLS para predecir actividades antioxidantes de propóleos mexicanos.



5 CONCLUSIONES

Se obtuvieron los extractos etanólicos de las muestras de propóleos conforme a la metodología reportada en la literatura y se adquirieron los espectros de ^1H -RMN con los parámetros optimizados.

Se establecieron diferencias de los perfiles espectroscópicos de las muestras de propóleos y se demostró que con la simple inspección del espectro de protón se puede obtener un estimado sobre la calidad de los mismos.

Mediante el estudio de PCA se determinó la normalidad de los datos y las muestras se agruparon en función de su origen geográfico y su actividad antioxidante.

Se encontraron modelos de PLS que correlacionan los ensayos que miden la actividad antioxidante en los propóleos con algunas regiones de los espectros de protón. La mejor correlación (calibración y validación) obtenida para el resultado de actividad antioxidante, corresponden al ensayo de flavonoides totales que correlaciona con la región de 4.5 a 8.5 ppm del espectro. Para las demás propiedades (fenoles totales, FRAP, ABTS y DPPH) se encontraron correlaciones menores, pero estadísticamente significativas.

Se ha demostrado que la RMN es una técnica útil, sencilla y que proporciona una gran información en muestras tan complejas como los propóleos; así como que la quimiometría es una disciplina fundamental para el análisis multivariante de una gran cantidad de información como la obtenida en los espectros de RMN de los propóleos ya que potencia la información que está “escondida” en las matrices de datos.



6 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Mahady, G. B., Global Harmonization of Herbal Health Claims, *Journal of Nutrition*, **2001**, 131, 112S-1123S.
- [2] Gomez-Caravaca, A. M.; Gomez-Romero, M.; Arraez-Roman, D.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A., Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees, *J Pharm Biomed Anal*, **2006**, 41, 1220-1234.
- [3] Li, F.; Awale, S.; Tezuka, Y.; Kadota, S., Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship, *Bioorg Med Chem*, **2008**, 16, 5434-5440.
- [4] Sforcin, J. M.; Bankova, V., Propolis: is there a potential for the development of new drugs?, *J Ethnopharmacol*, **2011**, 133, 253-260.
- [5] Lotti, C.; Campo Fernandez, M.; Piccinelli, A. L.; Cuesta-Rubio, O.; Marquez Hernandez, I.; Rastrelli, L., Chemical constituents of red Mexican propolis, *J Agric Food Chem*, **2010**, 58, 2209-2213.
- [6] Wang, B.-J.; Lien, Y.-H.; Yu, Z.-R., Supercritical fluid extractive fractionation – study of the antioxidant activities of propolis, *Food Chemistry*, **2004**, 86.
- [7] Righi, A. A.; Negri, G.; Salatino, A., Comparative chemistry of propolis from eight brazilian localities, *Evid Based Complement Alternat Med*, **2013**, 2013, 267878.
- [8] Xie, P.; Chen, S.; Liang, Y. z.; Wang, X.; Tian, R.; Upton, R., Chromatographic fingerprint analysis-a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine, *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1112, 171-180.
- [9] Chen, Y.; Xie, M. Y.; Yan, Y.; Zhu, S. B.; Nie, S. P.; Li, C.; Wang, Y. X.; Gong, X. F., Discrimination of *Ganoderma lucidum* according to geographical origin with near infrared diffuse reflectance spectroscopy and pattern recognition techniques, *Anal Chim Acta*, **2008**, 618, 121-130.
- [10] Cozzolino, D.; Fassio, A.; Restaino, E.; Fernandez, E.; La Manna, A., Verification of silage type using near-infrared spectroscopy combined with multivariate analysis, *J Agric Food Chem*, **2008**, 56, 79-83.
- [11] Świeboda, R.; Józwiak, A.; Józwiak, G.; Waksmundzka-Hajnos, M., Thin Layer Chromatography and Chemometric Studies of Selected *Potentilla* Species, *American Journal of Analytical Chemistry*, **2014**, 05, 1109-1120.
- [12] Dejaegher, B.; Alaerts, G.; Matthijs, N., Methodology to develop liquid chromatographic fingerprints for the quality control of herbal medicines, *Acta Chromatographica*, **2010**, 22, 237-258.
- [13] Fan, X. H.; Cheng, Y. Y.; Ye, Z. L.; Lin, R. C.; Qian, Z. Z., Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines, *Anal Chim Acta*, **2006**, 555, 217-224.
- [14] Farré, R.; Frasquet, I.; Sánchez, A., Propolis and human health, *Ars Pharmaceutica*, **2004**, 45, 21-43.
- [15] Gallardo-Velázquez, T.; Osorio-Revilla, G.; Loa, M. Z. d.; Rivera-Espinoza, Y., Application of FTIR-HATR spectroscopy and multivariate analysis to the quantification of adulterants in Mexican honeys, *Food Research International*, **2009**, 42, 313-318.
- [16] Garcia Bernal, M.; Medina Marrero, R.; Hidalgo Yanes, P. I.; Delgado Lasval, M. S.; Truffin Truffin, E.; Gomez Marrero, R., Evaluation of antimicrobial activity of propolis extracts for therapeutic purposes, *Latin American Journal of Pharmacy*, **2007**, 26, 100-102.
- [17] Bertelli, D.; Papotti, G.; Bortolotti, L.; Marcazzan, G. L.; Plessi, M., (1)H-NMR simultaneous identification of health-relevant compounds in propolis extracts, *Phytochem Anal*, **2012**, 23, 260-266.
- [18] Watson, D. G.; Peyfoon, E.; Zheng, L.; Lu, D.; Seidel, V.; Johnston, B.; Parkinson, J. A.; Fearnley, J., Application of principal components analysis to 1H-NMR data obtained from propolis samples of different geographical origin, *Phytochemical Analysis*, **2006**, 17, 323-331.



- [19] Kalogeropoulos, N.; Konteles, S. J.; Troullidou, E.; Mourtzinou, I.; Karathanos, V. T., Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus, *Food Chemistry*, **2009**, *116*, 452-461.
- [20] Kessler, W.; Oelkrug, D.; Kessler, R., Using scattering and absorption spectra as MCR-hard model constraints for diffuse reflectance measurements of tablets, *Anal Chim Acta*, **2009**, *642*, 127-134.
- [21] Liang, Y.-Z.; Xie, P.; Chan, K., Quality control of herbal medicines, *Journal of Chromatography B*, **2004**, *812*, 53-70.
- [22] Liu, F.; He, Y., Classification of brands of instant noodles using Vis/NIR spectroscopy and chemometrics, *Food Research International*, **2008**, *41*, 562-567.
- [23] Cuadros-Rodríguez, L.; Bosque-Sendra, J., Mediterranean chemometrics, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2011**, *399*, 1925-1927.
- [24] Masili, A.; Puligheddu, S.; Sassu, L.; Scano, P.; Lai, A., Prediction of physical-chemical properties of crude oils by ¹H NMR analysis of neat samples and chemometrics, *Magn Reson Chem*, **2012**, *50*, 729-738.
- [25] Hernández Camacho, C. *Caracterización de la composición química y del efecto biológico de propóleos recolectados en diferentes apiarios y estaciones del año*. Licenciatura. Publicada. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. 2013.
- [26] Granados Pineda, J. *Composición química de los extractos etanólicos de propóleos recolectados en los estados de Puebla y Guanajuato. Actividad antioxidante de los compuestos aislados*. Maestría. Inédita. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. 2014.
- [27] Bankova, V. S.; De Castro, S. L.; Marcucci, M. C., Propolis: recent advances in chemistry and plant origin, *Apidologie*, **2000**, *31*, 3-15.
- [28] Cuesta-Rubio, O.; Piccinelli, A. L.; Fernandez, M. C.; Hernández, I. M.; Rosado, A.; Rastrelli, L., Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: The brown, red, and yellow Cuban varieties of propolis, *J Agric Food Chem*, **2007**, *55*, 7502-7509.
- [29] Dobrowolski, J.; Vohora, S.; Sharma, K.; Shah, S.; Naqvi, S.; Dandiya, P., Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products., *Journal of ethnopharmacology*, **1991**, *35*, 77-82.
- [30] Marcucci, M. C., Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity, *Apidologie*, **1995**, *26*, 83-99.
- [31] Bankova, V.; Marcucci, M. C.; Simova, S.; Nikolova, N.; Kujumgiev, A.; Popov, S., Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis, *Zeitschrift fur Naturforschung Section C - Journal of Biosciences*, **1996**, *51*, 277-280.
- [32] Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Prasain, J. K.; Matsushige, K.; Saiki, I.; Kadota, S., Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities, *J Nat Prod*, **1998**, *61*, 896-900.
- [33] Oldoni, T. L. C.; Cabral, I. S. R.; d'Arce, M. A. B. R.; Rosalen, P. L.; Ikegaki, M.; Nascimento, A. M.; Alencar, S. M., Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis, *Separation and Purification Technology*, **2011**, *77*, 208-213.
- [34] Bankova, V.; Christov, R.; Popov, S.; Marcucci, M. C.; Tsvetkova, I.; Kujumgiev, A., Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis, *Fitoterapia*, **1999**, *70*, 190-193.
- [35] Tazawa, S.; Warashina, T.; Noro, T., Studies on the constituents of Brazilian propolis. II, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **1999**, *47*, 1388-1392.
- [36] Cuesta Rubio, O.; Cuellar Cuellar, A.; Rojas, N.; Velez Castro, H.; Rastrelli, L.; Aquino, R., A Polyisoprenylated Benzophenone from Cuban Propolis, *J Nat Prod*, **1999**, *62*, 1013-1015.
- [37] Piccinelli, A. L.; Campo Fernandez, M.; Cuesta-Rubio, O.; Marquez Hernandez, I.; De Simone, F.; Rastrelli, L., Isoflavonoids isolated from Cuban propolis, *J Agric Food Chem*, **2005**, *53*, 9010-9016.



- [38] Russo, A.; Cardile, V.; Sanchez, F.; Troncoso, N.; Vanella, A.; Garbarino, J. A., Chilean propolis: Antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines, *Life Sciences*, **2004**, *76*, 545-558.
- [39] Lotti, C.; Piccinelli, A. L.; Arevalo, C.; Ruiz, I.; Migliani De Castro, G. M.; Figueira Reis De Sa, L.; Tassis, A. C.; Ferreira-Pereira, A.; Rastrelli, L., Constituents of Hondurian propolis with inhibitory effects on *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance protein Pdr5p, *J Agric Food Chem*, **2012**, *60*, 10540-10545.
- [40] Kumazawa, S.; Hayashi, K.; Kajiya, K.; Ishii, T., Studies of the Constituents of Uruguayan Propolis, *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 4777-4782.
- [41] Tomás-Barberán, F. A.; García-Viguera, C.; Vit-Olivier, P.; Ferreres, F.; Tomás-Lorente, F., Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela, *Phytochemistry*, **1993**, *34*, 191-196.
- [42] A. Pino, J.; Marbot, R.; Delgado, A.; Zumárraga, C.; Sauri, E., Volatile Constituents of Propolis from Honey Bees and Stingless Bees from Yucatán, *Journal of Essential Oil Research*, **2006**, *18*.
- [43] Hernandez, J.; Goycoolea, F. M.; Quintero, J.; Acosta, A.; Castañeda, M.; Dominguez, Z.; Robles, R.; Vazquez-Moreno, L.; Velazquez, E. F.; Astiazaran, H.; Lugo, E.; Velazquez, C., Sonoran propolis: Chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines, *Planta Med*, **2007**, *73*, 1469-1474.
- [44] Papotti, G.; Bertelli, D.; Bortolotti, L.; Plessi, M., Chemical and functional characterization of Italian propolis obtained by different harvesting methods, *J Agric Food Chem*, **2012**, *60*, 2852-2862.
- [45] Greenway, W.; Scaysbrook, T.; Whatley, F. R., Phenolic analysis of bud exudate of *Populus Lasiocarpa* by GC/MS, *Phytochemistry*, **1988**, *27*, 3513-3515.
- [46] Melliou, E.; Chinou, I., Chemical analysis and antimicrobial activity of Greek propolis, *Planta Med*, **2004**, *70*, 515-519.
- [47] Markham, K. R.; Mitchell, K. A.; Wilkins, A. L.; Daldy, J. A.; Lu, Y., HPLC and GC MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis, *Phytochemistry*, **1995**, *42*, 205-211.
- [48] Benzie, I. F. F.; Strain, J. J., The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay, *Analytical Biochemistry*, **1996**, *239*, 70-76.
- [49] Dasgupta, N.; De, B., Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study, *Food Chemistry*, **2007**, *101*, 471-474.
- [50] Kosalec, I.; Pepeljnjak, S.; Bakmaz, M.; Vladimir-Knežević, S., Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products, *Acta Pharmaceutica*, **2005**, *55*, 423-430.
- [51] Cvek, J.; Medić-Šarić, M.; Jasprica, I.; Mornar, A., High-performance thin-layer chromatographic analysis of the phenolic acid and flavonoid content of Croatian propolis samples, *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, **2007**, *20*, 429-435.
- [52] Marquez Hernandez, I.; Cuesta-Rubio, O.; Campo Fernandez, M.; Rosado Perez, A.; Montes de Oca Porto, R.; Piccinelli, A. L.; Rastrelli, L., Studies on the constituents of yellow Cuban propolis: GC-MS determination of triterpenoids and flavonoids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010**, *58*, 4725-4730.
- [53] Medana, C.; Carbone, F.; Aigotti, R.; Appendino, G.; Baiocchi, C., Selective analysis of phenolic compounds in propolis by HPLC-MS/MS, *Phytochemical Analysis*, **2008**, *19*, 32-39.
- [54] Cao, Y. H.; Wang, Y.; Yuan, Q., Analysis of Flavonoids and Phenolic Acid in Propolis by Capillary Electrophoresis, *Chromatographia*, **2004**, *59*, 135-140.
- [55] Shleev, S. V.; Chekanov, S. A.; Koroleva, O. V.; Stepanova, E. V.; Telegin, Y. A.; Sen'kina, Z. E., Determination of polyphenolic complex in wines by electrochemical methods and using the enzymes tyrosinase and laccase, *Applied Biochemistry and Microbiology*, **2004**, *40*, 304-309.
- [56] Stevanato, R.; Fabris, S.; Momo, F., New enzymatic method for the determination of total phenolic content in tea and wine, *J Agric Food Chem*, **2004**, *52*, 6287-6293.



- [57] López, M.; Martínez, F.; Del Valle, C.; Orte, C.; Miró, M., Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, **2001**, *922*, 359-363.
- [58] Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K., Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *J Agric Food Chem*, **2005**, *53*, 4290-4302.
- [59] Roginsky, V.; Lissi, E. A., Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food, *Food Chemistry*, **2005**, *92*, 235-254.
- [60] Papotti, G.; Bertelli, D.; Plessi, M.; Rossi, M. C., Use of HR-NMR to classify propolis obtained using different harvesting methods, *International Journal of Food Science & Technology*, **2010**, *45*, 1610-1618.
- [61] da Silva, J. F. M.; de Souza, M. C.; Matta, S. R.; de Andrade, M. R.; Vidal, F. V. N., Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities, *Food Chemistry*, **2006**, *99*, 431-435.
- [62] Brereton, R. G. *Applied Chemometrics for Scientists*; John Wiley & Sons Ltd; West Sussex, England, 2007; Vol. 1.
- [63] Cheng, H.; Qin, Z. H.; Guo, X. F.; Hu, X. S.; Wu, J. H., Geographical origin identification of propolis using GC-MS and electronic nose combined with principal component analysis, *Food Research International*, **2013**, *51*, 813-822.
- [64] Moț, A. C.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Sârbu, C., Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-vis spectroscopic data, *Journal of Food Composition and Analysis*, **2011**, *24*, 516-522.
- [65] Martens, H.; Næs, T. *Multivariate Calibration*; Wiley; Chicester, 1989.
- [66] Guido, F. P., qNMR ? a versatile concept for the validation of natural product reference compounds, *Phytochemical Analysis*, **2001**, *12*.
- [67] Smolinska, A.; Blanchet, L.; Buydens, L.; Wijmenga, S., NMR and pattern recognition methods in metabolomics: from data acquisition to biomarker discovery: a review, *Anal Chim Acta*, **2012**, *750*, 82-97.
- [68] Savorani, F.; Tomasi, G.; Engelsen, S., icoshift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra, *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)*, **2010**, *202*, 190-202.
- [69] Craig, A.; Cloarec, O.; Holmes, E.; Nicholson, J.; Lindon, J., Scaling and normalization effects in NMR spectroscopic metabonomic data sets, *Analytical Chemistry*, **2006**, *78*, 2262-2267.
- [70] Dieterle, F.; Ross, A.; Schlotterbeck, G.; Senn, H., Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in 1H NMR metabonomics, *Analytical Chemistry*, **2006**, *78*, 4281-4290.
- [71] Webb-Robertson, B.-J. M.; Lowry, D.; Jarman, K.; Harbo, S.; Meng, Q.; Fuciarelli, A.; Pounds, J.; Lee, K., A study of spectral integration and normalization in NMR-based metabonomic analyses, *J Pharm Biomed Anal*, **2005**, *39*, 830-836.
- [72] Anastasiadi, M.; Zira, A.; Magiatis, P.; Haroutounian, S. A.; Skaltsounis, A. L.; Mikros, E., 1H NMR-based metabonomics for the classification of Greek wines according to variety, region, and vintage. Comparison with HPLC data, *J Agric Food Chem*, **2009**, *57*, 11067-11074.
- [73] Palomino G, L. R.; García P, C. M.; Gil G, J. H.; Rojano, B. A.; Durango R, D. L., Determination of phenolic content and evaluation of antioxidant activity of propolis from Antioquia (Colombia), *Vitae*, **2009**, *16*, 388-395.
- [74] Magari, R. T., Statistics for laboratory method comparison studies., *Biopharm-Eugene*, **2002**, *15*, 28-34.
- [75] Sharif, K. M.; Rahman, M. M.; Azmir, J.; Khatib, A.; Hadijah, S.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Zaidul, I. S. M., Orthogonal Partial Least Squares Model for Rapid Prediction of Antioxidant Activity of Pereskia bleo by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Analytical Letters*, **2014**, *47*, 2061-2071.



Apéndices

I. Fundamentos Teóricos de la Resonancia Magnética Nuclear

Bases de la Resonancia Magnética Nuclear

La RMN es una poderosa herramienta de análisis no destructiva que se basa en la absorción de energía de radiación electromagnética (en la región de radiofrecuencias) por parte de ciertos tipos de núcleos atómicos con momento magnético no nulo ($\mu \neq 0$). Dicha absorción ocurre a frecuencias únicas que dependen del tipo de núcleo y del ambiente químico en el que se encuentra y sólo tiene lugar en presencia de un campo magnético intenso y constante.

El momento magnético viene dado por: $\mu = \gamma I$, siendo I el momento angular de spin y γ la constante giromagnética. En circunstancias normales, estos momentos no tienen una orientación fija por lo que no hay un campo magnético resultante. Sin embargo, cuando están en presencia de un campo magnético externo B_0 , se alinean con dicho campo en las direcciones dictadas por las leyes de la física cuántica y describen un movimiento de precesión, a una frecuencia proporcional a dicho campo magnético, llamada frecuencia de Larmor. En RMN cuando los núcleos están alineados se les aplica un pulso de radiofrecuencia (la misma frecuencia a la que precesan), perpendicular al campo magnético externo, para sacarlos de su estado de equilibrio y observar la señal generada cuando regresan a éste.

El núcleo de hidrógeno está formado sólo por un protón, genera un momento magnético grande, y es muy abundante en la naturaleza, por lo que es uno de los átomos más utilizados para la extracción de las características de las moléculas de las que forma parte.



Un equipo de RMN consta de varios componentes, un imán superconductor que genere un campo magnético estable, intenso y homogéneo, para orientar los espines nucleares; una sonda compuesta de las bobinas para la excitación y detección de los espines; un transmisor de pulsos de radiofrecuencia para generar la excitación de los núcleos; un amplificador para detectar la respuesta, un filtro digital que convierta la señal en información que una computadora pueda utilizar y por último una computadora que controle el sistema para el procesamiento de la señal (**Figura 31**).



Figura 31.- Equipo de RMN Bruker 400 MHz Avance III.

Magnetización macroscópica

Los momentos magnéticos que crean los núcleos con espín pueden verse como pequeños vectores magnéticos que, en condiciones normales (sin aplicar ningún campo), tienen direcciones aleatorias. Cuando se aplica un campo magnético B_0 , un núcleo con $I=1/2$ tendrá dos orientaciones, paralela (estado α) o antiparalela (estado β) al B_0 del imán, que es la situación más estable (**Figura 32**).

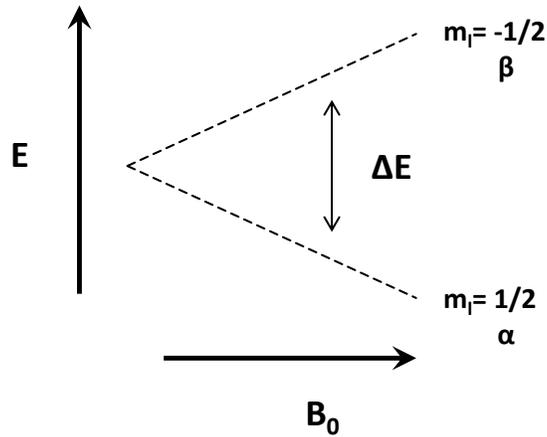


Figura 32.- Estados α y β de energía del espín nuclear $\frac{1}{2}$.

Los vectores, además de rotar sobre sí mismos, continúan precesando a la frecuencia de Larmor en la dirección del campo magnético estático, en realidad, el vector momento magnético no es paralelo al campo, sino que dibuja un cono (**Figura 33a**). En estas condiciones, sin ningún aporte adicional de energía, hay una mayor cantidad de espines en estado de baja energía (α), en comparación con los espines en estado de alta energía (β). La proporción entre unos y otros sigue la estadística de Boltzmann (**Ecuación 5**). La composición de todos los vectores da lugar a una resultante a lo largo del eje z : la denominada magnetización macroscópica (**Figura 33b**).

$$\frac{N_1}{N_2} = e^{\frac{\Delta E}{K_B T}}$$

Ecuación 5

ΔE : Diferencia de energías entre estados

K_B y T son la constante de Boltzmann y la temperatura respectivamente.

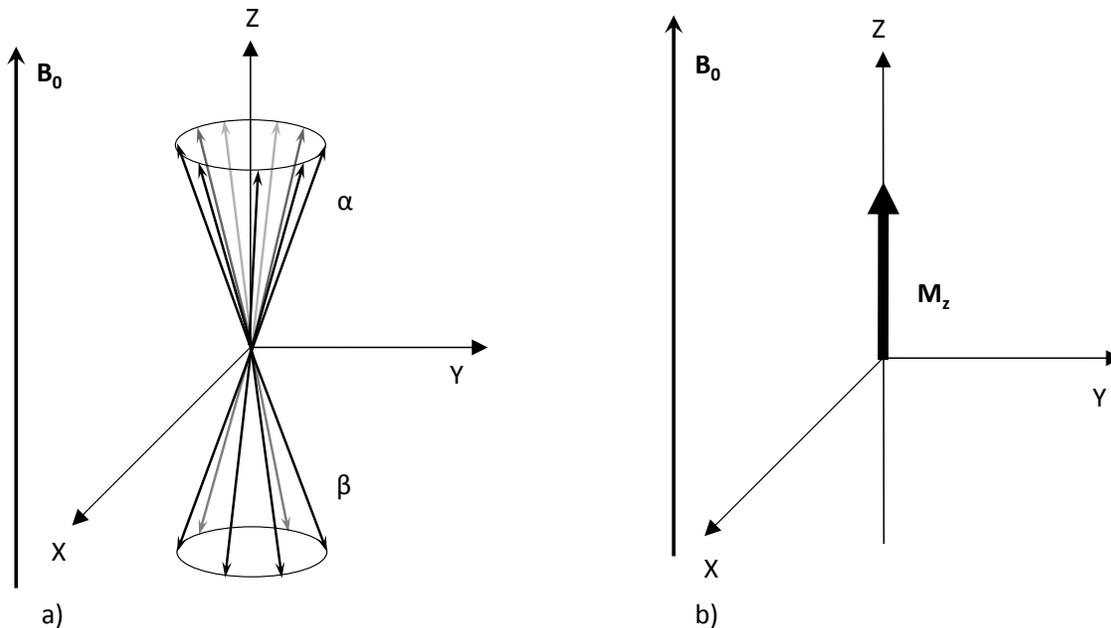


Figura 33.- a) Vectores paralelos y antiparalelos de los momentos magnéticos de los espines nucleares. b) Composición total vectorial de los momentos magnéticos nucleares.

Excitación

Una vez se han situado los núcleos bajo el efecto del campo magnético B_0 , se puede hacer que un vector magnético pase de un estado de baja energía a un estado de alta energía aportándole la energía que le falta, y a la inversa. Este cambio de estados de energía se consigue aplicando un campo magnético oscilante B_1 de algunos MHz en las proximidades de la muestra. Cuando el tiempo en que se aplica esta corriente es suficientemente corto y la potencia alta, se produce lo que se llama un pulso de radiofrecuencia B_1 . Un pulso corto produce radiación policromática es decir contiene un rango de frecuencias (por el principio de incertidumbre Heisenberg). Los pulsos que se utilizan en RMN suelen estar entre unos pocos micro- a mili-segundos y excitan anchuras de banda desde Hz a decenas de kHz dentro de la banda de los MHz. Cuando el rango de frecuencias de un pulso policromático está dentro de las diferencias de energía que separan dos niveles energéticos de un determinado tipo de espín nuclear (una estrecha región dentro del rango de los MHz), se producen transiciones que alteran la diferencia de población de los niveles energéticos del espín respecto al equilibrio



(excitación). En estas condiciones, mientras dura el pulso se produce la rotación de la magnetización neta que estaba inicialmente alineada con la dirección del campo B_0 (eje z por convenio). Cuando la radiofrecuencia cesa, la magnetización puede quedar en una situación fuera del equilibrio con una cierta componente de magnetización transversal neta que precesa en el *plano xy* (Figura 34). La magnetización transversal *xy* precesa a la frecuencia de Larmor induciendo una pequeña corriente de RF en la propia bobina que generó el pulso. Esta corriente después de preamplificarse será digitalizada para dar lugar a la FID (Free Induction Decay) y al propio espectro de RMN.

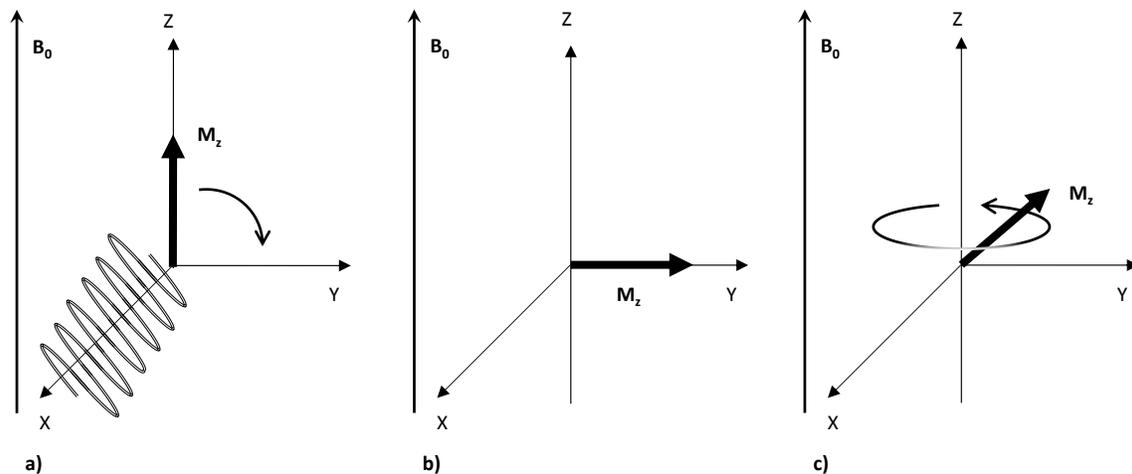


Figura 34.- a) Aplicación pulso de radiofrecuencia en el eje x. b) Magnetización en el eje y. c) Magnetización regresando a su estado de equilibrio.

Mecanismos de relajación

La desviación del sistema del equilibrio, como consecuencia de la introducción de un pulso de radiofrecuencia, provoca la desaparición de la magnetización longitudinal y la aparición de magnetización transversal, en el *plano xy*. Cuando el pulso de radiofrecuencia ha cesado, el sistema tiende a volver al equilibrio. De este modo, la magnetización transversal del *plano xy* gira a la frecuencia de Larmor en forma de cono hasta llegar de nuevo al eje z. La bobina excitadora, que ahora ha cambiado a receptora, detecta este proceso de relajación al equilibrio mediante una radiofrecuencia que la magnetización ha inducido. Esta



radiofrecuencia es detectada en la bobina y convertida en una señal medible. Es durante esta vuelta al equilibrio cuando se hace la medida de la señal de resonancia (**Figura 35**).

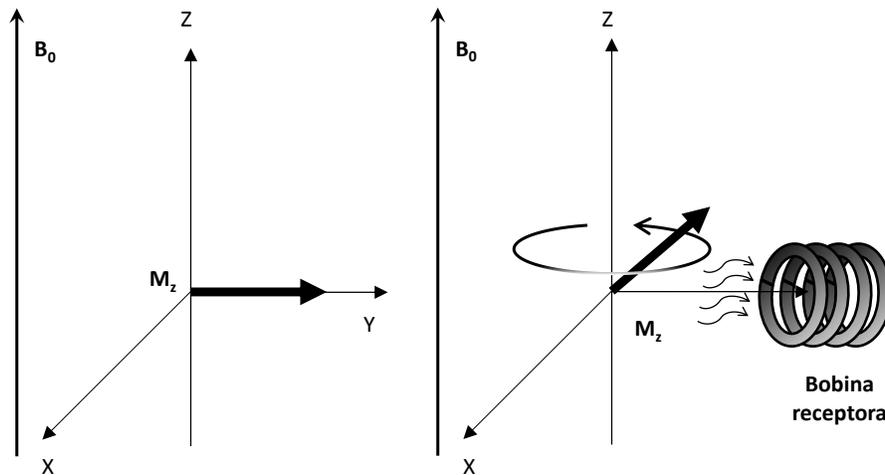


Figura 35.- Vector de magnetización transversal en proceso de relajación. Detección de la radiofrecuencia inducida a la bobina receptora.

Es imposible que el campo magnético creado por el imán sea totalmente homogéneo. Las desviaciones de esta homogeneidad hacen que los núcleos “sientan” un campo ligeramente distinto dependiendo de su localización en el tubo de muestra. Así, los vectores magnéticos de los núcleos individuales, que componen la magnetización transversal del *plano xy*, se abrirán en abanico, disminuyendo la intensidad de la magnetización transversal. De este modo, la inhomogeneidad del imán marca otro proceso, regulado por un tiempo T_2 , por el que la magnetización desaparece del *plano xy* con el tiempo.

En resumen, la magnetización macroscópica va desapareciendo del *plano xy* y recupera su posición inicial en el *eje z* mediante dos mecanismos distintos, regulados por los tiempos de relajación T_1 (longitudinal) y T_2 (transversal).



Tiempo de adquisición de la FID

La magnetización transversal en el *plano xy*, la cual gira a la frecuencia de resonancia de los núcleos y que decae con el tiempo, induce una radiofrecuencia en la bobina receptora. Esta señal es almacenada en la estación de trabajo y es la denominada FID. La FID son señales de radiofrecuencia que se han convertido (digitalizado) en miles de puntos (TD) durante el tiempo de medida, denominado tiempo de adquisición (*aq*). La FID está constituida por una composición de señales senoidales, que se procesan mediante la aplicación de la función matemática de la transformada de Fourier para obtener las señales del espectro de RMN.

En RMN es habitual utilizar pulsos cortos que son capaces de excitar múltiples frecuencias a la vez, por esta razón la FID en general va a ser una suma de todas las oscilaciones producidas por los diferentes espines excitados por el pulso. Esta FID se puede analizar mediante un algoritmo matemático (por ejemplo la transformada de Fourier) para desglosar por separado cada una de sus frecuencias características, esto da lugar al espectro de RMN.

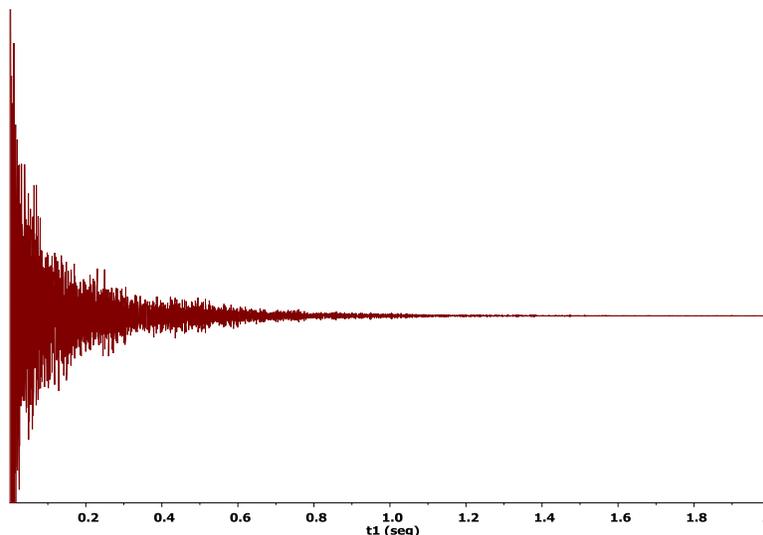


Figura 36.- La señal que se detecta, FID, es una señal oscilante que contiene todas las señales del espectro y decae hasta hacerse cero.



Fundamentos prácticos

Sistema de sintonía y ajuste de la sonda

La sonda es la parte del espectrómetro que se encarga de mantener las bobinas transmisora y receptora lo más cerca posible de la muestra para detectar las señales débiles de radiofrecuencia. Para que las bobinas sean capaces de transmitir y recibir eficientemente dichas señales, es necesario que las bobinas estén sintonizadas y ajustadas al núcleo en estudio. La optimización de la sintonía y el ajuste de las bobinas se obtiene variando la capacitancia de sus capacitores. Se deben optimizar estas dos características para tener la máxima sensibilidad posible.

El proceso de sintonizar consiste en aplicar ondas de radiofrecuencias a la sonda, monitorear la respuesta y hacer ajustes en los capacitores para alcanzar la frecuencia deseada. Modificar el capacitor de sintonía produce que se sintonice la sonda a la frecuencia del núcleo en cuestión, esto es análogo a sintonizar una estación de radio en un radio común. Por otro lado, modificar el capacitor de ajuste produce que se iguale la resistencia efectiva del transmisor y la sonda, para que la energía de radiofrecuencia transmitida y recibida sea la mayor posible. En la **Figura 37** se muestra el ajuste y sintonía de una sonda con la frecuencia del transmisor.

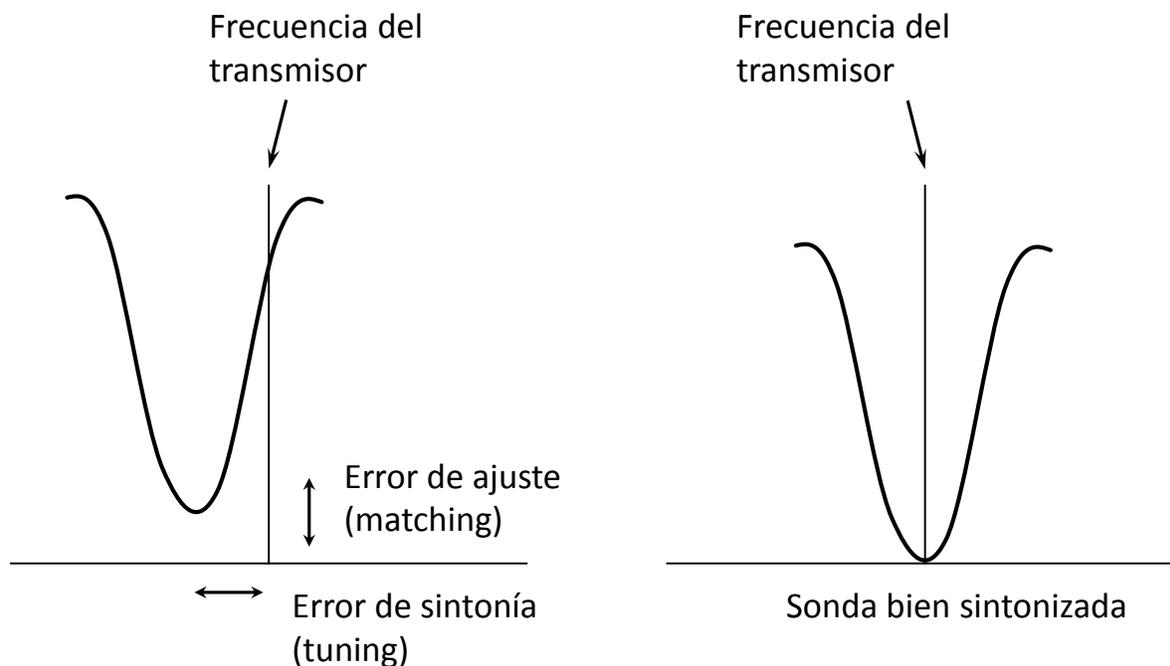


Figura 37.- Se ejemplifica la forma en la que el equipo debe estar en correcta sintonía y ajuste con la muestra.

Sistema de *lock* compensación de fluctuaciones de campo (*drift*)

Para conseguir espectros de RMN de alta resolución, especialmente con experimentos que requieren promediar un número de escaneos y ciclado de fase se necesita un campo magnético constante en el tiempo y espacialmente homogéneo. El sistema de *lock* sirve para asegurar la constancia del campo magnético B_0 con el tiempo. El campo magnético puede variar con el tiempo por varias razones como el envejecimiento del imán, movimiento de metales en las proximidades del imán, y fluctuaciones de temperatura. Estas pequeñas fluctuaciones de campo denominadas *drifts*, son compensadas durante un experimento de RMN por el sistema de *lock*.

El receptor y el transmisor de *lock* permiten mantener la relación campo/frecuencia constante. Su función consiste en asegurar que el campo magnético que experimenta la muestra sea constante. Esto se consigue utilizando el propio



fenómeno de la RMN con otra especie nuclear distinta de la que se está observando. En este sentido el *lock* de deuterio es el más utilizado. Así, cuando se hace el *lock* en un aparato, se observa continuamente la señal de RMN de deuterio, las fluctuaciones en su posición de resonancia permiten conocer cuánto ha fluctuado el campo magnético B_0 en cada momento y se procede automáticamente a la corrección oportuna en tiempo real del campo (a través de una corriente adicional) de forma que la posición de resonancia de esta señal permanezca constante y permite recalibrar la frecuencia de resonancia exacta del espectrómetro para los demás núcleos. La señal de deuterio normalmente proviene del disolvente deuterado que se añade a la muestra.

Sistema de ajuste de la homogeneidad espacial del campo (*shimming*)

Se debe ajustar la homogeneidad del campo magnético del imán, concretamente en la zona donde se localiza la muestra, mediante los denominados *shims*, que son pequeñas bobinas dispuestas en determinadas direcciones del espacio que introducen una pequeña corriente que crea un gradiente de campo adicional que contrarresta al gradiente creado por la inhomogeneidad en la zona de la muestra. Cuando se optimizan todos los *shims* en las distintas direcciones del espacio se consigue llegar a una o varias de las siguientes situaciones: maximizar la intensidad de *lock* de deuterio, maximizar la longitud total de la FID del espectro de protón y obtener simetría de las señales del espectro de protón.

Hay *shims* de bajo orden que deben ajustarse cada vez que se introduce una nueva muestra en el espectrómetro. Los hay de dos tipos: *shims* axiales, que suelen ajustarse con rotación de la muestra y *shims* transversales que deben ajustarse sin rotación de la muestra ya que ésta eliminaría la inhomogeneidad en el plano transversal.

Existe otro tipo de *shim* que son los de alto orden, sin embargo éstos no varían significativamente durante la vida del imán, ni cambian por la introducción de



diferentes muestras por lo que sólo debe ajustarse la primera vez que se instala el espectrómetro junto con la sonda.

Para encontrar la máxima homogeneidad se deben variar los *shims* de bajo orden y ajustarlos de una manera interactiva observando su efecto sobre la intensidad de *lock* o sobre la señales del espectro.

Los equipos relativamente actuales (desde aprox. 1992) suelen disponer de un sistema generador de gradientes de campo magnético y pueden realizar este proceso de *shimming* de una manera automática.



II. Fundamentos de Quimiometría

Bases de la Quimiometría

La quimiometría es una disciplina que considera todos aquellos procesos que transforman señales analíticas y datos complejos en información. La quimiometría utiliza métodos de origen matemático, estadístico y otros procedentes del campo de la lógica formal para conseguir sus fines. Aunque sus métodos y herramientas provienen de otras disciplinas, como las matemáticas y la estadística, claramente los fines de la quimiometría están ligados a la química y su éxito depende de los problemas químicos que sea capaz de resolver.

La quimiometría trata de resolver problemas experimentales de instrumentación o metodología. Éstos problemas pueden ser descriptivos o predictivos. En las aplicaciones descriptivas, las propiedades de los sistemas químicos se modelan con la intención de aprender las relaciones subyacentes y la estructura del sistema es decir, el modelo de la comprensión e identificación. En las aplicaciones predictivas, las propiedades de los sistemas químicos se modelan con la intención de predecir nuevas propiedades o comportamientos de interés. En ambos casos, los conjuntos de datos pueden ser pequeños pero son a menudo muy grandes y muy complejos, que involucran a miles de variables, y miles de observaciones.

Los conjuntos de datos ya sean obtenidos por métodos espectroscópicos o cromatográficos, proporcionan datos analíticos sobre los muchos componentes de una muestra. Actualmente en química analítica lo que la quimiometría permite es la comparación de conjuntos de datos de varias muestras considerando todas las variables de cada muestra simultáneamente y que obtiene como resultado datos multivariantes, es por eso que se considera una técnica de análisis multivariante.

Cuando sólo se miden 2 variables se tendrá entonces un gráfico de 2 dimensiones donde las coordenadas del punto de intersección de las variables dan los valores



que tienen las variables. Este punto también se puede definir como vector de datos. Explicado lo anterior, se puede decir que si se miden múltiples variables habrá un gráfico de tantas dimensiones como variables haya y las coordenadas de la intersección de las tantas variables serán los valores para cada variable. Es por este análisis más complejo que hoy en día se utilicen computadoras para encontrar relaciones entre los datos.

Un problema inevitable en el análisis multivariante es que la cantidad de datos dificulta su manipulación. Como ejemplo se puede mencionar que un espectro tiene cientos, sino es que miles, de medidas de intensidad y a su vez contiene una matriz de correlación entre estos datos. Debido a este problema, los métodos de análisis multivariante buscan reducir los datos de cierta manera. En la **Figura 38** se aprecia la matriz **X** la cual se descompone o reduce en matrices de menor tamaño que, son más fáciles de interpretar y entender, con el respectivo error aleatorio de la matriz. El nombre que reciben estas matrices de datos reducidas es el de factores o componentes principales. (PC)

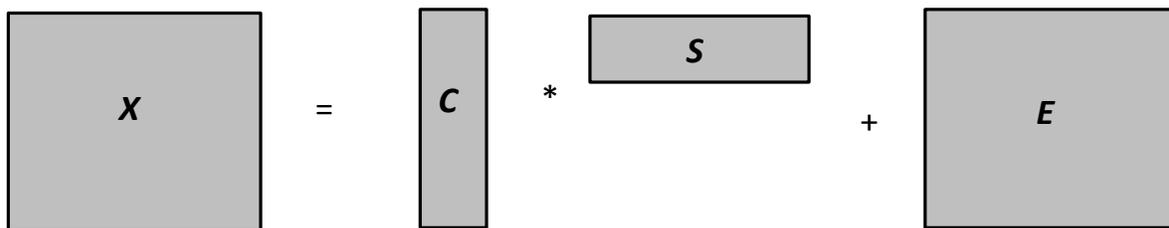


Figura 38.- Representación de una matriz de datos X que se reduce a matrices más pequeñas que contienen información relevante más su error aleatorio.

Reconocimiento de pautas

Durante la última década, el reconocimiento de pautas o patrones ha sido uno de los puntos de crecimiento más rápido en la quimiometría. Esto ha sido catalizado por el aumento de las capacidades de los instrumentos automatizados, tales como la RMN, para obtener grandes cantidades de datos, y, paralelamente, el crecimiento significativo de las solicitudes especialmente mediciones de análisis químico de extractos de alimentos. La interpretación de estos conjuntos de datos



multivariantes ha requerido la aplicación y desarrollo de nuevas técnicas quimiométricas como el reconocimiento de patrones.

El reconocimiento de patrones es la rama que hace inferencias basadas en la información contenida en los conjunto de datos. La principal forma para el reconocimiento de pautas o patrones es la clasificación. En cuanto a ésta, se recogen datos y se les asigna etiquetas discretas. La clasificación de muestras en grupos se puede percibir como escaneo rápido del comportamiento de las muestras. Existen diferentes métodos para el reconocimiento de pauta de los cuales el análisis exploratorio de datos es el más común y el que más se utiliza en química analítica.

Análisis exploratorio de datos

El hombre tiene una percepción del mundo a través del proceso de reconocimiento de pautas, es decir clasifica las cosas de acuerdo con sus respectivas características. Lamentablemente esta habilidad se restringe solamente a un espacio de tres dimensiones, sin embargo muchos de los problemas prácticos en la química analítica son multidimensionales. El análisis exploratorio de datos se basa en el tratamiento estadístico de los conjuntos de datos para resumir sus principales características y representar este tratamiento con modelos visuales para su comprensión e interpretación. Emplea una variedad de técnicas, principalmente gráficas, para maximizar retrospectión de los datos, extraer variables importantes, detectar valores atípicos y anómalos, desarrollar modelos parsimoniosos y determinar valores óptimos de los factores. La idea de hacer el análisis exploratorio consiste en que mientras el analista conozca mejor los datos, podrá usarlos más eficazmente para desarrollar un modelo que describa el comportamiento de todo el conjunto de datos El análisis exploratorio de datos utiliza frecuentemente la técnica de análisis de componentes principales.



Análisis de Componentes Principales

El PCA es una técnica de análisis multivariante exploratorio de datos que reduce la cantidad de datos cuando existe evidencia de correlación entre ellos mismos. El PCA se utiliza para encontrar PCs que sean combinaciones lineales de las variables originales observadas.

Es importante resaltar el hecho de que el concepto de mayor información se relaciona con el de mayor variabilidad o varianza, es decir, cuanto mayor sea la varianza de los datos se considera que existe mayor información. Los PCs se generan de tal manera que el primer PC explica la mayor parte de la variabilidad que hay entre los datos, el segundo PC explica la siguiente mayor variabilidad y así sucesivamente hasta los últimos los cuales describen variaciones en los datos debidas al ruido, de tal manera que el analista debe ser cuidadoso al escoger el número de PCs que mejor modele la varianza explicada sin incluir los que describen la variabilidad generada por el ruido. Por tanto, cuando se encuentra una correlación significativa el número de PCs será evidentemente menor que las variables originales.

Usualmente las características del PCA son los *scores* que se relacionan con las similitudes y diferencias de las muestras y los *loadings* los cuales se relacionan con las variables.

Introducción a la calibración

La calibración es una de las tareas más importantes en el análisis cuantitativo. El tema sigue siendo ampliamente estudiado y discutido en la literatura de quimiometría al mismo tiempo que se estudian los sistemas químicos cada vez más complejos. Los procedimientos de cálculo tienen que ver con la descripción de las relaciones cuantitativas entre dos o más variables. En particular, los analistas están interesados en el estudio de cómo las variables independientes o de respuesta medidas varían en función de una sola variable dependiente. La



clase de técnicas estudiadas se conoce como análisis de regresión. El objetivo principal en la realización de análisis de regresión es desarrollar un modelo matemático adecuado para propósitos descriptivos o predictivos. El modelo puede utilizarse para confirmar una teoría sobre la relación entre variables o que puede ser utilizado para predecir algunas otras. No todas las correlaciones se pueden describir adecuadamente utilizando el modelo lineal, sin embargo, funciones más complejas, tales como ecuaciones polinómicas de orden cuadráticas y superior, pueden ser obligados a ajustarse a los datos experimentales. Por último, más de una variable se puede medir. Por ejemplo, los procedimientos de calibración de muchas longitudes de onda están encontrando cada vez más aplicaciones en espectrometría analítica y análisis de regresión multivariante.

Calibración univariante

Éste es el enfoque más ingenuo y sencillo de calibración, sin embargo es el más ampliamente usado. En este tipo de calibración se involucran una variable para calibrar y otra variable a predecir, es decir, una variable independiente llamada x y otra variable dependiente llamada y . El objetivo de la calibración es usar la información de x para poder predecir los datos en y . En los métodos univariantes se define una única variable experimental a partir de una serie de características relativas a una única muestra. Antes del desarrollo de la quimiometría se solía aplicar pruebas univariantes para extraer información de los datos, sin embargo hoy en día la quimiometría permite nuevos enfoques en la extracción de información.

Calibración clásica

El método de calibración clásica es el método por el cual se relaciona una variable con otra, usualmente se representan con un eje vertical y la otra con el eje horizontal. Una vez calculados los coeficientes podemos predecir la respuesta en una muestra problema. Así, se obtiene una ecuación de la forma:



$$y = b_0 + b_1x$$

Ecuación 6

A pesar de que este método de calibración es muy utilizado, tiene ciertos problemas. El primero es que trata de predecir y a partir de x y no al revés, con lo cual en una muestra solo se deben tomar en consideración todos los componentes conocidos; sin embargo es muy difícil, sino es que imposible, conocer todos los componentes. El segundo problema que da la mayor aportación de error es en la preparación de muestra más que en la reproducibilidad del instrumento. El método de calibración clásica asume que todo el error se encuentra en el bloque de las x . La pendiente de la línea se puede obtener escogiendo puntos en la línea y calcular la diferencia entre sus valores en el eje y (ΔY), después se calcula la diferencia entre los valores del eje x (ΔX) y por último se divide $\Delta Y/\Delta X$.

Calibración inversa

Este tipo de calibración utiliza la concentración como variable dependiente y la señal analítica como independiente y asume que el error se encuentra en el bloque de las abscisas. La ecuación que describe este método es la siguiente:

$$x = a_0 + a_1y$$

Ecuación 7

Tanto el modelo directo como el inverso permiten predecir la concentración de un analito a partir del espectro de la muestra. La diferencia reside en la información necesaria para calcular el modelo, por ejemplo para calcular un modelo clásico debemos conocer la concentración de todos los componentes que absorben en las muestras de calibración mientras que para el modelo inverso sólo es necesario conocer el parámetro de interés del analito en dichas muestras.

Análisis de regresión lineal múltiple

La regresión lineal múltiple (MLR) es una extensión cuando se emplea más de una respuesta. Hay dos razones principales para esto. La primera es que puede haber



más de un componente en una mezcla, para lo que bajo tales circunstancias es aconsejable emplear más de una respuesta. La segunda es que cada respuesta contiene información diferente de la otra. Algunos desplazamientos químicos en un espectro pueden estar influidos por ruido o interferentes desconocidos.

Mínimos Cuadrados Parciales

El análisis de regresión de mínimos cuadrados se usa para describir la relación entre una variable y una respuesta o entre varias variables y varias respuestas. Todos los modelos que describen la relación entre x e y , se pueden describir como una función general $y=f(x, a, b_1, \dots, b_m)$, donde a, b_1, b_m son los parámetros de la función. En PLS la matriz de respuesta se descompone, al igual que en PCA, en matrices de menor tamaño. Las matrices generadas son 2, la matriz de *scores*, **T**, y la matriz de *loadings*, **P**. Un análisis similar se realiza para la variable dependiente **Y**, generando las matrices de los *scores*, **U**, y *loadings*, **Q**. Las ecuaciones 6 y 7 muestran las relaciones de las matrices con las matrices generadas.

$$X = TP^T + E \quad \text{Ecuación 8}$$

$$Y = UQ^T + F \quad \text{Ecuación 9}$$

La ventaja del método de PLS es un algoritmo que se realiza en un solo paso. Una manera de entender cómo se realizan los cálculos es que, por un lado se genera un conjunto de factores y *scores* para los espectros y por el otro se genera un conjunto de factores y *scores* para la variable dependiente. Después de lo anterior se relacionan los dos conjuntos de *scores* y se obtienen los datos de correlación de cada variable con la respuesta.

Hotelling T^2

Durante el proceso de monitoreo, las estadísticas de valores atípicos son herramientas poderosas para identificar si las muestras son diferentes a las



utilizadas en el conjunto de calibración. Tales estadísticas de los datos atípicos se utilizan para la detección de desviaciones del proceso o las cuestiones de medición. El límite de Hotelling T^2 se calcula basándose en las muestras de calibración, y se basa en un nivel de significación especificado por el usuario. El límite sirve para la detección de las demás muestras recién medidas y los que superan los límites se consideran valores atípicos. La contribución de las gráficas de Hotelling T^2 puede ayudar al usuario a encontrar la causa de una muestra atípica.

Validación cruzada

Es una técnica de validación de modelos para evaluar cómo los resultados de un análisis estadístico generalizarán a un conjunto de datos independientes. Si el conjunto de datos original contiene un gran número de objetos esto es suficiente, sin embargo, muy a menudo en la quimiometría sólo un número relativamente pequeño de objetos está disponible. La validación cruzada se utiliza principalmente en entornos en los que el objetivo es la predicción, y uno quiere estimar con precisión un modelo predictivo que se llevará a cabo en la práctica. Para la generación de modelos y pruebas de modelo es importante obtener estimaciones realistas de rendimiento para los nuevos casos. La optimización del desempeño de un modelo único puede llevar hacia un sobreajuste, esto significa que el modelo se ajusta a las muestras a la perfección, pero no predecirá bien nuevos datos. Por lo tanto, los datos obtenidos se suelen dividir en tres subgrupos: entrenamiento, validación y prueba. Los dos primeros se utilizan para la selección del modelo y el último para probar el modelo sobre nuevos datos.

La validación cruzada “dejando uno fuera” consiste en la partición de los datos de las muestras en subconjuntos complementarios, realizando el análisis sobre un subconjunto (conjunto de entrenamiento), y validar el análisis en el otro subconjunto (conjunto de validación o conjunto de prueba), es en este último subconjunto que se escoge una sola muestra como prueba para validar el método. Para reducir la variabilidad, múltiples rondas de validación cruzada se realizan



utilizando diferentes muestras en el subconjunto de prueba, y por último se obtiene la regresión lineal.



III. Espectros de ^1H RMN

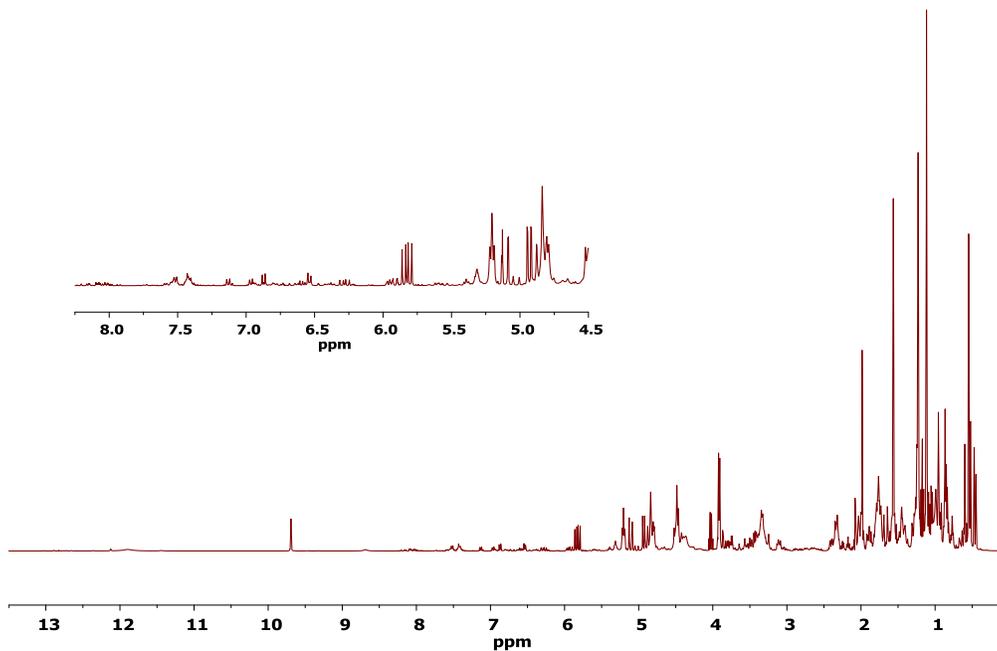


Figura 39.- Espectro ^1H RMN de la muestra de propóleo de Acuexcómatl 1era colecta y expansión de 4.5 a 8.5 ppm.

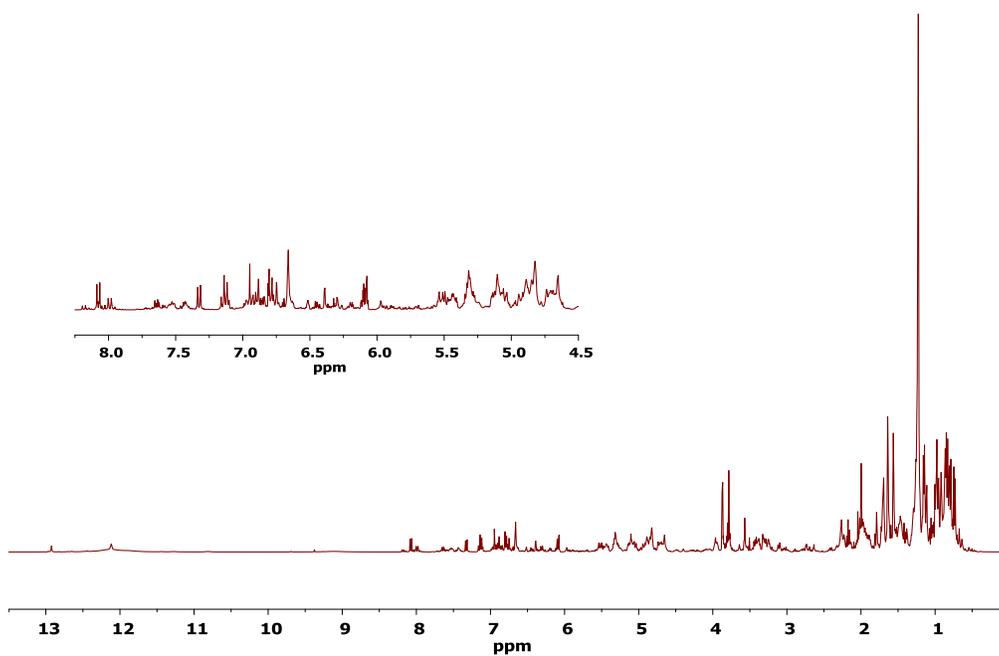


Figura 40.- Espectro ^1H RMN de la muestra de propóleo de Acuexcómatl 3era colecta y expansión de 4.5 a 8.5 ppm.

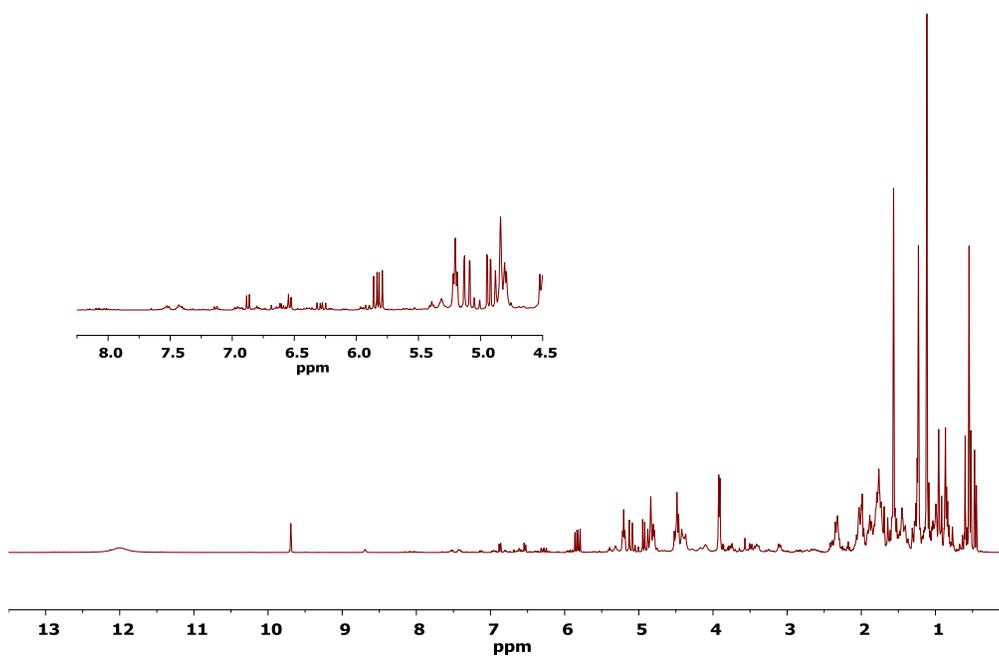


Figura 41.- Espectro ^1H RMN de la muestra de propóleo de Bonilla 1era colecta y expansión de 4.5 a 8.5 ppm.

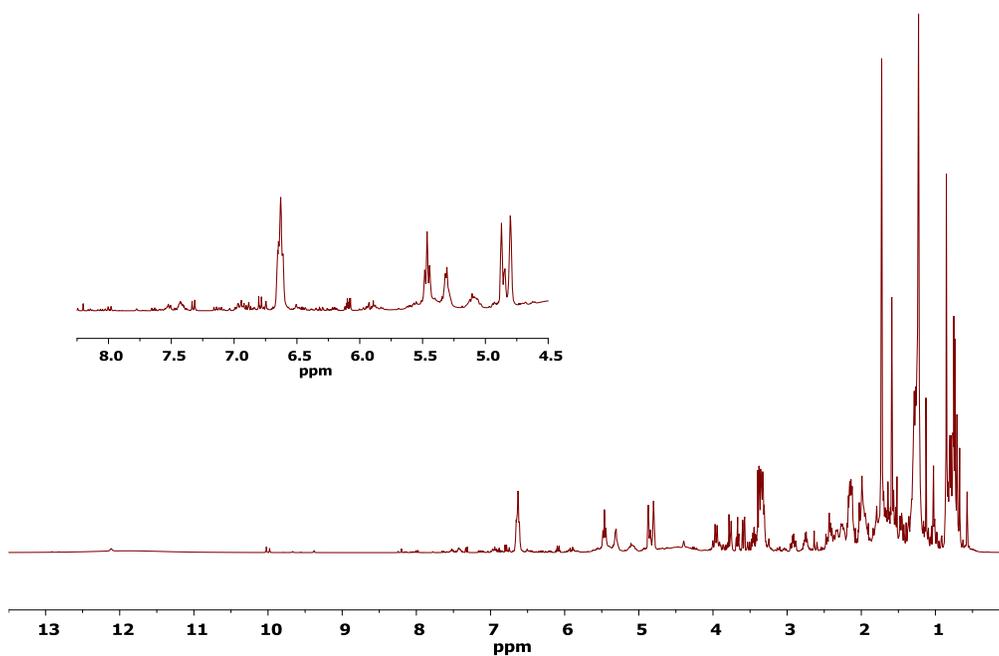


Figura 42.- Espectro ^1H RMN de la muestra de propóleo de Bonilla 3era colecta y expansión de 4.5 a 8.5 ppm.

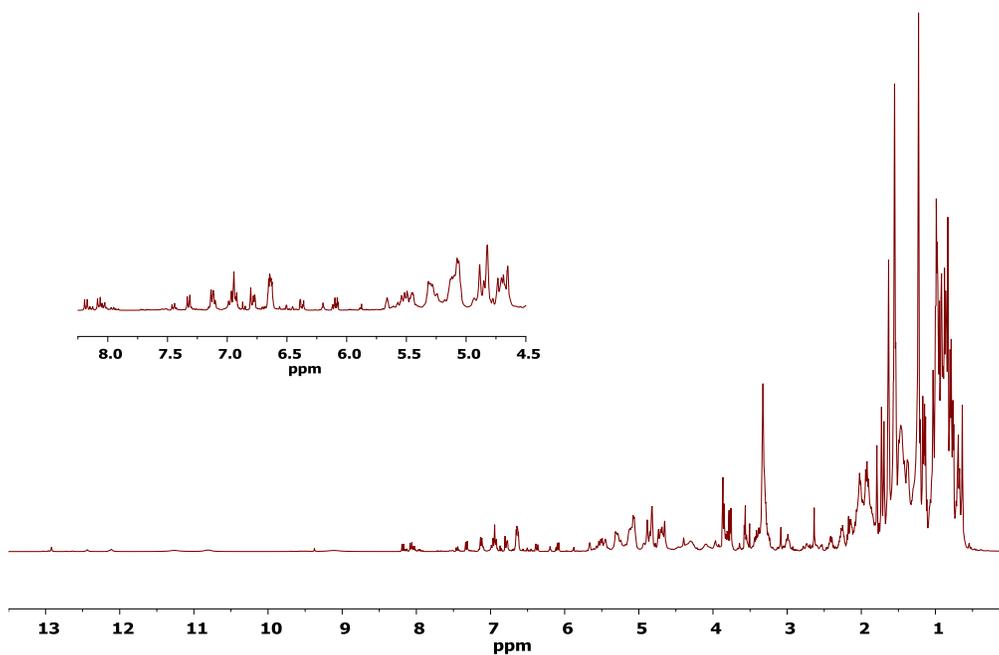


Figura 43.- Espectro ^1H RMN de la muestra de propóleo de Búho 2da colecta y expansión de 4.5 a 8.5 ppm.

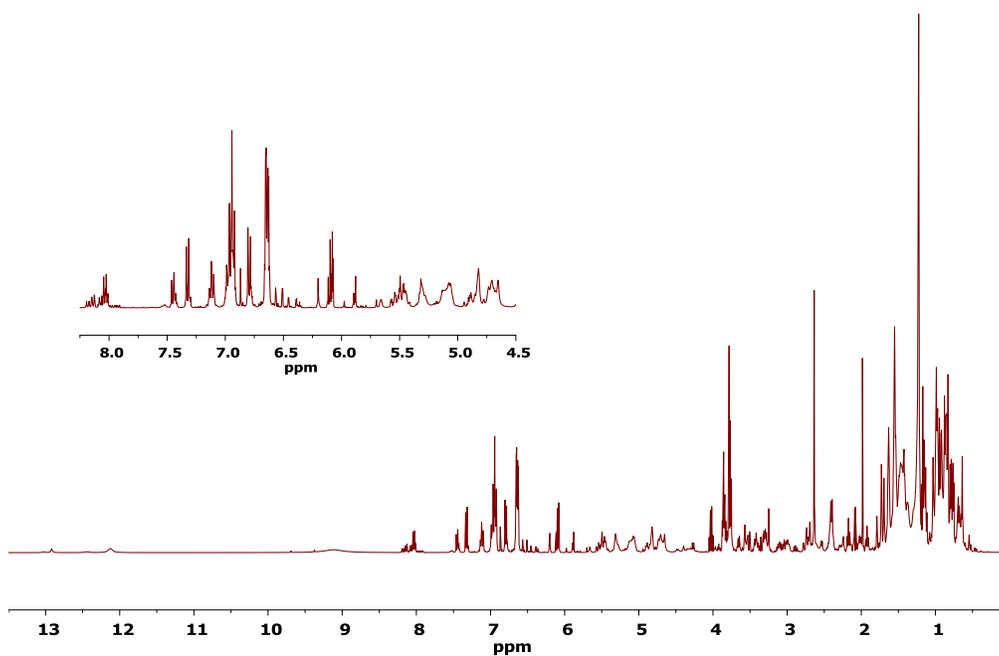


Figura 44.- Espectro ^1H RMN de la muestra de propóleo de Don Nico 1era colecta y expansión de 4.5 a 8.5 ppm.

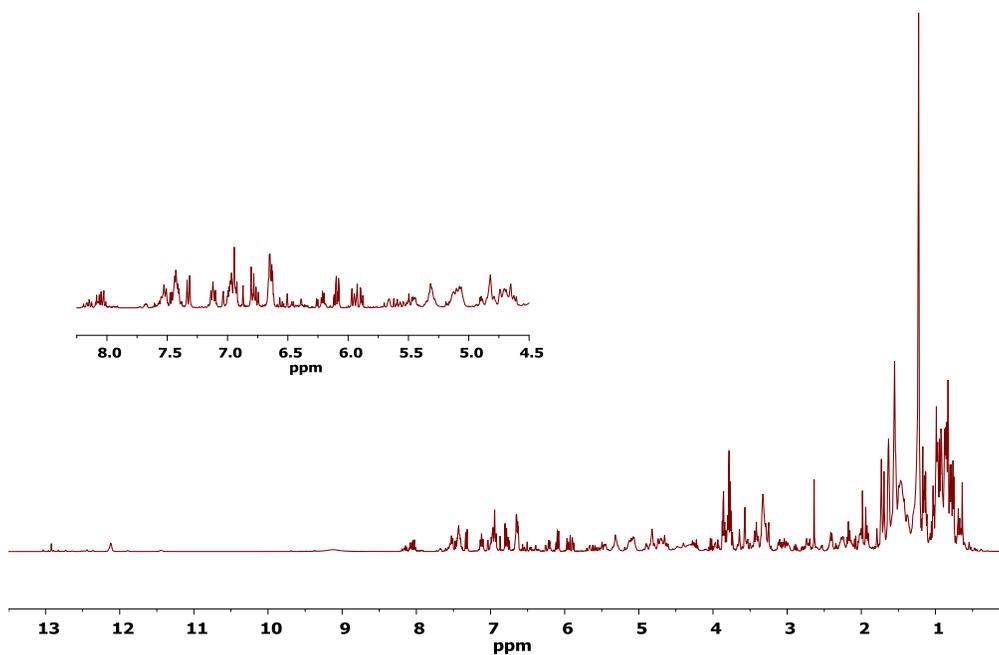


Figura 45.- Espectro ^1H RMN de la muestra de propóleo de Búho 3era colecta y expansión de 4.5 a 8.5 ppm.

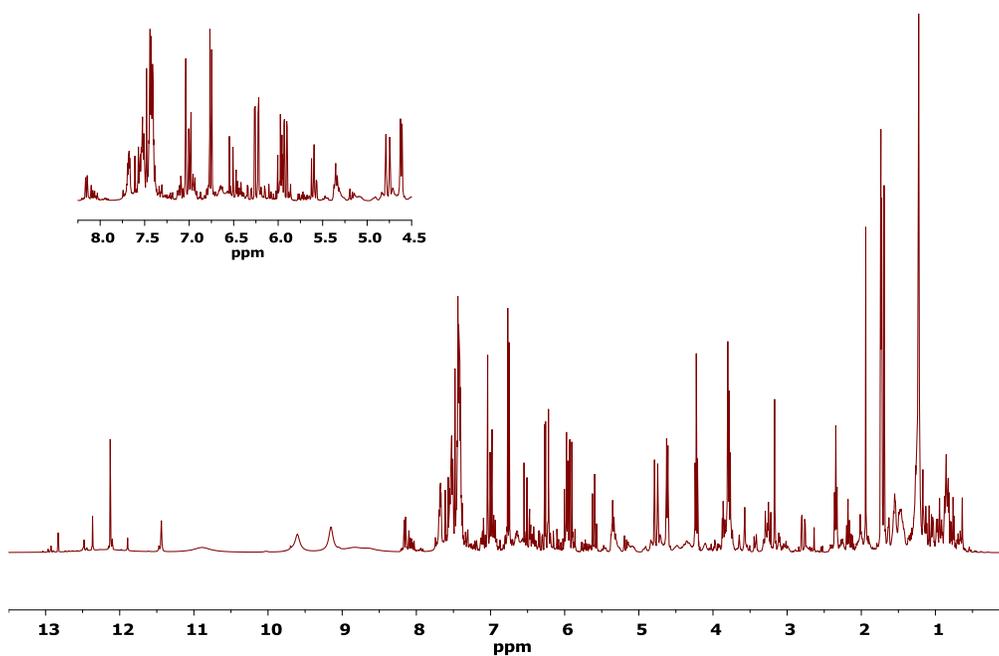


Figura 46.- Espectro ^1H RMN de la muestra de propóleo de Don Nico 3era colecta y expansión de 4.5 a 8.5 ppm.

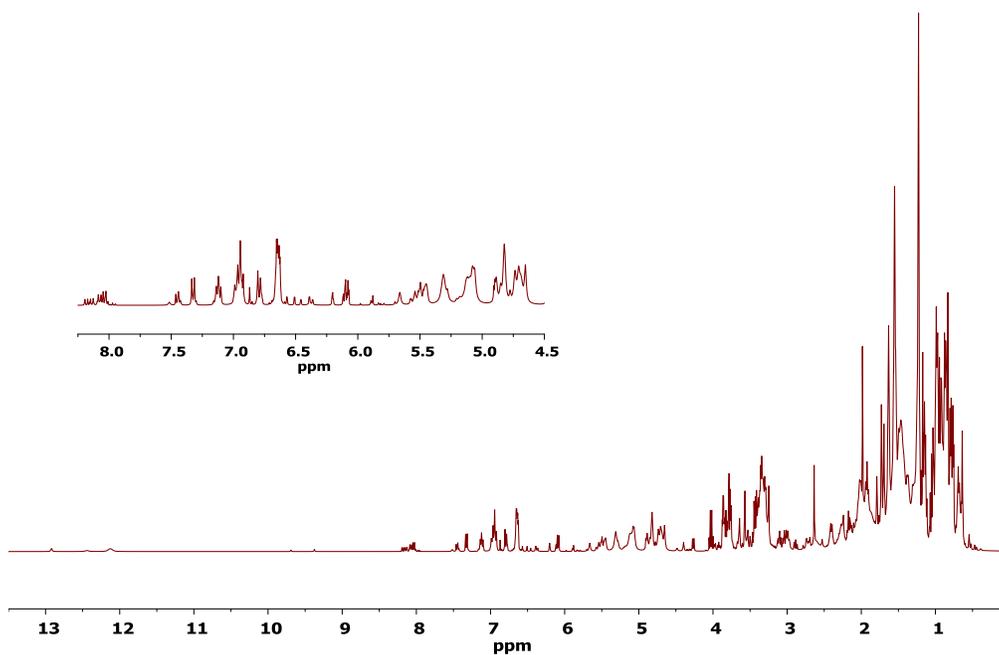


Figura 47.- Espectro ^1H RMN de la muestra de propóleo de Panteón 2da colecta y expansión de 4.5 a 8.5 ppm.

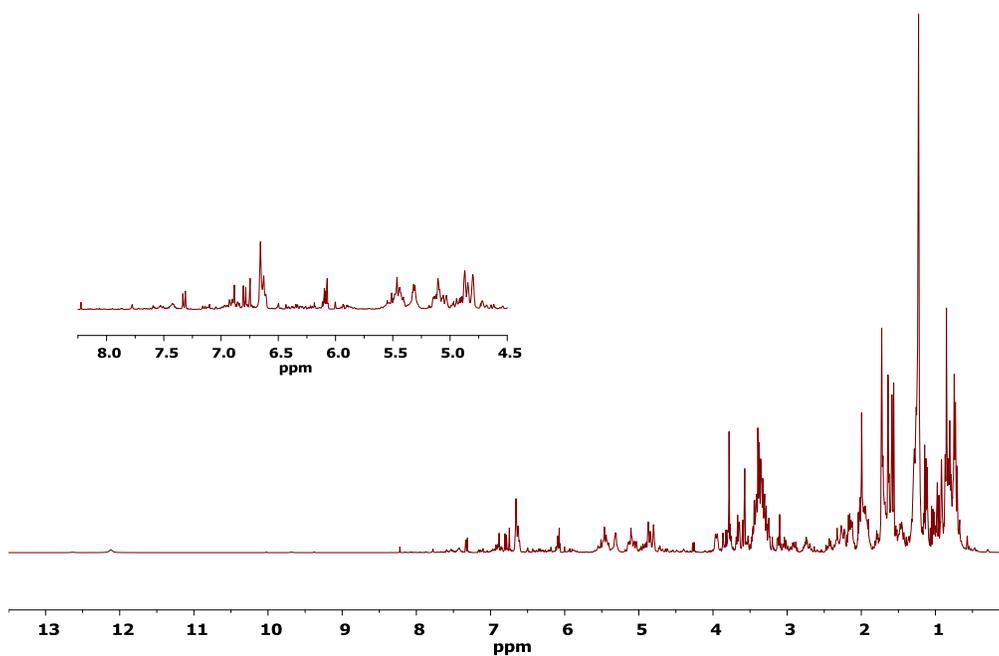


Figura 48.- Espectro ^1H RMN de la muestra de propóleo de Tepenáhuatl 2da colecta y expansión de 4.5 a 8.5 ppm.

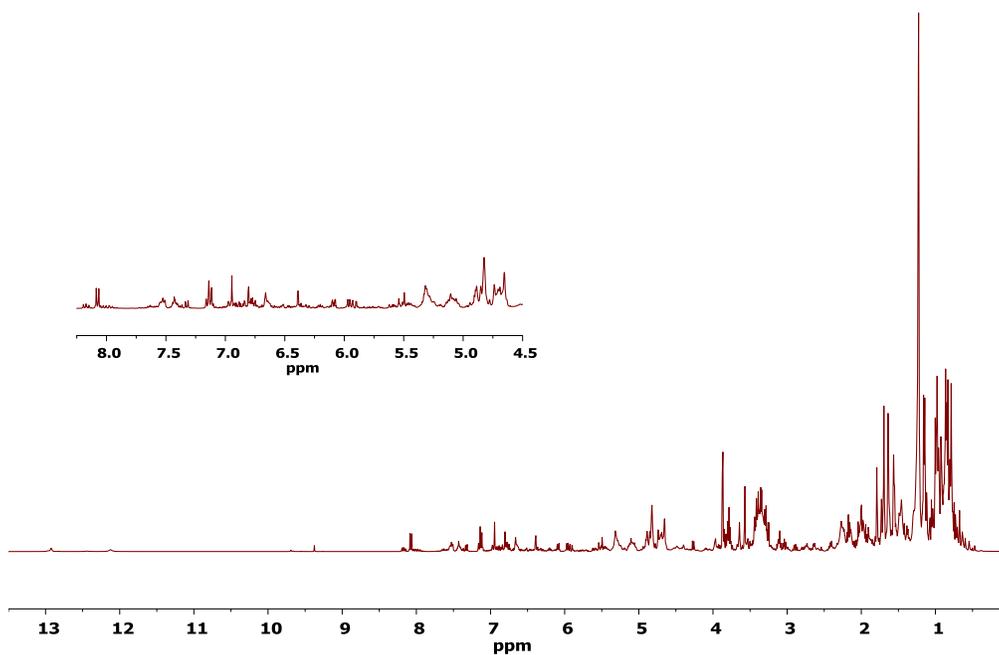


Figura 49.- Espectro ^1H RMN de la muestra de propóleo de Troje 2da colecta y expansión de 4.5 a 8.5 ppm.

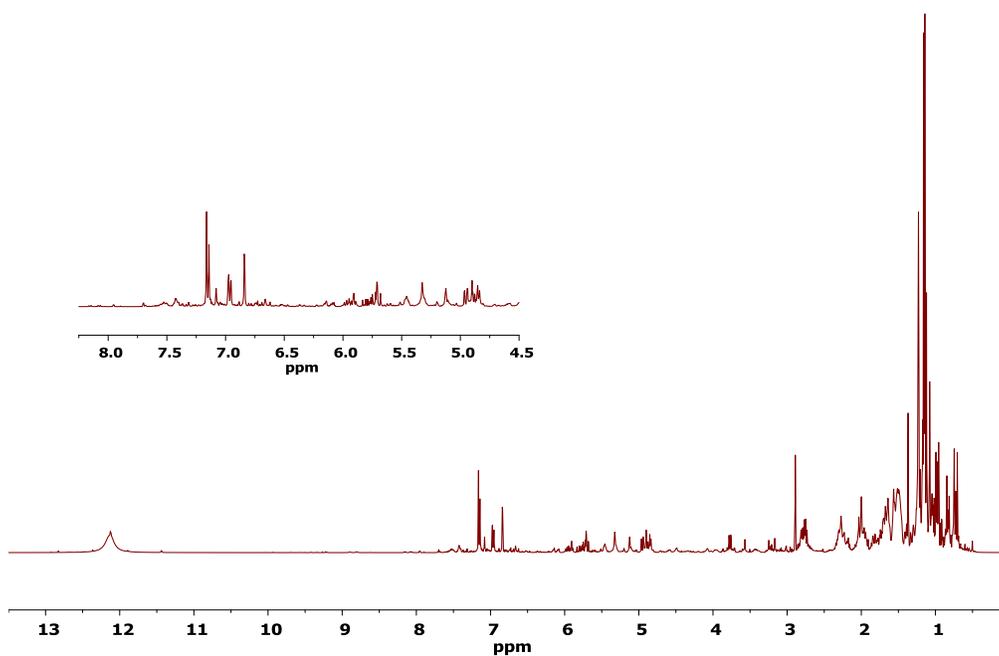


Figura 50.- Espectro ^1H RMN de la muestra de propóleo de Valentín 3era colecta y expansión de 4.5 a 8.5 ppm.

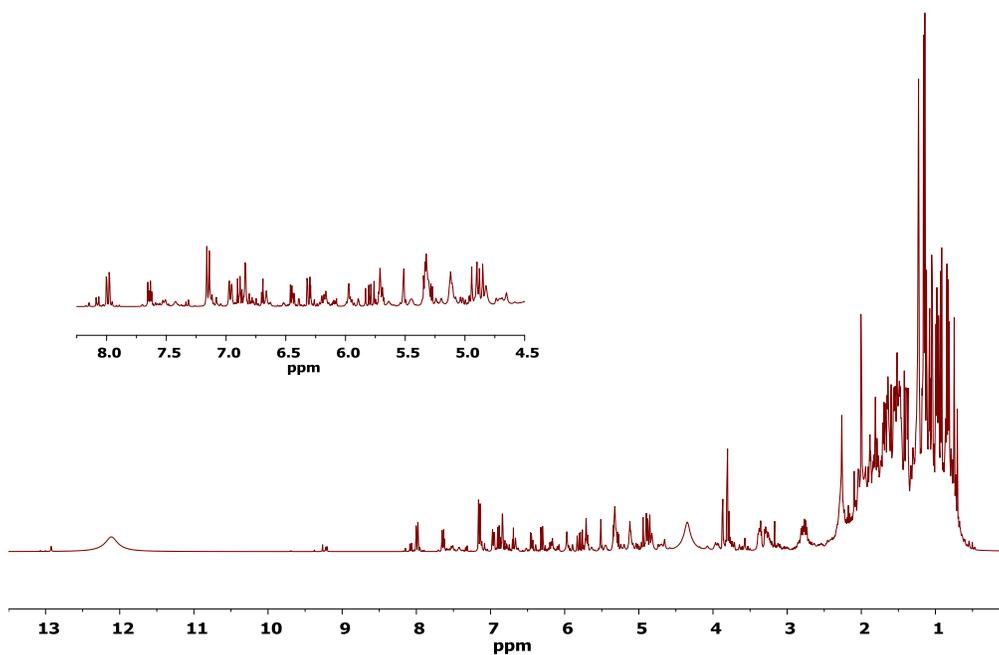


Figura 51.- Espectro ^1H RMN de la muestra de propóleo de Acuexcómatl 4ta colecta y expansión de 4.5 a 8.5 ppm.

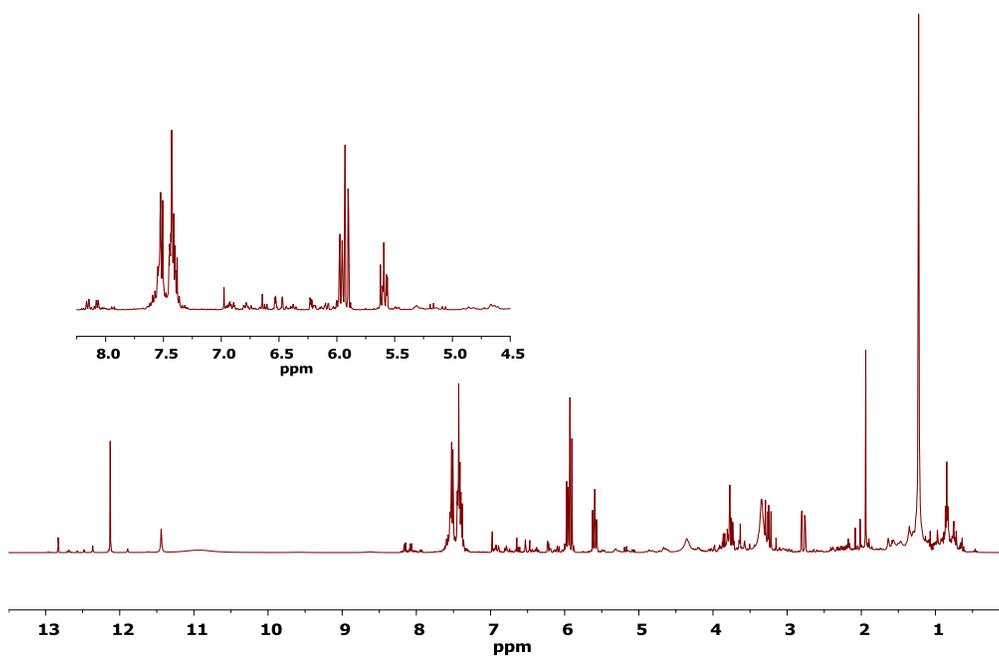


Figura 52.- Espectro ^1H RMN de la muestra de propóleo de Durango y expansión de 4.5 a 8.5 ppm.

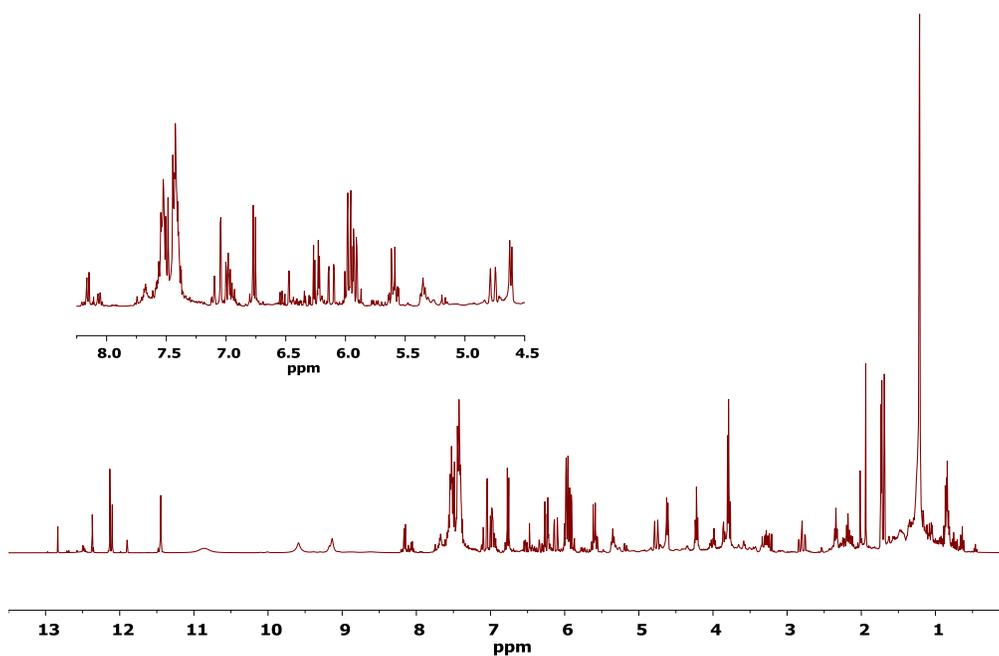


Figura 53 Espectro ^1H RMN de la muestra de propóleo de Álamo Blanco y expansión de 4.5 a 8.5 ppm.

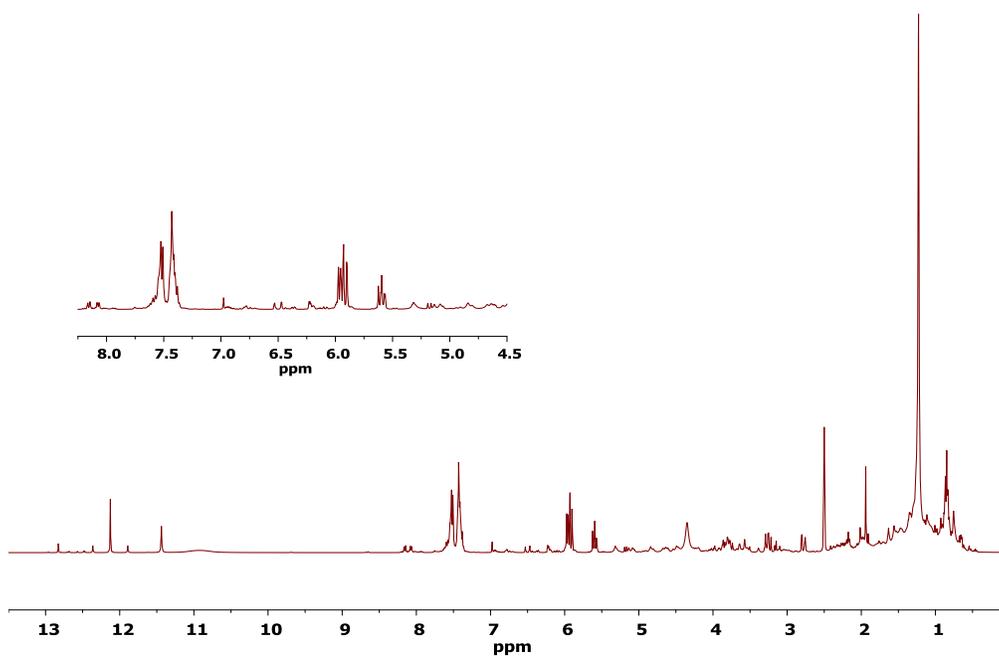


Figura 54.- Espectro ¹H RMN de la muestra de propóleo de Zacatecas y expansión de 4.5 a 8.5 ppm.



IV. Gráficas de correlación de PLS

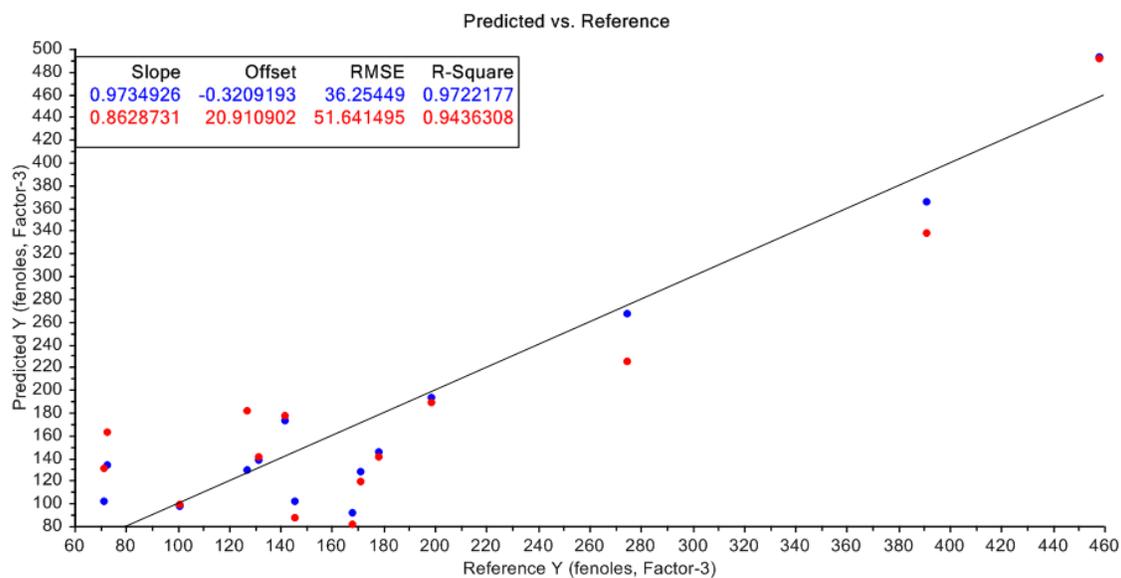


Figura 55.- Correlación del espectro ^1H RMN (4.5 a 8.5 ppm) con el ensayo de fenoles totales. Gráfica de la curva de calibración (azul) y la curva de validación (rojo) con su línea de tendencia.

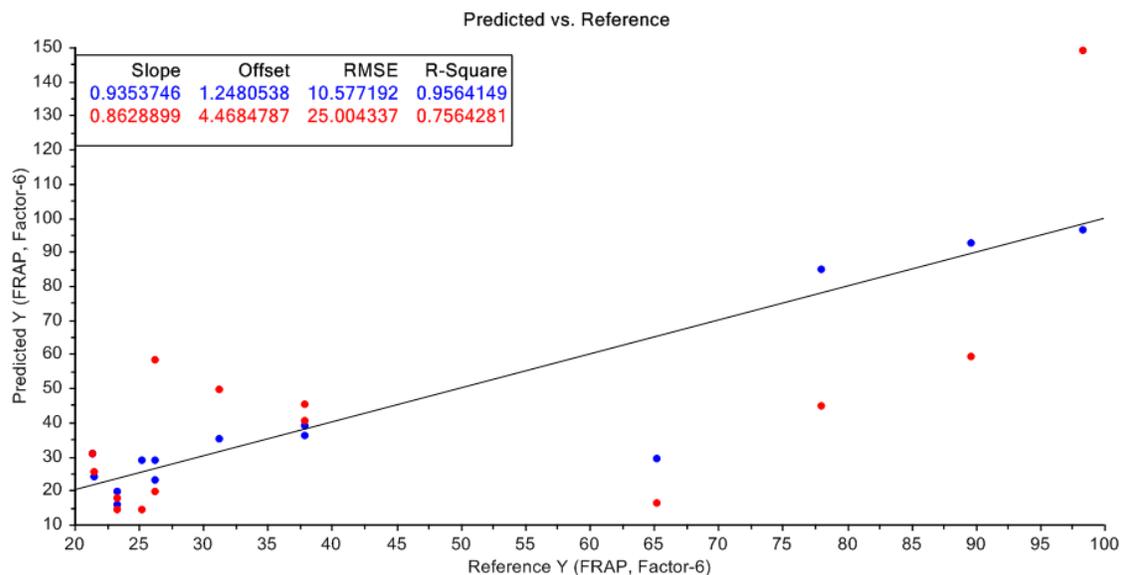


Figura 56.- Correlación del espectro ^1H RMN (6 a 8 ppm) con el ensayo de FRAP. Gráfica de la curva de calibración (azul) y la curva de validación (rojo) con su línea de tendencia.

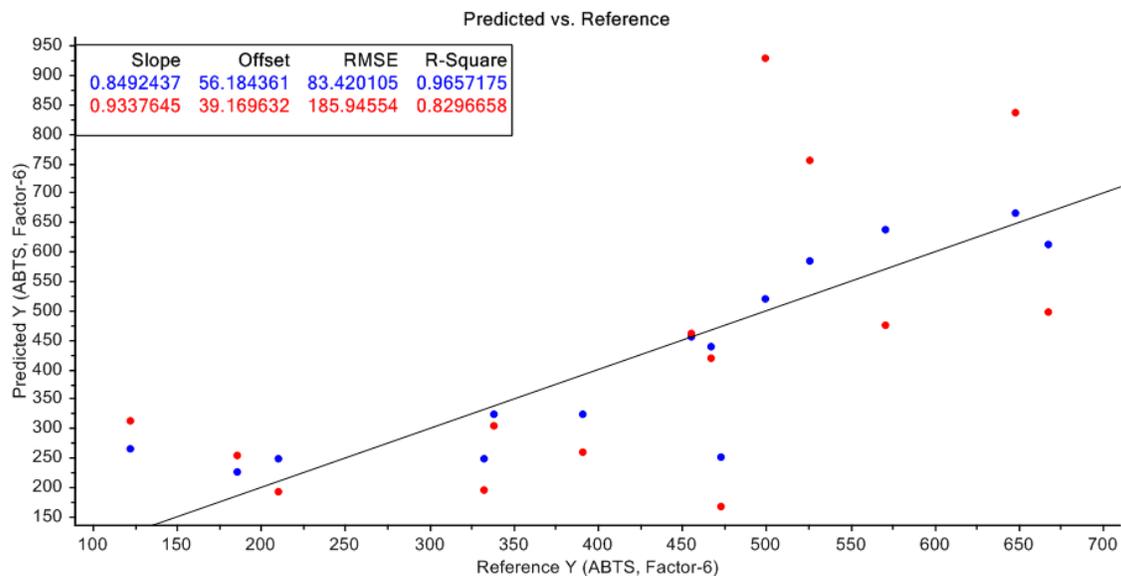


Figura 57.- Correlación del espectro ^1H RMN (6 a 8 ppm) con el ensayo de ABTS. Gráfica de la curva de calibración (azul) y la curva de validación (rojo) con su línea de tendencia.

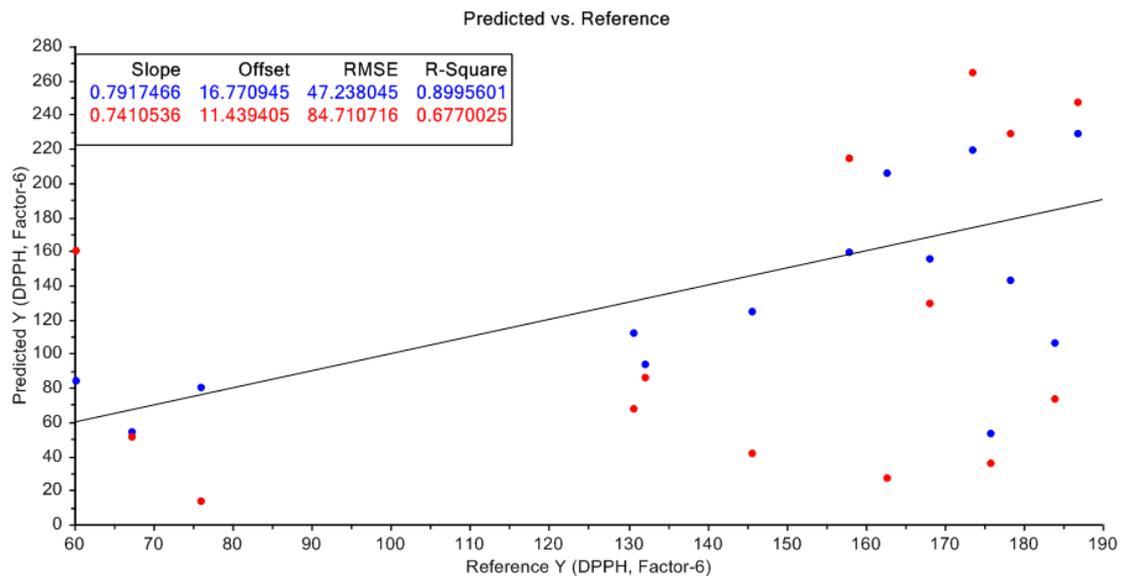


Figura 58.- Correlación del espectro ^1H RMN (8.5 a 13.5 ppm) con el ensayo de DPPH. Gráfica de la curva de calibración (azul) y la curva de validación (rojo) con su línea de tendencia.